

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7058606号

(P7058606)

(45)発行日 令和4年4月22日(2022.4.22)

(24)登録日 令和4年4月14日(2022.4.14)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 K

38/16

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

N Z M D

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P

35/02

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 1 1

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N

15/13

請求項の数 13 (全194頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-544185(P2018-544185)

(86)(22)出願日 平成29年2月22日(2017.2.22)

(65)公表番号 特表2019-510001(P2019-510001
A)

(43)公表日 平成31年4月11日(2019.4.11)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/018938

(87)国際公開番号 WO2017/147182

(87)国際公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

審査請求日 令和2年2月25日(2020.2.25)

(31)優先権主張番号 62/298,366

(32)優先日 平成28年2月22日(2016.2.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 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 0 2
1 3 9, ケンブリッジ, シドニー ス
トリート 1 2 8

(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 0 1
7 2 0, アクトン, アーリントン ス
トリート 4 2 1

(72)発明者 アリムザノフ, マラート

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 増加した免疫活性において使用するためのA C T R I I アンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者において白血病の処置において使用するための組成物であって、

有効量のA c t R I I アンタゴニストを含み、

前記A c t R I I アンタゴニストは：

配列番号1のアミノ酸29～109の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を

含むA c t R I I Bポリペプチド；および、

異種ドメイン；

を含み、

ここで、前記A c t R I I Bポリペプチドは、増殖および分化因子8（G D F 8）および

／または増殖および分化因子11（G D F 11）に結合し；そして、

前記組成物は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、B G B - A 3 1 7、ア
テゾリズマブ、アベルマブまたはデュルバルマブからなる群から選択されるP D 1 - P D
L 1 アンタゴニストの有効量と組み合わせて使用するためのものである、組成物。

【請求項2】

前記患者が、化学療法剤で処置されている、請求項1に記載の使用のための組成物。

【請求項3】

前記化学療法剤が、白金に基づく化学療法剤である、請求項2に記載の使用のための組成
物。

【請求項4】

A c t R I I アンタゴニストの量が、単独では前記白血病の処置において無効である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記 P D 1 - P D L 1 アンタゴニストの量が、単独では前記白血病の処置において無効である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記患者が、

a) 自己免疫疾患に罹っていない、

b) 臓器もしくは組織移植を経ていない、または臓器もしくは組織移植を受けている、かつ／または

c) 移植片対宿主病に罹っていない、

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

前記 A c t R I I アンタゴニストが、配列番号 1 のアミノ酸 29 ～ 109 の配列と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む A c t R I I B ポリペプチドである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

前記 A c t R I I アンタゴニストが、配列番号 1 のアミノ酸 29 ～ 109 の配列を含む A c t R I I B ポリペプチドである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記 A c t R I I アンタゴニストの前記異種ドメインが、免疫グロブリン F c ドメインである、請求項 7 または 8 に記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

前記 A c t R I I B ポリペプチドが、配列番号 1 の L 79 に対応する位置に酸性アミノ酸を含まない、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 11】

前記 P D 1 - P D L 1 アンタゴニストがペンブロリズマブである、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 12】

前記 A c t R I I アンタゴニストおよび前記 P D 1 - P D L 1 アンタゴニストが同じ製剤中にある、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 13】

前記 A c t R I I アンタゴニストおよび前記 P D 1 - P D L 1 アンタゴニストが別々の製剤中にある、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2016年2月22日に出願された米国仮出願第62／298，366号の優先権の利益を主張する。上記出願の明細書全体が、参照によって本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

がん処置において、化学療法は、高い毒性を伴い、抵抗性がん細胞改変体の出現をもたらし得ると長年認識されてきた。腫瘍生存および成長に重要な過剰発現または活性化された腫瘍性タンパク質に対する標的化療法を用いた場合であっても、がん細胞は、高頻度で変異し、冗長な経路を利用することなどにより、標的化された経路への依存を低減させるように適応する。がん免疫療法は、がん細胞を標的化する代わりに、免疫系の活性化に焦点を合わせる、がん処置における新たなパラダイムである。その原理は、宿主の免疫応答、特に、養子T細胞応答を再武装化し、がん細胞を同定および死滅させ、長く続く防御免疫

10

20

30

40

50

を達成するためのものである。このような治療法は、免疫系の活性の増加に向けられるため、がん免疫療法剤は、他の障害、特に、病原体が免疫回避性および／または宿主免疫系を損なう感染性疾患における免疫応答を改善する能力についても調査されている。

【0003】

2011年におけるメラノーマの処置のための抗CTLA-4抗体イピリムマブのFDA承認は、がん免疫療法の新時代を導いた。抗PD-1または抗PD-L1療法が、臨床試験でメラノーマ、腎臓および肺がんにおける耐久性のある応答を誘導したと実証したことは、広範囲のがんの処置における免疫療法の潜在的用途をさらに知らせる(Pardoll, D. M., Nat Immunol. 2012年; 13巻: 1129~32頁)。しかし、利用できるまたは臨床試験中のがん免疫治療法の多くには限界がある。例えば、おそらく、抗CTLA-4処置は、主要T細胞阻害チェックポイントに干渉することにより、新たな自己反応性T細胞の生成をもたらす得るため、イピリムマブ療法は、高い毒性プロファイルを有する。PD-L1/PD-1相互作用の阻害は、大部分は抗ウイルスまたは抗がんの性質である疲弊したT細胞における現存している慢性免疫応答の脱阻害をもたらすが(Wherry, E. J., Nat Immunol. 2011年; 12巻: 492~9頁)、にもかかわらず抗PD-1療法は時に、潜在的に致死的な肺関連の自己免疫性有害事象をもたらす場合がある。加えて、免疫チェックポイント阻害剤は、一部の患者における強力な抗がん療法薬となり得るが、これは一般に、多くの患者において有効性が低い~有効性が全くない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Pardoll, D. M., Nat Immunol. 2012年; 13巻: 1129~32頁
Wherry, E. J., Nat Immunol. 2011年; 12巻: 492~9頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

よって、患者、特に、がんまたは感染性疾患を有する患者における免疫応答を増加させるための有効な治療法の必要は、依然として大いに満たされていない。さらに、PD1-PDL1アンタゴニストなど、現存している治療法の抗がん効果を増加し得る連携治療剤を開発する必要がある。したがって、本開示の一目的は、免疫応答を増加させることを必要とする患者における免疫応答を増加させると共に、がんおよび感染性疾患を処置するための方法を提供することである。

一部には、本明細書に提示されているデータは、ActRIIアンタゴニスト(阻害剤)を使用して、がんを処置することができることを実証する。特に、ActRIIAおよびActRIIB(ActRIIA/B抗体)、ActRIIAポリペプチド、ActRIIBポリペプチド、またはALK4: ActRIIBヘテロ二量体に別々に結合する抗体のいずれかによる処置が、例えば、腫瘍負荷の減少および生存時間の増加を含む、がんモデルにおける様々なプラス効果を有することが示された。さらに、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせたActRIIアンタゴニストを使用して、いずれかの薬剤単独により観察される効果と比較して、抗がん活性を相乗的に増加することができることが示された。したがって、本開示は、一部には、単独で、または1つまたは複数の支持療法および／または追加的な活性剤(例えば、免疫チェックポイント阻害剤など、免疫療法剤)と組み合わせてActRIIアンタゴニストを使用して、がんまたは腫瘍を処置する、特に、がんまたは腫瘍の1つまたは複数の合併症の重症度または進行を予防または低減する(例えば、がんまたは腫瘍負荷を低減する)方法を提供する。加えて、データは、ActRIIアンタゴニスト療法の有効性が、免疫系に依存することを指し示す。したがって、一部には、本開示は、ActRIIアンタゴニストを、単独で、または1つまたは複数の支持療法および／または追加的な活性剤(例えば、免疫チェックポイント阻害剤など、免疫療法剤)と組み合わせて、免疫療法薬として使用して、特に、多種多様ながんおよび腫瘍(例えば、免疫抑制および／または免疫疲弊に関連するがんおよび腫瘍)を処置することが

できるという発見に関する。他の公知の免疫腫瘍学的薬剤と同様に、患者における免疫応答を増強する、単独での、または1つまたは複数の支持療法および／または追加的な活性剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤など、免疫療法剤）と組み合わせたA c t R I I アンタゴニストの能力は、がん分野外のより幅広い治療上の意義を有することができる。例えば、免疫増強剤が、多種多様な感染性疾患、特に、免疫抑制および／または免疫疲弊を促進する病原体の処置において有用となり得ることが提案された。また、このような免疫増強剤は、ワクチン（例えば、感染性疾患およびがんワクチン）の免疫化有効性のブーストにおいて有用となり得る。したがって、本開示は、単独で、または1つまたは複数の支持療法および／または追加的な活性剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤など、免疫療法剤）と組み合わせて使用して、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させる、がんもしくは腫瘍を処置する、病原体（感染性疾患）を処置する、および／または免疫化有効性を増加させることができる様々なA c t R I I アンタゴニストを提供する。

10

【0006】

例に記載されているA c t R I I A／B抗体、A c t R I I Aポリペプチド、A c t R I I BポリペプチドおよびA L K 4：A c t R I I Bヘテロ二量体は、A c t R I I 経路の阻害以外の機構により免疫系および／またはがんに影響を与えることができるが〔例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンA BおよびアクチビンA E）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0、B M P 9、T G F β 2のうち1つまたは複数の阻害は、おそらく、T G F β 超スーパーファミリーの他のメンバーを含む追加的な薬剤のスペクトルの活性を阻害する薬剤の傾向の指標となることができ、このような集団的阻害は、例えば、がんにおける所望の効果をもたらすことができる〕、例えば、A c t R I I 関連リガンド阻害剤；I型、II型および／または共受容体阻害剤（例えば、A L K 4、A c t R I I AおよびA c t R I I Bのうち1つまたは複数の阻害剤）；および／または下流シグナル伝達阻害剤（例えば、S m a d 2および3など、S m a dタンパク質の1つまたは複数の阻害剤）〕を含む他の種類のA c t R I Iシグナル伝達阻害剤が、本開示の方法および使用に従って有用であると予測される。このようなA c t R I Iシグナル伝達阻害剤は、例えば、抗体アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A／B抗体、またはA c t R I I A抗体およびA c t R I I B抗体の組合せ）、核酸アンタゴニスト、小分子アンタゴニストおよびリガンドトラップ（例えば、可溶性A c t R I I Aポリペプチド、A c t R I I Bポリペプチド、A L K 4：A c t R I I Bヘテロ二量体、フォリスタチンポリペプチドおよびF L R Gポリペプチド）を含む。本明細書で使用する場合、A c t R I I（A c t R I I Aおよび／またはA c t R I I B）活性を阻害する薬剤は、「A c t R I Iアンタゴニスト」または「A c t R I I阻害剤」とまとめて称される。

20

30

【0007】

一般に、がん免疫療法は、がんを処置するための免疫系の使用である。免疫療法は、能動的、受動的またはハイブリッドとしてカテゴリー化することができる。これらのアプローチは、がん細胞が、免疫によって検出され得るその表面に発現された分子を有することが多いという事実を活用する。このようながん特異的分子は、典型的にはタンパク質または他の高分子（例えば、炭水化物）である、腫瘍関連抗原と称されることが多い。能動的免疫療法は、腫瘍関連抗原を標的とすることにより腫瘍細胞を攻撃するように免疫系を方向づける。受動的免疫療法は、現存している抗腫瘍応答を増強し、抗体、リンパ球およびサイトカインの使用を含む。一部の実施形態では、本開示は、免疫チェックポイント阻害剤の使用に関する。一般に、免疫チェックポイントは、免疫系活性に影響を与え、刺激型または阻害型となり得る。一部の腫瘍は、免疫系攻撃から自分を保護するためにこのようなチェックポイントを使用する。チェックポイント治療薬は、免疫系機能を回復しつつ阻害チェックポイントを遮断し、これによって、免疫媒介性抗がん応答を促進することができる。例えば、プログラム細胞死1タンパク質（P D 1）、プログラム細胞死リガンド1（P D L 1）および細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（C T L A - 4）の阻害剤を含

40

50

む、いくつかのチェックポイント阻害剤が、がんおよび腫瘍の処置のために承認された、または臨床試験にて評価中である。一部の実施形態では、本開示は、特に、A c t R I I A アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）と組み合わせたP D 1 - P D L 1 アンタゴニストの使用に関する。本明細書で記載されている通り、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストは、P D 1 - P D L 1 相互作用、下流シグナル伝達P D 1 - P D L 1 相互作用、ならびに／またはP D 1 および／もしくはP D L 1 の発現を阻害することができる種々の異なる薬剤（例えば、抗体、小分子およびポリヌクレオチド）を含む。

【0008】

ある特定の態様では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、A c t R I I A およびA c t R I I B に結合する抗体（A c t R I I A / B 抗体）（またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）およびP D 1 - P D L 1 アンタゴニストを、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍を処置するための、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストと組み合わせた使用のためのA c t R I I A / B 抗体（またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）に関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍を処置するための、A c t R I I A / B 抗体（またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）と組み合わせた使用のための、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置するための、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストと組み合わせたA c t R I I A / B 抗体（またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）の使用に関する。一部の実施形態では、本方法は、がんまたは腫瘍の1つまたは複数の合併症の重症度または進行を予防または低減する。例えば、本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させることができる。一部の実施形態では、本方法は、がんまたは腫瘍転移を阻害することができる。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺癌（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膀胱がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する。ある特定の好ましい実施形態では、本方法は、患者の生存時間を増加させる（例えば、6、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56ヶ月間またはそれよりも長い月数を超えて生存時間を増加させる）。一部の実施形態では、本方法は、患者の無再発生存時間を増加させる（例えば、6、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56ヶ月間またはそれよりも長い月数を超えて無再発生存時間を増加させる）。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。本開示に従った使用のためのP D 1 - P D L 1 アンタゴニストは、例えば、抗体、小分子およびポリヌクレオチドを含む様々な分子を含む。一部の実施形態では、本開示に従って使用されるべきP D 1 - P D L 1 アンタゴニストは、P D 1 抗体である。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきP D 1 抗体は、ニボルマブである。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきP D 1 抗体は、ペンブロリズマブである。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきP D 1 抗体は、ピディリズマブである。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきP D 1 抗体は、B G B - A 3 1 7 である。他の実施形態では、本開示に従って使用されるべきP D 1 - P D L 1 アンタゴニストは、P D L 1 抗体である。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきP D L 1 抗体は、アテゾ

10

20

30

40

50

リズマブである。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきPDL1抗体は、アベルマブである。一部の実施形態では、本開示の方法に従って使用されるべきPDL1抗体は、デュルバルマブである。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、増加したPDL1発現に関連する。例えば、本開示の方法を使用して、 $\geq 1\%$ ($\geq 1\%$ 、 2% 、 3% 、 4% 、 5% 、 10% 、 15% 、 20% 、 25% 、 30% 、 40% 、 45% 、 50% またはそれを超える%のPDL1陽性腫瘍細胞)のPDL1腫瘍比率スコア(TPS)を有するがんまたは腫瘍を処置することができる。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して、 $\geq 50\%$ のPDL1腫瘍比率スコア(TPS)を有するがんまたは腫瘍を処置することができる。がんまたは腫瘍におけるPDL1発現レベルを決定する種々の方法は、当該分野で公知であり、本開示に従って容易に使用することができる。例えば、FDA承認されたin vitro診断用PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako North America, Inc.)を使用して、種々の異なる組織型由来のPDL1タンパク質が陽性に染色する生存がんまたは腫瘍細胞の百分率を決定することができる。一部の実施形態では、患者は、化学療法剤で処置されている。一部の実施形態では、患者は、化学療法剤による処置の12ヶ月以内に(例えば、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2ヶ月以内に)疾患進行を有する。一部の実施形態では、化学療法剤は、白金に基づく化学療法剤である。一部の実施形態では、患者は、白金を含有する化学療法によるネオアジュバントまたはアジュバントで処置されている。例に示す通り、ActRIIA/B抗体およびPD1-PDL1アンタゴニストを使用して、がんを相乗的に処置することができる。よって、併用療法は、いずれかの薬剤単独をより多い量および/または増加した投薬頻度で処置した場合に観察されるがんの処置における同様のプラス効果を達成するために、ActRIIA/B抗体およびPD1-PDL1アンタゴニストのより少ない量を可能にすることができる、および/またはそれによる投薬の頻度を低減することができる。したがって、ActRIIA/B抗体およびPD1-PDL1アンタゴニスト併用療法は、ActRIIA/B抗体またはPD1-PDL1アンタゴニスト単独による処置において起こり得る所望されないオフターゲット効果のリスクを低減することができる。一部の実施形態では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIA/B抗体(またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)およびPD1-PDL1アンタゴニストを、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、ActRIIA/B抗体(またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)の量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効である、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIA/B抗体(またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)およびPD1-PDL1アンタゴニストを、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、PD1-PDL1アンタゴニストの量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効である、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIA/B抗体(またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)およびPD1-PDL1アンタゴニストを、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、ActRIIA/B抗体(またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)の量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効であり、PD1-PDL1アンタゴニストの量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効である、方法に関する。好ましくは、本開示に従って処置されるべき患者は、自己免疫疾患に罹っていない、臓器もしくは組織移植を経ているもしくはこれを受けている、または移植片対宿主病に罹っていない。ある特定の態様では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIAアンタゴニスト(例えば、ActRIIA/B抗体、またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)および免疫療法剤(例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤)を、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、がんを処置または予防することを必要とする患者におけるがんを処置または予防するための、免疫療法剤

10

20

30

40

50

と組み合わせた使用のための A c t R I I アンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、がんを処置または予防することを必要とする患者におけるがんを処置または予防するための、A c t R I I アンタゴニストと組み合わせた使用のための免疫療法剤に関する。一部の実施形態では、本方法は、がんまたは腫瘍の1つまたは複数の合併症の重症度または進行を予防または低減する。例えば、本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させることができる。一部の実施形態では、本方法は、がんまたは腫瘍転移を阻害することができる。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する。ある特定の好ましい実施形態では、本方法は、患者の生存時間を増加させる（例えば、6、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56ヶ月間またはそれよりも長い月数を超えて生存時間を増加させる）。一部の実施形態では、本方法は、患者の無再発生存時間を増加させる（例えば、6、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56ヶ月間またはそれよりも長い月数を超えて無再発生存時間を増加させる）。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。本開示に従った使用のための A c t R I I アンタゴニストは、例えば、本明細書に記載されているものなど、抗体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、A L K 4、アクチビンA、アクチビンB、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0 および B M P 9 のうち1つまたは複数の結合する抗体）、リガンドトラップ（例えば、可溶性 A c t R I I A ポリペプチド、A c t R I I B ポリペプチド、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体、フォリスタチンポリペプチドおよび F L R G ポリペプチド）、小分子（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、A L K 4、アクチビンA、アクチビンB、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、B M P 9、ならびに S m a d 2 および 3 などの1つまたは複数の S m a d タンパク質のうち1つまたは複数の小分子阻害剤）およびポリヌクレオチド（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、A L K 4、アクチビンA、アクチビンB、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、B M P 9、ならびに S m a d 2 および 3 などの1つまたは複数の S m a d タンパク質のうち1つまたは複数のポリヌクレオチド阻害剤）を含む様々な分子を含む。同様に、本開示に従った使用のための免疫療法剤は、例えば、抗体、小分子およびポリヌクレオチドを含む様々な分子を含む。一部の実施形態では、免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、免疫療法

剤は、P D 1 - P D L 1 アンタゴニスト（例えば、P D 1 または P D L 1 抗体）、C T L A 4 アンタゴニスト（例えば、C T L A 4 抗体）、C D 2 0 抗体、C D 5 2 抗体、インターフェロン（I F N - ガンマ）、インターロイキン（I L - 2）、C D 4 7 アンタゴニスト（例えば、C D 4 7 抗体）および G D 2 抗体のうち1つまたは複数である。一部の実施形態では、免疫療法剤は、イピリムマブ、リツキシマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、オカラツズマブ、オクレリズマブ、T R U - 0 1 5、ベルツズマブ、オフアツムマブ、アレムツズマブ、トレメリマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ビディリズマブ、B G B - A 3 1 7、アテゾリズマブ、アベルマブおよびデュルバルマブのうち1つまたは複数である。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、増加した P D L 1 発現に関連する。例えば、本開示の方法を使用して、 $\geq 1\%$ ($\geq 1\%$ 、 2% 、 3% 、 4% 、 5% 、 10% 、 15% 、 20% 、 25% 、 30% 、 40% 、 45% 、 50% またはそれを超える%の P D L 1 陽性腫瘍細胞)の P D L 1 腫瘍比率スコア (T P S)

10

20

30

40

50

を有するがんまたは腫瘍を処置することができる。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して、 $\geq 50\%$ のPD-L1腫瘍比率スコア(TPS)を有するがんまたは腫瘍を処置することができる。一部の実施形態では、患者は、化学療法剤で処置されている。一部の実施形態では、患者は、化学療法剤による処置の12ヶ月以内に(例えば、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2ヶ月以内に)疾患進行を有する。一部の実施形態では、化学療法剤は、白金に基づく化学療法剤である。一部の実施形態では、患者は、白金を含有する化学療法によるネオアジュバントまたはアジュバントで処置されている。例に示す通り、ActRIIA/B抗体およびPD1-PD-L1アンタゴニストを使用して、がんを相乗的に処置することができる。一部の実施形態では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIアンタゴニストおよび免疫療法剤を、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、ActRIIアンタゴニストの量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効である、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIアンタゴニストおよび免疫療法剤アンタゴニストを、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、免疫療法剤アンタゴニストの量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効である、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、がんまたは腫瘍を処置する方法であって、ActRIIアンタゴニストおよび免疫療法剤を、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、ActRIIアンタゴニストの量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効であり、免疫療法剤の量が、単独ではがんまたは腫瘍の処置において無効である、方法に関する。好ましくは、本開示に従って処置されるべき患者は、自己免疫疾患に罹っていない、臓器もしくは組織移植を経ているまたはこれを受けている、または移植片対宿主病に罹っていない。

【0009】

ある特定の態様では、本開示は、患者における免疫応答を誘導または増強する方法であって、ActRIIアンタゴニスト(例えば、ActRIIA/B抗体、またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ)および免疫療法剤(例えば、PD1-PD-L1アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤)を、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含み、ActRIIアンタゴニストおよび免疫療法剤が有効量で投与される、方法に関する。一部の態様では、本開示は、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者における免疫応答を誘導または増強するための免疫療法剤と組み合わせた使用のためのActRIIアンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者における免疫応答を誘導または増強するためのActRIIアンタゴニストと組み合わせた使用のための免疫療法剤に関する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんまたは腫瘍に対するものである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんまたは腫瘍の成長を阻害する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんまたは腫瘍転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または障害を有する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、内在性免疫応答である。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、T細胞免疫応答を含む。一部の実施形態では、患者は、白血病(例えば、急性リンパ芽球性白血病)、メラノーマ(例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ)、肺がん(例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺がん)、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫(例えば、転移性中皮腫)、頭頸部がん(例えば、頭頸部

10

20

30

40

50

扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、病原体に対するものである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における病原体による感染を処置する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における病原体による感染を予防する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、病原体は、細菌、ウイルス、真菌または寄生虫病原体からなる群から選択される。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、病原体を処置するために1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学的薬剤をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

10

20

【0010】

ある特定の態様では、本開示は、患者における免疫応答を誘導または増強する方法であって、有効量の少なくとも1つのAcctRIIアンタゴニスト（例えば、AcctRIIA／B抗体、またはAcctRIIA抗体およびAcctRIIB抗体の組合せ）を、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、免疫応答の誘導または増強を必要とする患者における免疫応答の誘導または増強における使用のためのAcctRIIアンタゴニストに関する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞の成長を阻害する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、患者における転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または障害を有する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、内在性免疫応答である。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、T細胞免疫応答を含む。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんを有する。一部の実施形態では、患者は、感染性疾患を有する。一部の実施形態では、患者は、抗原をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原である。一部の実施形態では、抗原は、感染性疾患抗原である。一部の実施

30

40

50

形態では、本方法は、抗原に対する患者の免疫化をもたらす。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、感染性疾患を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0011】

ある特定の態様では、本開示は、患者における免疫疲弊を処置または予防する方法であって、有効量のA c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）および免疫療法剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤）を、免疫疲弊を処置または予防することを必要とする患者に投与する工程を含み、A c t R I I アンタゴニストおよび免疫療法剤が有効量で投与される、方法に関する。一部の態様では、本開示は、免疫疲弊を処置または予防することを必要とする患者における免疫疲弊を処置または予防するための、免疫療法剤と組み合わせた使用のためのA c t R I I アンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、免疫疲弊を処置または予防することを必要とする患者における免疫疲弊を処置または予防するための、A c t R I I アンタゴニストと組み合わせた使用のための免疫療法剤に関する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、本方法の応答は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞の成長を阻害する。一部の実施形態では、本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、本方法は、患者における転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または障害を有する。一部の実施形態では、本方法は、内在性免疫応答を増加させる。一部の実施形態では、本方法は、T細胞免疫応答を増加させる。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺癌（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんを有する。一部の実施形態では、患者は、感染性疾患を有する。一部の実施形態では、患者は、抗原をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原である。一部の実施形態では、抗原は、感染性疾患抗原である。一部の実施形態では、本方法は、抗原に対する患者の免疫化をもたらす。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、感染性疾患を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0012】

ある特定の態様では、本開示は、患者における免疫疲弊を処置または予防する方法であって、有効量のA c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）を、免疫疲弊を処置または予防することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、免疫疲弊の処置または予防を必要とする患者における免疫疲弊の処置または予防における使用のためのA c t R I I アンタゴニストに関する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞の成長を阻害する。一部の実施形態では、本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、本方法は、患者における転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または障害を有する。一部の実施形態では、本方法は、内在性免疫応答を増加させる。一部の実施形態では、本方法は、T細胞免疫応答を増加させる。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんを有する。一部の実施形態では、患者は、感染性疾患を有する。一部の実施形態では、患者は、抗原をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原である。一部の実施形態では、抗原は、感染性疾患抗原である。一部の実施形態では、本方法は、抗原に対する患者の免疫化をもたらす。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、感染性疾患を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0013】

ある特定の態様では、本開示は、患者におけるがんまたは腫瘍に対する免疫応答を増強する方法であって、有効量のA c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）を、がんまたは腫瘍に対する免疫応答を増強することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは腫瘍に対する免疫応答を惹起または増強することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍に対する免疫応答を惹起または増強するためのA c t R I I アンタゴニストに関する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞の成長を阻害する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、患者における転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に

10

20

30

40

50

関連する疾患または障害を有する。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、内在性免疫応答である。一部の実施形態では、増強された免疫応答は、T細胞免疫応答を含む。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺癌（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんを有する。一部の実施形態では、患者は、抗原をさらに投与される。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原である。一部の実施形態では、本方法は、抗原に対する患者の免疫化をもたらす。一部の実施形態では、抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するための少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0014】

ある特定の態様では、本開示は、患者における抗原に対する免疫応答を誘導または増強する方法であって、有効量の：i) ActRIIアンタゴニスト（例えば、ActRIIA／B抗体、またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ）、ii) 免疫療法剤（例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤）およびiii) 抗原を、抗原に対する免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含み、ActRIIアンタゴニスト、免疫療法剤および抗原が有効量で投与される、方法に関する。一部の態様では、本開示は、抗原に対する免疫応答を増強するための、免疫療法剤と組み合わせた使用のためのActRIIアンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、抗原に対する免疫応答を増強するための、ActRIIアンタゴニスト（antagoinst）と組み合わせた使用のための免疫療法剤に関する。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原である。一部の実施形態では、抗原は、感染性疾患抗原である。一部の実施形態では、本方法は、抗原に対する患者の免疫化をもたらす。

【0015】

ある特定の態様では、本開示は、患者における抗原に対する免疫応答を増強する方法であって、有効量の：i) ActRIIアンタゴニスト（例えば、ActRIIA／B抗体、またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ）およびii) 抗原を、抗原に対する免疫応答を増強することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、抗原に対する免疫応答の増強における使用のためのActRIIアンタゴニストに関する。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、非内在性抗原である。一部の実施形態では、抗原は、がん抗原である。一部の実施形態では、抗原は、感染性疾患抗原である。一部の実施形態では、本方法は、抗原に対する患者の免疫化をもたらす。

【0016】

ある特定の態様では、本開示は、がんを処置する方法であって、有効量のActRIIアンタゴニスト（例えば、ActRIIA／B抗体、またはActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ）を、がんを処置することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、がんの処置を必要とする患者におけるがんの処置における使用のためのActRIIアンタゴニストに関する。一部の実施形態では、本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞の成長を阻害する。一部の実施形態では、

10

20

30

40

50

本方法は、患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、本方法は、患者における転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺がん）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんを有する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、少なくとも1つの追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0017】

ある特定の態様では、本開示は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種する方法であって、A c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）、免疫療法剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤）、およびがんまたは病原体抗原を、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種することを必要とする患者に投与する工程を含み、A c t R I I アンタゴニスト、免疫療法剤および抗原が、患者のワクチン接種に有効な量で投与される、方法に関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種するための、免疫療法剤と組み合わせた使用のためのA c t R I I アンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種するための、A c t R I I アンタゴニストと組み合わせた使用のための免疫療法剤に関する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍抗原は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺がん）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍に関連する。一部の実施形態では、病原体抗原は、細菌病原体、ウイルス病原体、真菌病原体または寄生虫病原体からなる群から選択される病原体に関連する。一部の実施形態では、がん抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、病原体抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、病原体を処置するために、1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学薬剤をさらに投与される。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学薬剤は、アレムツズマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、オファツムマブ（ofatumumab）、リツキシマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ（atezolizumab）、プログラム死リガンド1（P D - L 1）結合剤（例えば、P D - L 1 抗体）、C D 2 0 指向性細胞溶解性結合剤（例えば、C D - 2 0 抗体）、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（C T L A - 4）結合剤（例

10

20

30

40

50

例えば、C T L A - 4 抗体) およびプログラム死受容体 - 1 (P D - 1) 結合剤 (例えば、P D - 1 抗体) からなる群から選択される。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、T 細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、T 細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、T 細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または状態を有する。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【 0 0 1 8 】

ある特定の態様では、本開示は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種する方法であって、A c t R I I アンタゴニスト (例えば、A c t R I I A / B 抗体、または A c t R I I A 抗体および A c t R I I B 抗体の組合せ) およびがんまたは病原体抗原を、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種することを必要とする患者に投与する工程を含み、A c t R I I アンタゴニストおよび抗原が、患者のワクチン接種に有効な量で投与される、方法に関する。一部の態様では、本開示は、がんまたは病原体に対する患者のワクチン接種における使用のための A c t R I I アンタゴニストに関する。一部の実施形態では、がんまたは腫瘍抗原は、白血病 (例えば、急性リンパ芽球性白血病)、メラノーマ (例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ)、肺がん (例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌)、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫 (例えば、転移性中皮腫)、頭頸部がん (例えば、頭頸部扁平上皮がん)、食道がん、胃がん、結腸直腸がん (例えば、結腸直腸癌)、肝臓がん (例えば、肝細胞癌)、尿路上皮癌 (例えば、進行型または転移性尿路上皮癌)、リンパ腫 (例えば、古典的ホジキンリンパ腫)、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫 (例えば、転移性肉腫) からなる群から選択されるがんまたは腫瘍に関連する。一部の実施形態では、病原体抗原は、細菌病原体、ウイルス病原体、真菌病原体または寄生虫病原体からなる群から選択される病原体に関連する。一部の実施形態では、がん抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、病原体抗原は、ワクチン接種プロトコルに従って投与される。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、1 つまたは複数の追加的な活性剤および / または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、病原体を処置するために、1 つまたは複数の追加的な活性剤および / または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、1 つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学的薬剤をさらに投与される。一部の実施形態では、1 つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学薬剤は、アレムツズマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、オファツムマブ、リツキシマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ、プログラム死リガンド 1 (P D - L 1) 結合剤 (例えば、P D - L 1 抗体)、C D 2 0 指向性細胞溶解性結合剤 (例えば、C D - 2 0 抗体)、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (C T L A - 4) 結合剤 (例えば、C T L A - 4 抗体) およびプログラム死受容体 - 1 (P D - 1) 結合剤 (例えば、P D - 1 抗体) からなる群から選択される。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、T 細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、T 細胞疲弊を促進する。一部の

10

20

30

40

50

実施形態では、がんは、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または状態を有する。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0019】

ある特定の態様では、本開示は、患者におけるワクチンによって誘導される免疫応答を増強する方法であって、患者におけるワクチンによって誘導される免疫応答の増強に有効な量で、A c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）および免疫療法剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤）を患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、患者におけるワクチンによって誘導される免疫応答を増強するための、免疫療法剤と組み合わせた使用のためのA c t R I I アンタゴニストに関する。一部の態様では、本開示は、患者におけるワクチンによって誘導される免疫応答を増強するための、A c t R I I アンタゴニストと組み合わせた使用のための免疫療法剤に関する。一部の実施形態では、ワクチンは、がんワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンは、腫瘍ワクチンである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんの成長を阻害する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、腫瘍の成長を阻害する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者におけるがん細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がん転移を処置または予防する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、腫瘍転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺がん）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、ワクチンは、病原体ワクチンである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における病原体による感染を処置する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における病原体による感染を予防する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、病原体は、細菌、ウイルス、真菌または寄生虫病原体からなる群から選択される。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または状態を有する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、T細胞免疫応答を含

10

20

30

40

50

む。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、病原体を処置するために、1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学的薬剤をさらに投与される。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学薬剤は、アレムツズマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、オファツムマブ、リツキシマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ、プログラム死リガンド1（PD-L1）結合剤（例えば、PD-L1抗体）、CD20指向性細胞溶解性結合剤（例えば、CD-20抗体）、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）結合剤（例えば、CTLA-4抗体）およびプログラム死受容体-1（PD-1）結合剤（例えば、PD-1抗体）からなる群から選択される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

【0020】

ある特定の態様では、本開示は、患者における免疫応答を誘導または増強する方法であって、有効量のA c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B抗体、またはA c t R I I A抗体およびA c t R I I B抗体の組合せ）を、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含む方法に関する。一部の態様では、本開示は、免疫応答の誘導または増強を必要とする患者における免疫応答の誘導または増強における使用のためのA c t R I I アンタゴニストに関する。一部の実施形態では、患者は、がんを有する。一部の実施形態では、患者は、腫瘍を有する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんに対するものである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、腫瘍に対するものである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんの成長を阻害する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、腫瘍の成長を阻害する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者におけるがん細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における腫瘍細胞負荷を減少させる。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がん転移を処置または予防する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、腫瘍転移を処置または予防する。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、がんは、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、患者における免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、腫瘍は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、がんは、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、腫瘍は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、患者は、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺がん）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、病原体に対するものである。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における病原体による感染を処置する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、患者における病原体による感染を予防する。一部の実施形態では、病原体は、患者における免疫抑制を促進する。一部の実施形態では、病原体は、患者における

免疫細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、T細胞疲弊を促進する。一部の実施形態では、病原体は、免疫療法に対し応答性である。一部の実施形態では、病原体は、細菌、ウイルス、真菌または寄生虫病原体からなる群から選択される。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊を発症するリスクがある。一部の実施形態では、患者は、免疫疲弊に関連する疾患または状態を有する。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、T細胞免疫応答を含む。一部の実施形態では、惹起または増強された免疫応答は、がんまたは病原体に対して患者にワクチン接種する。一部の実施形態では、患者は、がんまたは腫瘍を処置するために、1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、病原体を処置するために、1つまたは複数の追加的な活性剤および／または支持療法をさらに投与される。一部の実施形態では、患者は、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学的薬剤をさらに投与される。一部の実施形態では、1つまたは複数の追加的な免疫腫瘍学薬剤は、アレムツズマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、オファツムマブ、リツキシマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ、プログラム死リガンド1 (PD-L1) 結合剤 (例えば、PD-L1抗体)、CD20指向性細胞溶解性結合剤 (例えば、CD-20抗体)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA-4) 結合剤 (例えば、CTLA-4抗体) およびプログラム死受容体-1 (PD-1) 結合剤 (例えば、PD-1抗体) からなる群から選択される。一部の実施形態では、患者は、自己免疫疾患に罹っていない。一部の実施形態では、患者は、組織もしくは臓器移植を経ていない、または組織もしくは臓器移植を受けたことがない。一部の実施形態では、患者は、移植片対宿主病に罹っていない。

10

20

【0021】

一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、ActRII受容体 (例えば、ActRIIAおよび／またはActRIIB受容体) および／またはALK4受容体を阻害、特に、下流シグナル伝達 (例えば、Smad1、2、3、5および／または8) を阻害することができる薬剤である。したがって、一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、1つまたは複数のActRIIおよび／またはALK4関連リガンド [例えば、GDF11、GDF8、アクチビン (アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC、アクチビンE)、BMP6、GDF3、BMP10および／またはBMP9] を阻害することができる薬剤である。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、ActRIIおよび／またはALK4シグナル伝達経路 (例えば、Smad1、2、3、5および／または8) の1つまたは複数の細胞内メディエーターを阻害することができる薬剤である。このようなActRIIアンタゴニスト薬剤は、例えば、リガンドトラップ [例えば、ActRII (ActRIIAまたはActRIIB) ポリペプチドまたはActRIIポリペプチドの組合せと共にその改変体 (例えば、GDFトラップポリペプチド) ; ALK4: ActRIIBヘテロ多量体; フォリスタチンポリペプチド; FLRGポリペプチド) ; 1つまたは複数のActRIIリガンド、ALK4受容体および／またはActRII受容体を阻害する抗体または抗体の組合せ (例えば、ActRIIA/B抗体) ; 1つまたは複数のActRIIリガンド、ALK4、ActRII受容体、および／またはActRIIおよび／またはALK4下流シグナル伝達構成成分 (例えば、Smad) を阻害するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せ; 1つまたは複数のActRIIリガンド、ALK4、ActRII受容体および／または、ActRIIおよび／またはALK4下流シグナル伝達構成成分 (例えば、Smad) を阻害する小分子または小分子の組合せ、ならびにこれらの組合せを含む。

30

40

【0022】

ある特定の態様では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべきActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともGDF11を阻害する薬剤である。GDF11阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ (例えば、Smadシグナル伝達レポーターアッセイ) を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示のGDF11アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともGDF11に結

50

合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ ）の K_D で、少なくとも $GDF11$ に結合する。

【0023】

ある特定の態様では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべき $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $GDF8$ を阻害する薬剤である。 $GDF8$ 阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ（例えば、 $Smad$ シグナル伝達レポーターアッセイ）を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示の $GDF8$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $GDF8$ に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ ）の K_D で、少なくとも $GDF8$ に結合する。

【0024】

ある特定の態様では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべき $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともアクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンABおよびアクチビンAE）を阻害する薬剤である。アクチビン阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ（例えば、 $Smad$ シグナル伝達レポーターアッセイ）を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示のアクチビンアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともアクチビンに結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ ）の K_D で、少なくともアクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンCおよび／またはアクチビンEに結合する。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ ）の K_D で、少なくともアクチビンBに結合する。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、実質的に、アクチビンAに結合しない（例えば、 $1 \times 10^{-7} M$ よりも高い K_D で、または相対的に弱い結合、例えば、約 $1 \times 10^{-8} M$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} M$ でアクチビンAに結合する）、および／またはアクチビンA活性を阻害しない。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともアクチビンBに結合する（例えば、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ の K_D で結合する）が、実質的に、アクチビンAに結合しない（例えば、 $1 \times 10^{-7} M$ よりも高い K_D で、または相対的に弱い結合、例えば、約 $1 \times 10^{-8} M$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} M$ でアクチビンAに結合する）、および／またはアクチビンA活性を阻害しない。一部の実施形態では、本開示の $ActRII$ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、実質的に、アクチビンBに結合しない（例えば、 $1 \times 10^{-7} M$ よりも

10

20

30

40

50

高い K_D で、アクチビンBに結合する、または相対的に弱い結合、例えば、約 $1 \times 10^{-8} M$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} M$ を有する)、および／またはアクチビンB活性を阻害しない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともアクチビンAに結合する(例えば、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ の K_D で結合する)が、実質的に、アクチビンBに結合しない(例えば、 $1 \times 10^{-7} M$ よりも高い K_D で、または相対的に弱い結合、例えば、約 $1 \times 10^{-8} M$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} M$ でアクチビンAに結合する)、および／またはアクチビンB活性を阻害しない。

【0025】

ある特定の態様では、本明細書に記載されている方法および使用に従って使用されるべきActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともBMP6を阻害する薬剤である。BMP6阻害における効果は、例えば、本明細書に記載されているアッセイ(例えば、Smadシグナル伝達レポーターアッセイ)を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示のBMP6アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともBMP6に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ (例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$)の K_D で、少なくともBMP6に結合する。

【0026】

ある特定の態様では、本明細書に記載されている方法および使用に従って使用されるべきActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともGDF3を阻害する薬剤である。GDF3阻害における効果は、例えば、本明細書に記載されているアッセイ(例えば、Smadシグナル伝達レポーターアッセイ)を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示のGDF3アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともGDF3に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ (例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$)の K_D で、少なくともGDF3に結合する。

【0027】

ある特定の態様では、本明細書に記載されている方法および使用に従って使用されるべきActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともBMP9を阻害する薬剤である。BMP9阻害における効果は、例えば、本明細書に記載されているアッセイ(例えば、Smadシグナル伝達レポーターアッセイ)を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示のBMP9アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともBMP9に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ (例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} M$)の K_D で、少なくともBMP9に結合する。

【0028】

ある特定の態様では、本明細書に記載されている方法および使用に従って使用されるべき

10

20

30

40

50

A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも B M P 1 0 を阻害する薬剤である。B M P 1 0 阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ（例えば、S m a d シグナル伝達レポーターアッセイ）を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示の B M P 1 0 アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも B M P 1 0 に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示の A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ ）の K_D で、少なくとも B M P 1 0 に結合する。

10

【0029】

ある特定の態様では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべき A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも A c t R I I A を阻害する薬剤である。A c t R I I A 阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ（例えば、S m a d シグナル伝達レポーターアッセイ）を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示の A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも A c t R I I A に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示の A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ ）の K_D で、少なくとも A c t R I I A に結合する。一部の実施形態では、A c t R I I A に結合するおよび／またはこれを阻害する A c t R I I アンタゴニストは、A c t R I I B にさらに結合するおよび／またはこれを阻害することができる（例えば、A c t R I I A / B 抗体）。

20

【0030】

ある特定の態様では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべき A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも A c t R I I B を阻害する薬剤である。A c t R I I B 阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ（例えば、S m a d シグナル伝達レポーターアッセイ）を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示の A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも A c t R I I B に結合することができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示の A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ （例えば、少なくとも $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ または少なくとも $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ ）の K_D で、少なくとも A c t R I I B に結合する。一部の実施形態では、A c t R I I B に結合するおよび／またはこれを阻害する A c t R I I アンタゴニストは、A c t R I I A にさらに結合するおよび／またはこれを阻害することができる（例えば、A c t R I I A / B 抗体）。

30

40

【0031】

ある特定の態様では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべき A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも A L K 4 を阻害する薬剤である。A L K 4 阻害における効果は、例えば、本明細書で記載されているアッセイ（例えば、S m a d シグナル伝達レポーターアッセイ）を含む、細胞に基づくアッセイを使用して決定することができる。したがって、一部の実施形態では、本開示の A c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも A L K 4 に結合す

50

ることができる。リガンド結合活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイを含む、結合アフィニティアッセイを例えば使用して決定することができる。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} Mまたは少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくともA L K 4に結合する。

【0032】

ある特定の態様では、本開示は、A c t R I I ポリペプチドおよびその使用を含む組成物に関する。「A c t R I I ポリペプチド」という用語は、本明細書で記載されているもの（例えば、G D F トラップポリペプチド）など、自然発生のA c t R I I AおよびA c t R I I Bポリペプチドならびにこれらの切断型および改変体をまとめて指す。好ましくは、A c t R I I ポリペプチドは、A c t R I I ポリペプチドのリガンド結合性ドメインまたはその修飾（改変体）形態を含む、から本質的になる、またはからなる。例えば、一部の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、A c t R I I AポリペプチドのA c t R I I Aリガンド結合性ドメイン、例えば、A c t R I I A細胞外ドメインの部分を含む、から本質的になる、またはからなる。同様に、A c t R I I Bポリペプチドは、A c t R I I BポリペプチドのA c t R I I Bリガンド結合性ドメイン、例えば、A c t R I I B細胞外ドメインの部分を含む、から本質的になる、またはからなることができる。好ましくは、本明細書で記載されている方法に従って使用されるべきA c t R I I ポリペプチドは、可溶性ポリペプチドである。

【0033】

ある特定の態様では、本開示は、A c t R I I Aポリペプチド、これを含む組成物、およびそれらの使用に関する。例えば、一部の実施形態では、本開示のA c t R I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸30～110の配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなる。他の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。他の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。なお他の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号54のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号57のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。

【0034】

他の態様では、本開示は、A c t R I I Bポリペプチドを含む組成物およびその使用に関

する。例えば、一部の実施形態では、本開示の A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 29～109 の配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなる。一部の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 29～109 の配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 に関して 79 位に酸性アミノ酸 [自然発生の (E もしくは D) または人工の酸性アミノ酸] を含む。他の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 25～131 の配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 25～131 の配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 に関して 79 位に酸性アミノ酸を含む。他の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 に関して 79 位に酸性アミノ酸を含む。なお他の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができる。他の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 に関して 79 位に酸性アミノ酸を含む。さらに他の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができる。他では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 1 に関して 79 位に酸性アミノ酸を含む。他の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I B ポリペプチドは、配列番号 4 に関して 79 位に酸性アミノ酸を含む。他の実施形態では、

10

20

30

40

50

A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号4に関して79位に酸性アミノ酸を含む。他の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号4に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号58のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号58のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号60のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号63のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号63のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号64のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号64のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。他では、A c t R I I Bポリペプチドは、配列番号65のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%

10

20

30

40

50

20

50

%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号128のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、ActRIIBポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号131のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号131のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、ActRIIBポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号132のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号132のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、ActRIIBポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。さらになお他の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号135のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号133のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができ、ActRIIBポリペプチドは、配列番号1に関して79位に酸性アミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で記載されている方法および使用に従って使用されるべきActRIIBポリペプチドは、配列番号1のL79に対応する位置に酸性アミノ酸を含まない。

【0035】

他の態様では、本開示は、GDFトラップポリペプチドを含む組成物およびその使用に関する。一部の実施形態では、変更されたActRIIリガンド結合性ドメインを含む、から本質的になる、またはからなるGDFトラップは、野生型リガンド結合性ドメインに対する比と比べて少なくとも2、5、10、20、50、100またはさらには1000倍大きい、アクチビンA結合に関する K_d の、GDF11および／またはGDF8結合に関する K_d に対する比を有する。任意選択で、変更されたリガンド結合性ドメインを含むGDFトラップは、野生型ActRIIリガンド結合性ドメインと比べて少なくとも2、5、10、20、25、50、100またはさらには1000倍大きい、アクチビンA阻害に関するIC₅₀の、GDF11および／またはGDF8阻害に関するIC₅₀に対する比を有する。任意選択で、変更されたリガンド結合性ドメインを含むGDFトラップは、アクチビンA阻害に関するIC₅₀よりも少なくとも2、5、10、20、50またはさらには100倍少ないIC₅₀で、GDF11および／またはGDF8を阻害する。このようなGDFトラップは、免疫グロブリンFcドメイン（野生型または変異体のいずれか）を含む融合タンパク質となることができる。ある特定の事例では、対象可溶性GDFトラップは、GDF8および／またはGDF11媒介性細胞内シグナル伝達（例えば、Sm

10

20

30

40

50

a d 2 / 3 シグナル伝達) のアンタゴニスト (阻害剤) である。

【0036】

一部の実施形態では、本開示は、変更されたリガンド結合性 (例えば、G D F 1 1 結合性) ドメインを含む可溶性 A c t R I I B ポリペプチドである G D F トラップを提供する。変更されたリガンド結合性ドメインを有する G D F トラップは、例えば、ヒト A c t R I I B の E 3 7、E 3 9、R 4 0、K 5 5、R 5 6、Y 6 0、A 6 4、K 7 4、W 7 8、L 7 9、D 8 0、F 8 2 および F 1 0 1 (ナンバリングは、配列番号 1 と比べてである) などのアミノ酸残基に 1 つまたは複数の変異を含むことができる。任意選択で、変更されたリガンド結合性ドメインは、A c t R I I B 受容体の野生型リガンド結合性ドメインと比べて、G D F 8 / G D F 1 1 などのリガンドに対し増加した選択性を有することができる。説明するために、これらの変異は、アクチビンよりも、G D F 1 1 (およびしたがって、おそらく G D F 8) に対する変更されたリガンド結合性ドメインの選択性を増加することが本明細書で実証される: K 7 4 Y、K 7 4 F、K 7 4 I、L 7 9 D、L 7 9 E および D 8 0 I。次の変異は、逆効果を有し、G D F 1 1 よりもアクチビン結合の比を増加させる: D 5 4 A、K 5 5 A、L 7 9 A および F 8 2 A。全体的な (G D F 1 1 およびアクチビン) 結合活性は、「テール」領域またはおそらく、不定形リンカー領域の包含によって、また、K 7 4 A 変異の使用によって増加され得る。リガンド結合アフィニティの全体的な減少を引き起こした他の変異は、R 4 0 A、E 3 7 A、R 5 6 A、W 7 8 A、D 8 0 K、D 8 0 R、D 8 0 A、D 8 0 G、D 8 0 F、D 8 0 M および D 8 0 N を含む。変異を組み合わせて、所望の効果を達成することができる。例えば、G D F 1 1 : アクチビン結合の比に影響を与える変異の多くは、リガンド結合に全体的なマイナス効果を有し、したがって、これらは、リガンド結合を一般に増加させる変異と組み合わせて、リガンド選択性を有する改善された結合タンパク質を産生することができる。例示的な実施形態では、G D F トラップは、追加的なアミノ酸置換、付加または欠失と任意選択で組み合わせた、L 7 9 D または L 7 9 E 変異を含む A c t R I I B ポリペプチドである。

【0037】

本明細書で記載されている通り、A c t R I I ポリペプチドおよびその改変体 (G D F トラップ) は、ホモ多量体、例えば、ホモ二量体、ホモ三量体、ホモ四量体、ホモ五量体およびより高次のホモ多量体複合体となることができる。ある特定の好ましい実施形態では、A c t R I I ポリペプチドおよびその改変体は、ホモ二量体である。ある特定の実施形態では、本明細書で記載されている A c t R I I ポリペプチド二量体は、第 2 の A c t R I I 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 A c t R I I ポリペプチドを含み、第 1 のポリペプチドは、A c t R I I ドメインおよび相互作用ペアの第 1 のメンバー (または第 2 のメンバー) (例えば、免疫グロブリンの定常ドメイン) のアミノ酸配列を含み、第 2 のポリペプチドは、A c t R I I ポリペプチドおよび相互作用ペアの第 2 のメンバー (または第 1 のメンバー) のアミノ酸配列を含む。

【0038】

ある特定の態様では、その改変体を含む A c t R I I ポリペプチド (例えば、G D F トラップ) は、融合タンパク質となることができる。例えば、一部の実施形態では、A c t R I I ポリペプチドは、A c t R I I ポリペプチドドメインおよび 1 つまたは複数の異種 (非 A c t R I I) ポリペプチドドメインを含む融合タンパク質となることができる。一部の実施形態では、A c t R I I ポリペプチドは、1 つのドメインとして、A c t R I I ポリペプチドに由来するアミノ酸配列 (例えば、A c t R I I 受容体のリガンド結合性ドメインまたはその改変体)、および改善された薬物動態、より容易な精製、特定の組織への標的化などの所望される特性をもたらす 1 つまたは複数の異種ドメインを有する融合タンパク質となることができる。例えば、融合タンパク質のドメインは、i n v i v o 安定性、i n v i v o 半減期、取り込み / 投与、組織局在もしくは分布、タンパク質複合体の形成、融合タンパク質の多量体化、および / または精製のうち 1 つまたは複数のを増強することができる。任意選択で、融合タンパク質の A c t R I I ポリペプチドドメインは、1 つまたは複数の異種ポリペプチドドメインに直接的に接続される (融合される)、また

はリンカーなどの介在配列が、A c t R I I ポリペプチドのアミノ酸配列および1つまたは複数の異種ドメインのアミノ酸配列の間に位置することができる。ある特定の実施形態では、A c t R I I 融合タンパク質は、異種ドメインおよびA c t R I I ドメインの間に位置する相対的に不定形なリンカーを含む。この不定形リンカーは、A c t R I I A もしくはA c t R I I B の細胞外ドメイン（「テール」）のC末端側におけるおよそ4～15アミノ酸不定形領域に対応することができる、または相対的に二次構造がない3～15、20、30、50またはそれよりも多いアミノ酸の間の人工配列となることができる。リンカーは、グリシンおよびプロリン残基リッチとなることができ、例えば、スレオニン／セリンおよびグリシンの反復配列を含有することができる。リンカーの例として、T G G G（配列番号31）、S G G G（配列番号32）、T G G G G（配列番号29）、S G G G G（配列番号30）、G G G G S（配列番号33）、G G G G（配列番号28）およびG G G（配列番号27）の配列が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、A c t R I I 融合タンパク質は、例えば、免疫グロブリンのF c 部分を含む、免疫グロブリンの定常ドメインを含むことができる。例えば、I g G（I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4）、I g A（I g A 1またはI g A 2）、I g EまたはI g M 免疫グロブリンのF c ドメインに由来するアミノ酸配列。例えば、免疫グロブリンドメインのF c 部分は、配列番号22～26のいずれか1つと少なくともとも70%、75%、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、から本質的になる、またはからなることができる。このような免疫グロブリンドメインは、変更されたF c 活性、例えば、1つまたは複数のF c エフェクター機能の減少を付与する、1つまたは複数のアミノ酸修飾（例えば、欠失、付加および／または置換）を含むことができる。一部の実施形態では、A c t R I I 融合タンパク質は、式A-B-Cに表記されるアミノ酸配列を含む。例えば、B部分は、本明細書で記載されている通り、NおよびC末端で切断されたA c t R I I ポリペプチドである。AおよびC部分は、独立して、0、1つまたは2つ以上のアミノ酸となることができ、AおよびC部分の両方は、Bにとって異種である。Aおよび／またはC部分は、リンカー配列を介してB部分に接合することができる。ある特定の実施形態では、A c t R I I 融合タンパク質は、リーダー配列を含む。リーダー配列は、ネイティブA c t R I I リーダー配列（例えば、ネイティブA c t R I I A またはA c t R I I B リーダー配列）または異種リーダー配列となることができる。ある特定の実施形態では、リーダー配列は、組織プラスミノゲンアクチベーター（T P A）リーダー配列である。

【0039】

本明細書で記載されている通り、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体タンパク質複合体が、対応するA c t R I I B およびA L K 4 ホモ二量体と比較して、異なるリガンド結合プロファイル／選択性を有することが発見された。特に、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体は、いずれかのホモ二量体と比較して、アクチビンBへの増強された結合を呈し、A c t R I I B ホモ二量体により観察される通りアクチビンA、G D F 8 およびG D F 1 1 への強い結合を保持し、B M P 9、B M P 1 0 およびG D F 3 への実質的に低減した結合を示す。特に、B M P 9 は、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体に対し弱く観察可能から観察不能なアフィニティを呈する一方、このリガンドは、A c t R I I B ホモ二量体に強く結合する。A c t R I I B ホモ二量体と同様に、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体は、B M P 6 への中間レベル結合を保持する。図19を参照されたい。したがって、これらの結果は、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体が、A c t R I I B ホモ二量体と比較して、アクチビンA、アクチビンB、G D F 8 およびG D F 1 1 のより選択的なアンタゴニスト（阻害剤）であることを実証する。したがって、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体は、このような選択的アンタゴニズムが有利となるある特定の適用において、A c t R I I B ホモ二量体よりも有用になるであろう。その例として、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンA B、アクチビンA C）、G D F 8 およびG D F 1 1 のうち1つまたは複数のアンタゴニズムを保持するが、B M P 9、B M P 1 0 およびG D F 3 のうち1つまたは複数のアンタゴニズムを最小化することが所

10

20

30

40

50

望される治療適用が挙げられる。さらに、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ二量体は、患者におけるがんを処置することが示された。したがって、本開示は、一部には、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ二量体およびその使用に関する。特定の作用機構に束縛されることは望まないが、アクチビン（例えば、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン A B およびアクチビン A C）、G D F 8 および／または G D F 1 1 のうち少なくとも 1 つまたは複数に結合する A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体と共にその改変体が、がん患者における有益な効果の促進に有用な薬剤となるであろうことが予測される。

【0040】

したがって、本開示は、少なくとも 1 つの A L K 4 ポリペプチドおよび少なくとも 1 つの A c t R I I B ポリペプチド（A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体）を含むヘテロ多量体複合体（ヘテロ多量体）、ならびにその使用を提供する。好ましくは、A L K 4 ポリペプチドは、A L K 4 受容体のリガンド結合性ドメイン、例えば、A L K 4 細胞外ドメインの部分を含む。同様に、A c t R I I B ポリペプチドは一般に、A c t R I I B 受容体のリガンド結合性ドメイン、例えば、A c t R I I B 細胞外ドメインの部分を含む。好ましくは、このような A L K 4 および A c t R I I B ポリペプチドならびにそれらの結果としてのヘテロ多量体は、可溶性である。

【0041】

ある特定の態様では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 4 のアミノ酸 2 4 ~ 3 4 のいずれか 1 つから始まり、配列番号 1 4 のアミノ酸 1 0 1 ~ 1 2 6 のいずれか 1 つで終結するポリペプチドと少なくとも 7 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなる。例えば、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 4 のアミノ酸 3 4 ~ 1 0 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、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、から本質的になる、またはからなることができる。他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 5 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 9 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 4 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 6 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 9 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 8 0 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号

10

20

30

40

50

143と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号145と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。

【0042】

ある特定の態様では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号1のアミノ酸20～29のいずれか1つから始まり、配列番号1のアミノ酸25～131のいずれか1つで終結するポリペプチドと少なくとも70%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなる。例えば、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号1のアミノ酸29～109と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、またはから本質的になる、またはからなることができる。他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号2と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらに他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号3と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。なお他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号5と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号6と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号58と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号60と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号63と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、ALK4：ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号66と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるActRIIBアミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることがで

10

20

30

40

50

きる。さらになお他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 3 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 7 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 7 8 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 3 9 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。さらになお他の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 4 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなることができる。ある特定の好ましい実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 の L 7 9 に対応する位置に酸性アミノ酸（例えば、E または D）を含む A c t R I I B ポリペプチドを含まない。

【0043】

本明細書で記載されている A L K 4 および A c t R I I B ポリペプチドの様々な組合せも、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体に関して想定される。例えば、ある特定の態様では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、a) 配列番号 1 4 のアミノ酸 3 4 ~ 1 0 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；および b) 配列番号 1 のアミノ酸 2 9 ~ 1 0 9 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。さらなる態様では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、a) 配列番号 1 4 のアミノ酸 3 4 ~ 1 0 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A L K 4 アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；および b) 配列番号 1 のアミノ酸 2 5 ~ 1 3 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である A c t R I I B アミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。ある特定の態様では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、a) 配列番号 1 4 のアミノ酸 3 4 ~ 1 0 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %

2%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号1のアミノ酸20～134と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるAc t R I I Bアミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。他の態様では、ALK4：Ac t R I I Bヘテロ多量体は、a) 配列番号15と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号2と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるAc t R I I Bアミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。なお他の態様では、ALK4：Ac t R I I Bヘテロ多量体は、a) 配列番号15と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号3と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるAc t R I I Bアミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。さらに他の態様では、ALK4：Ac t R I I Bヘテロ多量体は、a) 配列番号15と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号5と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるAc t R I I Bアミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。さらになお他の態様では、ALK4：Ac t R I I Bヘテロ多量体は、a) 配列番号15と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるALK4アミノ酸配列を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号6と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるAc t R I I Bアミノ酸配列を含むまたはから本質的になる、またはからなるポリペプチドを含むことができる。

【0044】

本明細書で記載されている通り、ALK4：Ac t R I I Bヘテロ多量体構造は、例えば、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体、ヘテロ五量体およびより高次のヘテロ多量体複合体を含む。例えば、図21～23を参照されたい。ある特定の好ましい実施形態では、ALK4：Ac t R I I Bヘテロ多量体は、ヘテロ二量体である。ある特定の態様では、ALK4および／またはAc t R I I Bポリペプチドは、融合タンパク質となることができる。

【0045】

ある特定の態様では、ALK4および／またはAc t R I I Bポリペプチドは融合タンパク質であり得る。例えば、一部の実施形態では、ALK4ポリペプチドは、ALK4ポリペプチドドメインおよび1つまたは複数の異種（非ALK4）ポリペプチドドメインを含む融合タンパク質であり得る。同様に、一部の実施形態では、Ac t R I I Bポリペプチ

10

20

30

40

50

ドは、A c t R I I B ポリペプチドドメインおよび1つまたは複数の異種（非A c t R I I B）ポリペプチドドメインを含む融合タンパク質であり得る。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書で記載されているA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、A c t R I I B 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A L K 4 ポリペプチドを含み、A L K 4 ポリペプチドは、A L K 4 ドメインおよび相互作用ペアの第1のメンバー（または第2のメンバー）のアミノ酸配列を含み、A c t R I I B ポリペプチドは、A c t R I I B ポリペプチドおよび相互作用ペアの第2のメンバー（または第1のメンバー）のアミノ酸配列を含む。任意選択で、このようなA L K 4 ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバー（または第2のメンバー）に直接的に接続される（融合される）、またはリンカーなどの介在配列が、A L K 4 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（または第2のメンバー）のアミノ酸配列の間に位置することができる。同様に、A c t R I I B ポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバー（または第1のメンバー）に直接的に接続（融合）することができる、またはリンカーなどの介在配列が、A c t R I I B ポリペプチドのアミノ酸配列および相互作用ペアの第2のメンバー（または第1のメンバー）のアミノ酸配列の間に位置することができる。リンカーの例として、T G G G（配列番号31）、S G G G（配列番号32）、T G G G G（配列番号29）、S G G G G（配列番号30）、G G G G S（配列番号33）、G G G G（配列番号28）およびG G G（配列番号27）の配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】

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。例えば、図21～23を参照。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、ホモ二量体の配列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（すなわち、誘導型相互作用ペア）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、非誘導型であってもよく、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、非誘導型相互作用ペアの第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、非対称ペアまたは非誘導型相互作用ペア）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、非対称ペアまたは非誘導型相互作用ペア）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。任意選択で、相互作用作用ペア（例えば、非対称ペアまたは非誘導相互作用ペア）の第1のメンバーは、と共有結合的および非共有結合的両方の機を介して相互作用ペアの第2のメンバーに会合する。

【0047】

伝統的なF c融合タンパク質および抗体は、非誘導型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[Spiesら(2015)、Molecular Immunology 67(2A):95-106]。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F c部分を含む、免疫グロブリンの定常ドメインを含み得る。例えば、相互作用ペアの第1のメンバーは、I g G（I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4）、I g A（I g A 1またはI g A 2）、I g EまたはI g M免疫グロブリンのF cドメインに由来するアミノ酸配列を含み得る。そのような免疫グロブリンドメインは、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体形成を促進する1つまたは複数のアミノ酸改変（例えば、欠失、付加および／または置換）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22～26のいずれか1つと少なくとも70%

、75%、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んでもよいし、から本質的になってもよいし、からなってもよい。同様に、相互作用ペアの第2のメンバーは、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4)、IgA (IgA1またはIgA2)、IgE、またはIgMのFcドメインに由来するアミノ酸配列を含み得る。そのような免疫グロブリンドメインは、ALK4: ActRIIBヘテロ多量体形成を促進する1つまたは複数のアミノ酸改変 (例えば、欠失、付加、および/または置換) 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22~26のいずれか1つと少なくとも70%、75%、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んでもよいし、から本質的になってもよいし、からなってもよい。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、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。別の実施形態では、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。一部の実施形態では、ALK4: ActRIIBヘテロ二量体は、i) 配列番号76と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるALK4ポリペプチド、およびii) 配列番号73と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるActRIIBポリペプチドを含む。他の実施形態では、ALK4: ActRIIBヘテロ二量体は、i) 配列番号80と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるALK4ポリペプチド、およびii) 配列番号78と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるActRIIBポリペプチドを含む。他の実施形態では、ALK4: ActRIIBヘテロ二量体は、i) 配列番号139と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるALK4ポリペプチド、およびii) 配列番号143と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるActRIIBポリペプチドを含む。他の実施形態では、ALK4: ActRIIBヘテロ二量体は、i) 配列番号141と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるALK4ポリペプチド、およびii) 配列番号145と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなるActRIIBポリペプチドを含む。

【0048】

ある特定の態様では、ALK4: ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号71と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100

10

20

30

40

50

%同一であるA c t R I I Bアミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなる。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I Bヘテロ多量体は、配列番号73と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるA c t R I I Bアミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなる。ある特定の態様では、A L K 4 : A c t R I I Bヘテロ多量体は、配列番号74と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるA L K 4アミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなる。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I Bヘテロ多量体は、配列番号76と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるA L K 4アミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号73と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるA c t R I I Bアミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなるポリペプチドを含み得る。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I Bヘテロ多量体は、a) 配列番号80と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるA L K 4アミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなるポリペプチド；およびb) 配列番号78と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるA c t R I I Bアミノ酸配列を含むか、から本質的になるか、またはからなるポリペプチドを含み得る。

【0049】

A L K 4 : A c t R I I Bヘテロ多量体 (heteromultimer) のA L K 4および／またはA c t R I I Bポリペプチドは、1つのドメインとして、A L K 4またはA c t R I I Bに由来するアミノ酸配列 (例えば、A c t R I I BもしくはA L K 4またはその改変体のリガンド結合性ドメイン)、および改善された薬物動態、より容易な精製、特定の組織への標的化などの所望される特性をもたらす1つまたは複数の追加的なドメインを有する融合タンパク質となることができる。例えば、融合タンパク質のドメインは、i n v i v o安定性、i n v i v o半減期、取り込み／投与、組織局在もしくは分布、タンパク質複合体の形成、融合タンパク質の多量体化、および／または精製のうち1つまたは複数を増強することができる。

【0050】

その改変体 (例えば、G D Fトラップ) を含むA c t R I Iポリペプチドおよび／またはその改変体を含むA L K 4ポリペプチドは、エピトープタグ、F L A Gタグ、ポリヒスチジン配列およびG S T融合体など、精製部分配列を含むことができる。任意選択で、A c t R I Iポリペプチドおよび／またはA L K 4ポリペプチドは、グリコシル化されたアミノ酸、ペグ化されたアミノ酸、ファルネシル化されたアミノ酸、アセチル化されたアミノ酸、ビオチン化されたアミノ酸、脂質部分にコンジュゲートされたアミノ酸、および有機誘導体化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択される、1つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基を含む。A c t R I Iポリペプチドおよび／またはA L K 4ポリペプチド

は、少なくとも1つのN結合型糖を含むことができ、2つ、3つまたはそれよりも多いN結合型糖を含むことができる。このようなポリペプチドは、O結合型糖を含むこともできる。一般に、A c t R I I アンタゴニストポリペプチドおよび／またはA L K 4 アンタゴニストポリペプチドが、患者における好ましくない免疫応答の見込みを縮小することができるように、ポリペプチドの天然グリコシル化を適切に媒介する哺乳動物細胞系において発現されることが好ましい。A c t R I I ポリペプチドおよびA L K ポリペプチドは、操作された昆虫または酵母細胞、ならびにC O S細胞、C H O細胞、H E K細胞およびN S O細胞などの哺乳動物細胞を含む、患者使用に適した形でタンパク質をグリコシル化する種々の細胞系において産生させることができる。一部の実施形態では、A c t R I I ポリペプチドおよび／またはA L K 4 ポリペプチドは、グリコシル化され、チャイニーズハムスター卵巣細胞系から得ることができるグリコシル化パターンを有する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I ポリペプチドおよび／またはA L K 4 ポリペプチドは、哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）において少なくとも4、6、12、24、36、48または72時間の血清半減期を示す。任意選択で、A c t R I I ポリペプチドおよび／またはA L K 4 ポリペプチドは、哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）において少なくとも6、8、10、12、14、20、25または30日間の血清半減期を示すことができる。

【0051】

ある特定の態様では、本開示は、1つまたは複数の本開示のA c t R I I アンタゴニストと、薬学的に許容される担体とを含む医薬調製物を提供する。医薬調製物は、本明細書で記載されている通りの障害または状態〔例えば、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺癌（例えば、転移性および非転移性小細胞肺癌、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺癌）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膀胱がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）〕の処置または予防に使用される化合物など、1つまたは複数の追加的な活性剤を含むこともできる。

【0052】

本明細書で記載されているA c t R I I アンタゴニストのいずれかを医薬調製物（組成物）として製剤化することができる。一部の実施形態では、医薬調製物は、薬学的に許容される担体を含む。医薬調製物は、好ましくは、発熱物質非含有（治療的使用のための製品の品質を統制する法規により要請される程度に発熱物質非含有であることを意味する）であることが好ましいであろう。医薬調製物は、本明細書で記載されている障害／状態の処置に使用される化合物など、1つまたは複数の追加的な化合物を含むこともできる。一般に、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体医薬調製物は、A L K 4 および／またはA c t R I I B ホモ多量体を実質的に含まない。例えば、一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体医薬調製物は、約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満または約1%未満のA L K 4 ホモ多量体を含む。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体医薬調製物は、約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満または約1%未満のA c t R I I B ホモ多量体を含む。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体医薬調製物は、約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満または約1%未満のA L K 4 およびA c t R I I B ホモ多量体を含む。

【0053】

ある特定の態様では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、A c t R I I リガンド、A c t R I I 受容体（例えば、A c t R I I A および／またはA c t R I I B）およびA L K 4 のうち1つまたは複数の阻害する抗体または抗体の組合せである。ある特定の好ま

10

20

30

40

50

しい実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、A c t R I I A および A c t R I I B に結合する抗体または抗体の組合せである。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともG D F 1 1 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAE）、B M P 6、G D F 3、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともG D F 8 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAE）、B M P 6、G D F 3、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の
10 実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともアクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC および / またはアクチビンE）に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、G D F 8、B M P 6、G D F 3、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 6 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、
20 アクチビンAB、アクチビンAE）、G D F 3、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともG D F 3 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAE）、B M P 6、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 9 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、A E）、B M P 6、G D F 3 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 1 0 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、
30 G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAE）、B M P 6、G D F 3 および B M P 9 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともA L K 4 に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAE）、B M P 6、G D F 3、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、少なくともA c t R I I （例えば、A c t R I I A および / またはA c t R I I B）に結合する抗体または抗体の組合せであり、任意選択で、
40 G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAE）、B M P 6、G D F 3、B M P 9 および B M P 1 0 のうち1つまたは複数にさらに結合する。一部の実施形態では、本開示の抗体は、多特異性抗体である。一部の実施形態では、本開示の抗体は、二特異性抗体である。

【0054】

ある特定の実例では、本明細書で記載されている障害または状態に対し本開示のA c t R I I アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せを投与する場合、赤血球細胞における望まれない効果を低減するために、A c t R I I アンタゴニストの投与の際に赤血球細胞における効果をモニタリングすること、またはA c t R I I アンタゴニストの投薬を決定または調整することが所望され得る。例えば、赤血球細胞レベル、ヘモグロビンレベルま
50

たはヘマトクリットレベルの増加は、血圧の所望されない増加を引き起こすであろう。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

がんまたは腫瘍を処置する方法であって、

a. A c t R I I A および A c t R I I B に結合する抗体 (A c t R I I A / B 抗体)、および

b. P D 1 - P D L 1 アンタゴニスト

を、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、

前記 A c t R I I A / B 抗体および P D 1 - P D L 1 アンタゴニストが有効量で投与される、方法。

(項目2)

前記 P D 1 - P D L 1 アンタゴニストが、P D 1 抗体である、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記 P D 1 抗体が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブおよび B G B - A 3 1 7 からなる群から選択される、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記 P D 1 - P D L 1 アンタゴニストが、P D L 1 抗体である、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記 P D L 1 抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブおよびデュルバルマブからなる群から選択される、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記がんまたは腫瘍が、増加した P D L 1 発現に関連する、項目1から5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記がんまたは腫瘍が、 $\geq 1\%$ の P D L 1 腫瘍比率スコア (T P S) を有する、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記がんまたは腫瘍が、 $\geq 50\%$ の P D L 1 腫瘍比率スコア (T P S) を有する、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

がんまたは腫瘍を処置する方法であって、

a. A c t R I I A / B 抗体、または A c t R I I A 抗体および A c t R I I B 抗体の組合せ、ならびに

b. 前記がんまたは腫瘍を処置するための追加的な活性剤または支持療法

を、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、

前記 A c t R I I A / B 抗体または A c t R I I A 抗体および A c t R I I B 抗体の組合せならびに追加的な活性剤が有効量で投与される、方法。

(項目10)

がんまたは腫瘍を処置する方法であって、

a. A c t R I I アンタゴニスト、および

b. 前記がんまたは腫瘍を処置するための追加的な活性剤または支持療法

を、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者に投与する工程を含み、

前記 A c t R I I アンタゴニストおよび追加的な活性剤が有効量で投与される、方法。

(項目11)

前記追加的な活性剤が、P D 1 - P D L 1 アンタゴニスト (例えば、P D 1 または P D L 1 抗体)、C T L A 4 アンタゴニスト (例えば、C T L A 4 抗体)、C D 2 0 抗体、C D 5 2 抗体、インターフェロン (I F N - ガンマ)、インターロイキン (I L - 2)、C D 4 7 アンタゴニスト (例えば、C D 4 7 抗体) および G D 2 抗体からなる群から選択される免疫療法剤である、項目9または10に記載の方法。

(項目12)

前記免疫療法剤が、イピリムマブ、リツキシマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、オカラツズマブ（ocaratumumab）、オクレリズマブ、TRU-015、ベルツズマブ、オフアツムマブ、アレムツズマブ、トレメリマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、BGB-A317、アテゾリズマブ、アベルマブおよびデュルバルマブからなる群から選択される、項目11に記載の方法。

（項目13）

前記患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

（項目14）

がんまたは腫瘍転移を阻害する、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

（項目15）

前記がんまたは腫瘍が、前記患者における免疫抑制を促進する、項目1から14のいずれか一項に記載の方法。

（項目16）

患者生存を増加させる、項目1から15のいずれか一項に記載の方法。

（項目17）

前記患者が、化学療法剤で処置されている、項目1から16のいずれか一項に記載の方法。

（項目18）

前記患者が、前記化学療法剤による処置の12ヶ月以内に疾患進行を有する、項目17に記載の方法。

（項目19）

前記化学療法剤が、白金に基づく化学療法剤である、項目17または18に記載の方法。

（項目20）

前記患者が、白金を含有する化学療法によるネオアジュバントまたはアジュバントで処置されている、項目17または18に記載の方法。

（項目21）

ActRIIA/B抗体、ActRIIA抗体およびActRIIB抗体の組合せ、またはActRIIアンタゴニストの量が、単独では前記がんまたは腫瘍の処置において無効である、項目1から20のいずれか一項に記載の方法。

（項目22）

PD1-PDL1アンタゴニストまたは免疫療法剤の量が、単独では前記がんまたは腫瘍の処置において無効である、項目1から21のいずれか一項に記載の方法。

（項目23）

前記患者が、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌等の転移性および非転移性非小細胞肺がん）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膀胱がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する、項目1から22のいずれか一項に記載の方法。

（項目24）

前記患者が、自己免疫疾患に罹っていない、項目1から23のいずれか一項に記載の方法。

（項目25）

前記患者が、臓器もしくは組織移植を経ていない、または臓器もしくは組織移植を受けている、項目1から24のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 2 6)

前記患者が、移植片対宿主病に罹っていない、項目 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7)

患者における免疫応答を誘導または増強する方法であって、

a. A c t R I I アンタゴニスト、および

b. 免疫療法剤

を、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含み、

前記 A c t R I I アンタゴニストおよび前記免疫療法剤が有効量で投与される、方法。

(項目 2 8)

患者における免疫疲弊を処置または予防する方法であって、

a. A c t R I I アンタゴニスト、および

b. 免疫療法剤

を、免疫疲弊を処置または予防することを必要とする患者に投与する工程を含み、

前記 A c t R I I アンタゴニストおよび前記免疫療法剤が有効量で投与される、方法。

(項目 2 9)

患者における抗原に対する免疫応答を誘導または増強する方法であって、i) A c t R I I アンタゴニスト、ii) 免疫療法剤および iii) 前記抗原を、抗原に対する免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含み、前記 A c t R I I アンタゴニスト、前記免疫療法剤および前記抗原が有効量で投与される、方法。

(項目 3 0)

病原体またはがんに対して患者にワクチン接種する方法であって、i) A c t R I I アンタゴニスト、ii) 免疫療法剤および iii) 病原体またはがん抗原を、ワクチン接種することを必要とする患者に投与する工程を含み、前記 A c t R I I アンタゴニスト、前記免疫療法剤および前記抗原が、前記患者のワクチン接種に有効な量で投与される、方法。

(項目 3 1)

患者におけるワクチンによって誘導される免疫応答を増強する方法であって、前記患者における前記ワクチンによって誘導される免疫応答の増強に有効な量で、i) A c t R I I アンタゴニストおよび ii) 免疫療法剤を患者に投与する工程を含む方法。

(項目 3 2)

前記免疫療法剤が、P D 1 - P D L 1 アンタゴニスト（例えば、P D 1 抗体または P D L 1 抗体）、C T L A 4 アンタゴニスト（例えば、C T L A 4 抗体）、C D 2 0 抗体、C D 5 2 抗体、インターフェロン（I F N - ガンマ）、インターロイキン（I L - 2）、C D 4 7 アンタゴニスト（例えば、C D 4 7 抗体）および G D 2 抗体からなる群から選択される、項目 2 7 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記免疫療法剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、B G B - A 3 1 7、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、リツキシマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、オカラツズマブ、オクレリズマブ、T R U - 0 1 5、ベルツズマブ、オフアツムマブ、アレムツズマブおよびトレメリムマブからなる群から選択される、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

患者における免疫応答を誘導または増強する方法であって、有効量の A c t R I I アンタゴニストを、免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含む方法。

(項目 3 5)

患者における免疫疲弊を処置または予防する方法であって、有効量の A c t R I I アンタゴニストを、免疫疲弊を処置または予防することを必要とする患者に投与する工程を含む方法。

(項目 3 6)

10

20

30

40

50

患者における抗原に対する免疫応答を誘導または増強する方法であって、i) A c t R I E アンタゴニストおよび i i) 前記抗原を、抗原に対する免疫応答を誘導または増強することを必要とする患者に投与する工程を含み、前記 A c t R I E アンタゴニストおよび前記抗原が有効量で投与される、方法。

(項目 3 7)

病原体またはがんに対して患者にワクチン接種する方法であって、i) A c t R I E アンタゴニストおよび i i) 病原体またはがん抗原を、ワクチン接種することを必要とする患者に投与する工程を含み、前記 A c t R I E アンタゴニストおよび前記抗原が、前記患者のワクチン接種に有効な量で投与される、方法。

(項目 3 8)

患者におけるワクチンによって誘導される免疫応答を増強する方法であって、有効量の A c t R I E アンタゴニストを、免疫応答を増強することを必要とする患者に投与して、前記患者における前記ワクチンによって誘導される免疫応答を増強する工程を含む方法。

(項目 3 9)

前記患者が、がんまたは腫瘍を有する、項目 2 7 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

惹起または増強される免疫応答が、がんまたは腫瘍に対するものである、項目 2 7 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記惹起または増強される免疫応答が、前記患者におけるがんまたは腫瘍細胞の成長を阻害する、項目 2 7 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

前記惹起または増強される免疫応答が、前記患者におけるがんまたは腫瘍細胞負荷を減少させる、項目 2 7 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

前記惹起または増強される免疫応答が、がんまたは腫瘍転移を処置または予防する、項目 2 7 から 4 2 の一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記がんまたは腫瘍が、前記患者における免疫抑制を促進する、項目 2 7 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記患者が、白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマまたは皮膚性メラノーマ）、肺がん（例えば、転移性および非転移性小細胞肺がん、ならびに扁平上皮癌、大細胞癌または腺癌などの転移性および非転移性非小細胞肺がん）、腎細胞癌、膀胱がん、中皮腫（例えば、転移性中皮腫）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮がん）、食道がん、胃がん、結腸直腸がん（例えば、結腸直腸癌）、肝臓がん（例えば、肝細胞癌）、尿路上皮癌（例えば、進行型または転移性尿路上皮癌）、リンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、多形神経膠芽腫、前立腺がん、膵がんおよび肉腫（例えば、転移性肉腫）からなる群から選択されるがんまたは腫瘍を有する、項目 2 7 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記惹起または増強される免疫応答が、病原体に対するものである、項目 2 7 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記病原体が、前記患者における免疫抑制を促進する、項目 2 7 から 3 8 および 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記病原体が、細菌、ウイルス、真菌または寄生虫病原体からなる群から選択される、項目 2 7 から 3 8 、 4 6 および 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 49)

前記 A c t R I I アンタゴニストが、

a. A c t R I I A / B 抗体、ならびに

b. A c t R I I A 抗体および A c t R I I B 抗体の組合せ

からなる群から選択される、項目 10 から 48 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 50)

前記 A c t R I I アンタゴニストが、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 9 のアミノ酸 30～110、配列番号 50、配列番号 54 および配列番号 57 のうちいずれか 1 種のアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、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 A c t R I I A ポリペプチドである、項目 10 から 48 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 51)

前記 A c t R I I アンタゴニストが、配列番号 1 のアミノ酸 29～109；配列番号 1 のアミノ酸 25～131；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 5；配列番号 6；配列番号 65；配列番号 68；配列番号 69；配列番号 132；配列番号 58；配列番号 60；配列番号 63；配列番号 64；配列番号 66；配列番号 70；配列番号 123；配列番号 128；配列番号 131；および配列番号 132 のうちいずれか 1 種のアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、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 A c t R I I B ポリペプチドである、項目 10 から 48 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 52)

前記ポリペプチドが、配列番号 1 に関する 79 位に酸性アミノ酸を含まない、項目 51 に記載の方法。

(項目 53)

前記 A c t R I I アンタゴニストが、A L K 4 ポリペプチドおよび A c t R I I B ポリペプチドを含むヘテロ多量体である、項目 10 から 48 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 54)

前記 A L K 4 ポリペプチドが、配列番号 14 のアミノ酸 34～101；配列番号 14 のアミノ酸 24～126；配列番号 15；配列番号 19；配列番号 34；配列番号 38；配列番号 74；配列番号 76；配列番号 79；および配列番号 80 のうちいずれか 1 種のアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、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、項目 53 に記載の方法。

30

(項目 55)

前記 A c t R I I B ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 29～109；配列番号 1 のアミノ酸 25～131；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 5；配列番号 6；配列番号 35；配列番号 39；配列番号 71；配列番号 73；配列番号 77；および配列番号 78 のうちいずれか 1 種のアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、項目 53 または 54 に記載の方法。

40

(項目 56)

前記 A c t R I I B ポリペプチドが、配列番号 1 の L 79 に対応する位置に酸性アミノ酸を含まない、項目 53 から 55 のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

(項目 57)

前記ヘテロ多量体が、A L K 4：A c t R I I B ヘテロ二量体である、項目 51 から 54 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 58)

前記 A c t R I I アンタゴニストが、抗体または抗体の組合せである、項目 10 から 4

50

8のいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

前記抗体または抗体の組合せが、G D F 1 1、G D F 8、アクチビンA、アクチビンB、B M P 1 0、B M P 6、G D F 3、B M P 9、A c t R I I A、A c t R I I BおよびA L K 4のうち1種または複数に結合する、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記A c t R I I アンタゴニストが、小分子または小分子の組合せである、項目10から48のいずれか一項に記載の方法。

(項目61)

前記小分子または小分子の組合せが、G D F 1 1、G D F 8、アクチビンA、アクチビンB、B M P 1 0、B M P 6、G D F 3、B M P 9、A c t R I I A、A c t R I I BおよびA L K 4のうち1種または複数を阻害する、項目60に記載の方法。

(項目62)

前記A c t R I I アンタゴニストが、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せである、項目10から48のいずれか一項に記載の方法。

(項目63)

前記ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せが、G D F 1 1、G D F 8、アクチビンA、アクチビンB、B M P 1 0、B M P 6、G D F 3、B M P 9、A c t R I I A、A c t R I I BおよびA L K 4のうち1種または複数を阻害する、項目62に記載の方法。

(項目64)

前記がんまたは腫瘍または病原体を処置するための1種または複数の追加的な活性剤または支持療法を投与する工程をさらに含む、項目1から63のいずれか一項に記載の方法。

(項目65)

患者におけるがんまたは腫瘍の処置における使用のためのA c t R I I アンタゴニストおよび免疫療法剤であって、前記処置が、有効量で前記A c t R I I アンタゴニストおよび前記免疫療法剤を投与する工程を含む、A c t R I I アンタゴニストおよび免疫療法剤。

(項目66)

患者におけるがんまたは腫瘍を処置するための医薬の製造のためのA c t R I I アンタゴニストの使用であって、前記がんまたは腫瘍の前記処置が、有効量で前記A c t R I I アンタゴニストおよび免疫療法剤を投与する工程を含む、使用。

(項目67)

患者におけるがんまたは腫瘍を処置するための医薬の製造のための免疫療法剤の使用であって、前記がんまたは腫瘍の前記処置が、有効量で前記免疫療法剤およびA c t R I I アンタゴニストを投与する工程を含む、使用。

(項目68)

前記A c t R I I アンタゴニストが、A c t R I I A / B抗体、またはA c t R I I A抗体およびA c t R I I B抗体の組合せである、項目65に記載のA c t R I I アンタゴニストおよび免疫療法剤、または項目66および67に記載の使用。

(項目69)

前記免疫療法剤が、P D 1 - P D L 1 アンタゴニスト（例えば、P D 1抗体またはP D L 1抗体）、C T L A 4 アンタゴニスト（例えば、C T L A 4抗体）、C D 2 0抗体、C D 5 2抗体、インターフェロン（I F N - ガンマ）、インターロイキン（I L - 2）、C D 4 7 アンタゴニスト（例えば、C D 4 7抗体）およびG D 2抗体からなる群から選択される、項目65に記載のA c t R I I アンタゴニストおよび免疫療法剤、または項目66および67に記載の使用。

(項目70)

前記免疫療法剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ、B G B - A 3 1 7、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、リツキシマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、オカラツズマブ、オクレリズ

10

20

30

40

50

マブ、T R U - 0 1 5、ベルツズマブ、オフアツムマブ、アテムツズマブおよびトレメリムマブからなる群から選択される、項目 6 9 に記載の方法。

【 0 0 5 5 】

特許または特許出願は、色付きで実行された少なくとも 1 つの図面を含む。色付きの図面を含む本特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要な手数料の支払い時に特許商標庁によって提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 6 】

【図 1】図 1 は、ヒト A c t R I I B およびヒト A c t R I I A の細胞外ドメインと、複数の A c t R I I B および A c t R I I A 結晶構造の複合分析に基づいて、囲みで示されるリガンドと直接接触すると本明細書で推定される残基とのアラインメントを示す。

10

【 0 0 5 7 】

【図 2】図 2 は、様々な脊椎動物 A c t R I I B タンパク質（配列番号 1 0 0 ～ 1 0 5）およびヒト A c t R I I A（配列番号 1 2 2）の複数の配列アラインメントならびにアラインメントに由来するコンセンサス A c t R I I 配列（配列番号 1 0 6）を示す。

【 0 0 5 8 】

【図 3】図 3 は、様々な脊椎動物 A c t R I I A タンパク質およびヒト A c t R I I A（配列番号 1 0 7 ～ 1 1 4）の複数の配列アラインメントを示す。

【 0 0 5 9 】

【図 4】図 4 は、様々な脊椎動物 A L K 4 タンパク質およびヒト A L K 4（配列番号 1 1 5 ～ 1 2 1）の複数の配列アラインメントを示す。

20

【 0 0 6 0 】

【図 5】図 5 は、C H O 細胞中で発現される A c t R I I A - h F c の精製を示す。タンパク質は、サイズカラム（上パネル）およびクマシー染色された S D S - P A G E（下パネル）（左レーン：分子量標準；右レーン：A c t R I I A - h F c）により可視化されるように、単一の、明確なピークとして精製される。

【 0 0 6 1 】

【図 6】図 6 は、B i a c o r e（商標）アッセイにより測定される、A c t R I I A - h F c の、アクチビン（上パネル）および G D F - 1 1（下パネル）への結合を示す。

【 0 0 6 2 】

【図 7】図 7 は、A c t R I I B（2 5 - 1 3 1）- h F c の完全な、プロセッシングされていないアミノ酸配列（配列番号 1 2 3）を示す。T P A リーダー（残基 1 ～ 2 2）および二重切断された A c t R I I B 細胞外ドメイン（残基 2 4 ～ 1 3 1、配列番号 1 中のネイティブ配列に基づく番号付けを使用する）に、それぞれ下線を付す。強調は、配列番号 1 に対して 2 5 位にある、成熟融合タンパク質の N 末端アミノ酸であると配列決定することによって示されるグルタミン酸である。

30

【 0 0 6 3 】

【図 8 A】図 8 A および図 8 B は、A c t R I I B（2 5 - 1 3 1）- h F c をコードするヌクレオチド配列を示す（コード鎖は上の配列番号 1 2 4 に示され、相補鎖は下の 3' - 5' で配列番号 1 2 5 に示される）。T P A リーダー（ヌクレオチド 1 ～ 6 6）および A c t R I I B 細胞外ドメイン（ヌクレオチド 7 3 ～ 3 9 6）をコードする配列に下線を付す。A c t R I I B（2 5 ～ 1 3 1）の対応するアミノ酸配列も示す。

40

【図 8 B】図 8 A および図 8 B は、A c t R I I B（2 5 - 1 3 1）- h F c をコードするヌクレオチド配列を示す（コード鎖は上の配列番号 1 2 4 に示され、相補鎖は下の 3' - 5' で配列番号 1 2 5 に示される）。T P A リーダー（ヌクレオチド 1 ～ 6 6）および A c t R I I B 細胞外ドメイン（ヌクレオチド 7 3 ～ 3 9 6）をコードする配列に下線を付す。A c t R I I B（2 5 ～ 1 3 1）の対応するアミノ酸配列も示す。

【 0 0 6 4 】

【図 9 A】図 9 A および図 9 B は、A c t R I I B（2 5 - 1 3 1）- h F c をコードする代替的なヌクレオチド配列を示す（コード鎖は上の配列番号 1 2 6 に示され、相補鎖は

50

下の 3' - 5' で配列番号 127 に示される)。この配列は、初期の形質転換体においてより高いレベルのタンパク質発現を提供し、細胞系開発をより迅速なプロセスにする。TPA リーダー (ヌクレオチド 1 ~ 66) および ActRIIB 細胞外ドメイン (ヌクレオチド 73 ~ 396) をコードする配列に下線を付し、ECD の野生型ヌクレオチド配列中の置換 (図 8 を参照されたい) を強調する。ActRIIB (25 ~ 131) の対応するアミノ酸配列も示す。

【図 9 B】図 9 A および図 9 B は、ActRIIB (25 - 131) - hFc をコードする代替的なヌクレオチド配列を示す (コード鎖は上の配列番号 126 に示され、相補鎖は下の 3' - 5' で配列番号 127 に示される)。この配列は、初期の形質転換体においてより高いレベルのタンパク質発現を提供し、細胞系開発をより迅速なプロセスにする。TPA リーダー (ヌクレオチド 1 ~ 66) および ActRIIB 細胞外ドメイン (ヌクレオチド 73 ~ 396) をコードする配列に下線を付し、ECD の野生型ヌクレオチド配列中の置換 (図 8 を参照されたい) を強調する。ActRIIB (25 ~ 131) の対応するアミノ酸配列も示す。

10

【0065】

【図 10】図 10 は、TPA リーダー配列 (二重下線)、ActRIIB 細胞外ドメイン (配列番号 1 の残基 20 ~ 134 ; 一重下線)、および hFc ドメインを含む、ActRIIB (L79D 20 - 134) - hFc (配列番号 128) の完全なアミノ酸配列を示す。成熟融合タンパク質中の N 末端残基であると配列決定することによって示されるグリシンのように、ネイティブ配列中の 79 位で置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、強調する。

20

【0066】

【図 11 A】図 11 A および図 11 B は、ActRIIB (L79D 20 - 134) - hFc をコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号 129 はセンス鎖に対応し、配列番号 130 はアンチセンス鎖に対応する。TPA リーダー (ヌクレオチド 1 ~ 66) に二重下線を付し、ActRIIB 細胞外ドメイン (ヌクレオチド 76 ~ 420) に一重下線を付す。

【図 11 B】図 11 A および図 11 B は、ActRIIB (L79D 20 - 134) - hFc をコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号 129 はセンス鎖に対応し、配列番号 130 はアンチセンス鎖に対応する。TPA リーダー (ヌクレオチド 1 ~ 66) に二重下線を付し、ActRIIB 細胞外ドメイン (ヌクレオチド 76 ~ 420) に一重下線を付す。

30

【0067】

【図 12】図 12 は、TPA リーダー (二重下線)、切断された ActRIIB 細胞外ドメイン (配列番号 1 の残基 25 ~ 131 ; 一重下線)、および hFc ドメインを含む、ActRIIB (L79D 25 - 131) - hFc の完全なアミノ酸配列 (配列番号 131) を示す。成熟融合タンパク質中の N 末端残基であると配列決定することによって示されるグルタミン酸のように、ネイティブ配列中の 79 位で置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、強調する。

【0068】

【図 13】図 13 は、リーダーを含まない切断された GDF トラップ ActRIIB (L79D 25 - 131) - hFc のアミノ酸配列 (配列番号 132) を示す。切断された ActRIIB 細胞外ドメイン (配列番号 1 の残基 25 ~ 131) に下線を付す。成熟融合タンパク質中の N 末端残基であると配列決定することによって示されるグルタミン酸のように、ネイティブ配列中の 79 位で置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、強調する。

40

【0069】

【図 14】図 14 は、リーダー、hFc ドメイン、およびリンカーを含まない、切断された GDF トラップ ActRIIB (L79D 25 - 131) のアミノ酸配列 (配列番号 133) を示す。成熟融合タンパク質中の N 末端残基であると配列決定することによって

50

示されるグルタミン酸のように、ネイティブ配列中の79位で置換されたアスパラギン酸に下線を付し、強調する。

【0070】

【図15A】図15Aおよび図15Bは、ActRIIB (L79D 25-131) - hFcをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号134はセンス鎖に対応し、配列番号135はアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー（ヌクレオチド1～66）に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン（ヌクレオチド76～396）に一重下線を付す。ActRIIB細胞外ドメインのアミノ酸配列（配列番号1の残基25～131）も示す。

【図15B】図15Aおよび図15Bは、ActRIIB (L79D 25-131) - hFcをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号134はセンス鎖に対応し、配列番号135はアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー（ヌクレオチド1～66）に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン（ヌクレオチド76～396）に一重下線を付す。ActRIIB細胞外ドメインのアミノ酸配列（配列番号1の残基25～131）も示す。

【0071】

【図16A】図16Aおよび図16Bは、ActRIIB (L79D 25-131) - hFcをコードする代替的なヌクレオチド配列を示す。配列番号136はセンス鎖に対応し、配列番号137はアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー（ヌクレオチド1～66）に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン（ヌクレオチド76～396）に下線を付し、細胞外ドメインの野生型ヌクレオチド配列中の置換に二重下線を付し、強調する（配列番号134、図15と比較されたい）。ActRIIB細胞外ドメインのアミノ酸配列（配列番号1の残基25～131）も示す。

【図16B】図16Aおよび図16Bは、ActRIIB (L79D 25-131) - hFcをコードする代替的なヌクレオチド配列を示す。配列番号136はセンス鎖に対応し、配列番号137はアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー（ヌクレオチド1～66）に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン（ヌクレオチド76～396）に下線を付し、細胞外ドメインの野生型ヌクレオチド配列中の置換に二重下線を付し、強調する（配列番号134、図15と比較されたい）。ActRIIB細胞外ドメインのアミノ酸配列（配列番号1の残基25～131）も示す。

【0072】

【図17】図17は、図16に示された代替的なヌクレオチド配列（配列番号136）のヌクレオチド76～396（配列番号138）を示す。図16に示された同じヌクレオチド置換にはまた、ここで下線を付し、強調する。配列番号138は、L79D置換を有する切断されたActRIIB細胞外ドメインのみ（配列番号1の残基25～131に対応する）、例えば、ActRIIB (L79D 25-131) をコードする。

【0073】

【図18】図18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、点線の下線付きで示される。二重下線は、非対称鎖ペア形成を促進するためにIgG1 Fc中で操作された位置の例ならびに他のアイソタイプIgG2、IgG3およびIgG4に関する対応する位置を示す。

【0074】

【図19】図19は、ActRIIB-Fcホモ二量体およびALK4-Fcホモ二量体と比較した、ALK4-Fc: ActRIIB-Fcヘテロ二量体タンパク質複合体に関する比較リガンド結合データを示す。それぞれのタンパク質複合体について、リガンドは、リガンドシグナル伝達阻害と良好に相関する速度定数 k_{off} によって順位付けられ、結合アフィニティの降順に列挙される（最も緊密なリガンド結合は上に列挙される）。左側の黄色、赤色、緑色、および青色の線は、オフ速度定数の規模を示す。黒色の実線は、ヘテロ二量体への結合がホモ二量体と比較して増強されるか、または変化しないリガンド

を示すが、赤色の破線は、ホモ二量体と比較して実質的に低下した結合を示す。示されるように、 $ALK4-Fc:ActRIIB-Fc$ ヘテロ二量体は、いずれかのホモ二量体と比較して、アクチビンBへの結合の増強を示し、 $ActRIIB-Fc$ ホモ二量体について観察されるアクチビンA、 $GDF8$ 、および $GDF11$ への強力な結合を保持し、 $BMP9$ 、 $BMP10$ 、および $GDF3$ への実質的に低下した結合を示す。 $ActRIIB-Fc$ ホモ二量体のように、ヘテロ二量体は、 $BMP6$ への中間レベルの結合を保持する。
【0075】

【図20】図20は、本明細書に記載のA-204レポーター遺伝子アッセイによって決定された場合の比較 $ALK4-Fc:ActRIIB-Fc$ ヘテロ二量体/ $ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc$ ホモ二量体の IC_{50} データを示す。 $ALK4-Fc:ActRIIB-Fc$ ヘテロ二量体は、 $ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc$ ホモ二量体と同様、アクチビンA、アクチビンB、 $GDF8$ 、および $GDF11$ シグナル伝達経路を阻害する。しかしながら、 $BMP9$ および $BMP10$ のシグナル伝達経路の $ALK4-Fc:ActRIIB-Fc$ ヘテロ二量体阻害は、 $ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc$ ホモ二量体と比較して有意に低下している。これらのデータは、 $ALK4:ActRIIB$ ヘテロ二量体は、対応する $ActRIIB:ActRIIB$ ホモ二量体と比較して、アクチビンA、アクチビンB、 $GDF8$ 、および $GDF11$ のより選択的なアンタゴニストであることを示している。

【0076】

【図21】図21Aおよび21Bは、I型受容体およびII型受容体ポリペプチドを含む異種タンパク質複合体の2つの概略例を示す。図21Aは、1つのI型受容体融合ポリペプチドおよび1つのII型受容体融合ポリペプチドを含むヘテロ二量体のタンパク質複合体を示し、これは、各ポリペプチド鎖内に含まれる多量体化ドメインを介して共有結合的または非共有結合的にアセンブリすることができる。2つのアセンブリされた多量体化ドメインが相互作用ペアを構成し、これは誘導型であっても非誘導型であってもよい。図21Bは、図21Aで描示した通りの2つのヘテロ二量体複合体を含むヘテロ四量体タンパク質複合体について描示する。より高次の複合体も、想定することができる。

【0077】

【図22】図22は、I型受容体ポリペプチド（「I」と示す）（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来の $ALK4$ タンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）およびII型受容体ポリペプチド（「II」と表示される）（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来の $ActRIIB$ タンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）を含む異種タンパク質複合体の概略例を示す。例示された実施形態では、I型受容体ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバー（「C₁」）を含む融合ポリペプチドの部分であり、II型受容体ポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバー（「C₂」）を含む融合ポリペプチドの部分である。各融合ポリペプチドにおいて、リンカーは、I型またはII型受容体ポリペプチドと、相互作用ペアの対応するメンバーとの間に位置付けられ得る。相互作用ペアの第1および第2のメンバーは誘導型（非対称）であってよく、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりむしろ、優先的に互いと会合することを意味し、あるいは相互作用ペアは非誘導型であってよく、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先性なしで互いと会合する、または自己会合することができ、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Fc融合タンパク質および抗体は非誘導型相互作用ペアの例であり、他方、操作されたFcドメインの種類は誘導型（非対称）相互作用ペアとしてデザインされている【例えば、Spiesら、(2015) Molecular Immunology 67 (2A): 95-106】。

【0078】

【図23A】図23A～23Dは、ALK4ポリペプチド（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のALK4タンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）と、ActRIIBポリペプチド（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のActRIIBタンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）とを含むンパク質複合体の概略例を示す。例示された実施形態では、ALK4ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバー（「C1」）を含む融合ポリペプチドの部分であり、ActRIIBポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバー（「C2」）を含む融合ポリペプチドの部分である。適当な相互作用ペアは、例えば、本明細書に記載されるものなどの重鎖および／または軽鎖免疫グロブリン相互作用ペア、その短縮体および改変体を含んだ〔例えば、Spiessら、(2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106〕。各融合ポリペプチドにおいて、リンカーは、ALK4またはActRIIBポリペプチドと、相互作用ペアの対応するメンバーとの間に位置付けられ得る。相互作用ペアの第1および第2のメンバーは非誘導型であり得、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先性なしで互いと会合する、または自己会合することができることを意味し、これらは、同じまたは異なるアミノ酸配列を有し得る。図23Aを参照のこと。代替的に、相互作用ペアは誘導型（非対称）ペアであり得、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりむしろ、優先的に互いと会合することを意味する。図23Bを参照のこと。より高次の複合体が構想され得る。図23Cおよび23Dを参照のこと。

【図23B】図23A～23Dは、ALK4ポリペプチド（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のALK4タンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）と、ActRIIBポリペプチド（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のActRIIBタンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）とを含むンパク質複合体の概略例を示す。例示された実施形態では、ALK4ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバー（「C1」）を含む融合ポリペプチドの部分であり、ActRIIBポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバー（「C2」）を含む融合ポリペプチドの部分である。適当な相互作用ペアは、例えば、本明細書に記載されるものなどの重鎖および／または軽鎖免疫グロブリン相互作用ペア、その短縮体および改変体を含んだ〔例えば、Spiessら、(2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106〕。各融合ポリペプチドにおいて、リンカーは、ALK4またはActRIIBポリペプチドと、相互作用ペアの対応するメンバーとの間に位置付けられ得る。相互作用ペアの第1および第2のメンバーは非誘導型であり得、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先性なしで互いと会合する、または自己会合することができることを意味し、これらは、同じまたは異なるアミノ酸配列を有し得る。図23Aを参照のこと。代替的に、相互作用ペアは誘導型（非対称）ペアであり得、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりむしろ、優先的に互いと会合することを意味する。図23Bを参照のこと。より高次の複合体が構想され得る。図23Cおよび23Dを参照のこと。

【図23C】図23A～23Dは、ALK4ポリペプチド（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のALK4タンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド）と、ActRIIBポリペプチド（例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のActRIIBタンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド)とを含むタンパク質複合体の概略例を示す。例示された実施形態では、ALK4ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバー(「C₁」)を含む融合ポリペプチドの部分であり、ActRIIBポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバー(「C₂」)を含む融合ポリペプチドの部分である。適当な相互作用ペアは、例えば、本明細書に記載されるものなどの重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン相互作用ペア、その短縮体および改変体を含んだ[例えば、Spiesら、(2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]。各融合ポリペプチドにおいて、リンカーは、ALK4またはActRIIBポリペプチドと、相互作用ペアの対応するメンバーとの間に位置付けられ得る。相互作用ペアの第1および第2のメンバーは非誘導型であり得、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先性なしで互いと会合する、または自己会合することができることを意味し、これらは、同じまたは異なるアミノ酸配列を有し得る。図23Aを参照のこと。代替的に、相互作用ペアは誘導型(非対称)ペアであり得、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりむしろ、優先的に互いと会合することを意味する。図23Bを参照のこと。より高次の複合体が構想され得る。図23Cおよび23Dを参照のこと。

【図23D】図23A~23Dは、ALK4ポリペプチド(例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のALK4タンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド)と、ActRIIBポリペプチド(例えば、ヒトまたは本明細書に記載されるような他の種由来のActRIIBタンパク質の細胞外ドメインと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるペプチド)とを含むタンパク質複合体の概略例を示す。例示された実施形態では、ALK4ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバー(「C₁」)を含む融合ポリペプチドの部分であり、ActRIIBポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバー(「C₂」)を含む融合ポリペプチドの部分である。適当な相互作用ペアは、例えば、本明細書に記載されるものなどの重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン相互作用ペア、その短縮体および改変体を含んだ[例えば、Spiesら、(2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]。各融合ポリペプチドにおいて、リンカーは、ALK4またはActRIIBポリペプチドと、相互作用ペアの対応するメンバーとの間に位置付けられ得る。相互作用ペアの第1および第2のメンバーは非誘導型であり得、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先性なしで互いと会合する、または自己会合することができることを意味し、これらは、同じまたは異なるアミノ酸配列を有し得る。図23Aを参照のこと。代替的に、相互作用ペアは誘導型(非対称)ペアであり得、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりむしろ、優先的に互いと会合することを意味する。図23Bを参照のこと。より高次の複合体が構想され得る。図23Cおよび23Dを参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0079】

1. 概観

TGF- β スーパーファミリーは、TGF- β 、アクチビン、Nodal、骨形成遺伝子タンパク質(BMP)、増殖分化因子(GDF)、および抗ミューラー管ホルモン(AMH)を含む、30を超える分泌因子から構成される[Weissら(2013年)、*Developmental Biology*、2巻(1号): 47~63頁]。スーパーファミリーのメンバーであって、脊椎動物および非脊椎動物のいずれにおいても見出されるメンバーは、多様な組織内で普遍的に発現し、動物の寿命を通して発生の最早期に機能する。実際、TGF- β スーパーファミリータンパク質は、幹細胞の自己再生、原腸形成、分化、器官の形態形成、および成体組織のホメオスタシスの鍵となるメディエーターである。TGF- β スーパーファミリーによるシグナル伝達の異常が広範にわたるヒト病態と関

連することは、この活性の遍在性と符合する。

【0080】

TGF- β スーパーファミリーのリガンドは、1つの単量体の中央3-1/2ターンヘリックスが、他の単量体のベータースtrandにより形成される凹部表面に対してパッキングされる、同じ二量体構造を共有する。TGF- β ファミリーメンバーの大半は、分子間ジスルフィド結合によりさらに安定化される。このジスルフィド結合は、「システインノット」モチーフと称されるモチーフを生成する他の2つのジスルフィド結合により形成されるリングを横切る [Linら (2006年)、Reproduction、132巻: 179~190頁; およびHinckら (2012年)、FEBS Letters、586巻: 1860~1870頁]。

10

【0081】

TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達は、I型およびII型のセリン/スレオニンキナーゼ受容体の異種複合体 (heteromeric complex) によって媒介され、これらは、リガンド刺激の際に、下流のSMADタンパク質 (例えば、SMADタンパク質1、2、3、5、および8) をリン酸化および活性化する [Massague、2000年、Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1巻: 169~178頁]。これらのI型およびII型受容体は、システインリッチな領域を持つリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および、予測セリン/スレオニンキナーゼ特異性を持つ細胞質ドメインから構成される膜貫通タンパク質である。概して、I型受容体は、細胞内シグナル伝達を媒介する一方、II型受容体は、TGF- β スーパーファミリーリガンドの結合に必要とされる。I型およびII型の受容体は、リガンド結合後に安定な複合体を形成し、II型受容体によるI型受容体のリン酸化をもたらす。

20

【0082】

TGF- β ファミリーは、結合するI型受容体と、活性化させるSmadタンパク質とに基づき、系統発生上の2つの分枝に分けることができる。1つは、近年進化した分枝であり、例えば、TGF- β 、アクチビン、GDF8、GDF9、GDF11、BMP3およびNodalを含み、これは、Smad2および3を活性化するI型受容体を介してシグナル伝達する [Hinck (2012) FEBS Letters 586: 1860-1870]。他の分枝は、スーパーファミリーのより遠い関連タンパク質を含み、例えば、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF1、GDF5、GDF6、およびGDF7を含み、これは、Smad1、5、および8を介してシグナル伝達する。

30

【0083】

TGF β アイソフォームは、TGF β スーパーファミリーの創立メンバーであり、そのうち、哺乳動物では、TGF β 1、TGF β 2およびTGF β 3と表示される、3つのアイソフォームが公知である。生物活性の成熟TGF β リガンドは、ホモ二量体として機能し、主に、I型受容体であるALK5を介してシグナル伝達するが、加えてまた、内皮細胞内のALK1を介してもシグナル伝達することが見出されている [Goumansら (2003年) Mol Cell 12巻 (4号): 817~828頁]。TGF β 1は、最も夥多であり、かつ遍在的に発現するアイソフォームである。TGF β 1は、創傷治癒において重要な役割を果たすことが公知であり、構成的に活性のTGF β 1トランス遺伝子を発現させるマウスは、線維症を発症する [Clouthierら (1997年) J Clin. Invest. 100巻 (11号): 2697~2713頁]。TGF β 1の発現は、ヒト神経膠芽腫細胞において最初に記載されたが、胚性神経系のニューロン内および星状膠細胞細胞内で生じる。TGF β 3は当初、ヒト横紋筋肉腫細胞系から単離され、以来、肺腺癌および腎癌細胞系において見出されている。TGF β 3は、口蓋および肺の形態形成に重要であることが公知である [Kubiczkovaら (2012年) Journal of Translational Medicine 10巻: 183頁]。

40

【0084】

アクチビンは、TGF- β スーパーファミリーのメンバーであり、当初、濾胞刺激ホルモ

50

ンの分泌の調節因子として発見されたが、その後、多様な生殖的および非生殖的役割が特徴付けられている。2つの近縁のβサブユニットのホモ／ヘテロ二量体（それぞれ、βAβA、βBβB、およびβAβB）である、3つの主要なアクチビン形態（A、B、およびAB）が存在する。ヒトゲノムはまた、主に肝臓内で発現する、アクチビンCおよびアクチビンEもコードし、βCまたはβEを含有するヘテロ二量体形態もまた公知である。TGF-βスーパーファミリーにおいて、アクチビンは、卵巣および胎盤の細胞におけるホルモン生成を刺激し得、神経細胞の生存を支援し得、細胞周期の進行に対して細胞型に依存して正もしくは負に影響を及ぼし得、そして、少なくとも両生類の胚において中胚葉分化を誘導し得る、独特かつ多機能の作用因子である [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；およびWoodruff（1998年）、Biochem Pharmacol. 55巻：953～963頁]。いくつかの組織では、アクチビンのシグナル伝達は、その関連するヘテロ二量体であるインヒビンによってアンタゴナイズされる。例えば、下垂体からの卵胞刺激ホルモン（FSH）分泌の制御において、アクチビンは、FSHの合成および分泌を促進するが、インヒビンは、FSHの合成および分泌を低減する。アクチビンの生活性を調節し得、そして／または、アクチビンに結合し得る他のタンパク質としては、フォリスタチン（FS）、フォリスタチン関連タンパク質（FSRP、FLRGまたはFSTL3としても公知）およびα₂-マクログロブリンが挙げられる。

【0085】

本明細書で記載される通り、「アクチビンA」に結合する作用因子は、単離βAサブユニットの文脈であれ、二量体の複合体（例えば、βAβAホモ二量体またはβAβBヘテロ二量体）としてであれ、βAサブユニットに特異的に結合する作用因子である。ヘテロ二量体の複合体（例えば、βAβBヘテロ二量体）の場合、「アクチビンA」に結合する作用因子は、βAサブユニット内に存在するエピトープには特異的であるが、複合体のβA以外のサブユニット（例えば、複合体のβB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、「アクチビンA」にアンタゴナイズする（これを阻害する）本明細書で開示される作用因子は、単離βAサブユニットの文脈であれ、二量体の複合体（例えば、βAβAホモ二量体またはβAβBヘテロ二量体）としてであれ、βA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作用因子である。βAβBヘテロ二量体の場合、「アクチビンA」を阻害する作用因子は、βA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βA以外のサブユニット（例えば、複合体のβBサブユニット）の活性は阻害しない作用因子である。この原則はまた、「アクチビンB」、「アクチビンC」、および「アクチビンE」に結合し、かつ／またはこれらを阻害する作用因子にも当てはまる。「アクチビンAB」にアンタゴナイズする本明細書で開示される作用因子は、βAサブユニットにより媒介される1つまたは複数の活性と、βBサブユニットにより媒介される1つまたは複数の活性とを阻害する作用因子である。

【0086】

BMPおよびGDFは、併せて、TGF-βスーパーファミリーの特徴的折り畳みを共有するシステインノットサイトカインのファミリーを形成する [Riderら（2010年）、Biochem J.、429巻（1号）：1～12頁]。このファミリーは、例えば、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP2a、BMP3、BMP3b（GDF10としても公知）、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8、BMP8a、BMP8b、BMP9（GDF2としても公知）、BMP10、BMP11（GDF11としても公知）、BMP12（GDF7としても公知）、BMP13（GDF6）、BMP14（GDF5としても公知）、BMP15、GDF1、GDF3（VGR2としても公知）、GDF8（ミオスタチンとしても公知）、GDF9、GDF15およびdecapentaplegicを含む。骨形成を誘導する能力であって、BMPにそれらの名称を与えた能力のほか、BMP／GDFは、広範にわたる組織の発達における形態形成活性も提示する。BMP／GDFホモおよびヘテロ二量体は、I型およびII型受容体

の二量体の組合せと相互作用して、複数の可能なシグナル伝達複合体をもたらし、SMA D転写因子の2つの競合するセットのうちの1つを活性化させる。BMP/GDFは、高度に特異的で、局在化された機能を有する。これらは、BMP/GDF発現の発達上の制限を含む多数の形で調節されており、高アフィニティでサイトカインに結合するいくつかの特異的BMPアンタゴニストタンパク質の分泌を介して調節されている。興味深いことに、これらの多数のアンタゴニストは、TGF- β スーパーファミリーのリガンドに相似している。

【0087】

増殖および分化因子8 (GDF8) は、ミオスタチンとしても公知であり、骨格筋量の負の調節因子である。GDF8は、発生中および成体中の骨格筋において高度に発現する。遺伝子導入マウスにおけるGDF8欠失変異は、骨格筋の顕著な肥大および過形成を特徴とする [McPerronら、Nature (1997年)、387巻: 83~90頁]。骨格筋量の同様の増加は、ウシおよび、驚くべきことに、ヒト [Ashmoreら (1974年)、Growth、38巻: 501~507頁; SwatlandおよびKieffer、J. Anim. Sci.、(1994年) 38巻: 752~757頁; McPerronおよびLee、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(1997年) 94巻: 12457~12461頁; Kambadurら、Genome Res.、(1997年) 7巻: 910~915頁; およびSchuelkeら (2004年)、N Engl J Med、350巻: 2682~8頁] におけるGDF8の天然に存在する変異において明らかである。研究は、ヒトにおけるHIV感染に関連する筋肉疲弊には、GDF8タンパク質の発現の増加が随伴することも示している [Gonzalez-Cadavidら、PNAS、(1998年) 95巻: 14938~43頁]。加えて、GDF8は、筋肉特異的酵素 (例えば、クレアチンキナーゼ) の生成を調節することが可能であり、筋芽細胞の増殖を調節し得る [国際特許出願公開第WO00/43781号]。GDF8プロペプチドは、成熟GDF8ドメイン二量体に非共有結合的に結合し、その生物活性を不活性化することができる [Miyazonoら (1988年)、J. Biol. Chem.、263巻: 6407~6415頁; Wakefieldら (1988年)、J. Biol. Chem.、263巻: 7646~7654頁; およびBrownら (1990年)、Growth Factors、3巻: 35~43頁]。GDF8または構造的に関連するタンパク質に結合し、それらの生物活性を阻害する他のタンパク質として、フォリスタチン、および、潜在的に、フォリスタチン関連タンパク質が挙げられる [Gamerら (1999年)、Dev. Biol.、208巻: 222~232頁]。

【0088】

BMP11としても公知のGDF11は、マウス発生時に尾芽、肢芽、上顎弓および下顎弓、ならびに後根神経節において発現する分泌タンパク質である [McPerronら (1999年)、Nat. Genet.、22巻: 260~264頁; およびNakashimaら (1999年)、Mech. Dev.、80巻: 185~189頁]。GDF11は、中胚葉組織および神経組織の両方のパターン形成において、固有の役割を果たす [Gamerら (1999年)、Dev Biol.、208巻: 222~32頁]。GDF11は、発生中のニワトリの肢における軟骨形成および筋発生の負の調節因子であることが示された [Gamerら (2001年)、Dev Biol.、229巻: 407~20頁]。筋内のGDF11の発現はまた、GDF8と同様の方式での筋肉の増殖の調節におけるその役割も示唆する。加えて、脳内のGDF11の発現は、GDF11はまた、神経系の機能に関連する活性を有し得ることを示唆する。興味深いことに、GDF11は、嗅上皮における神経発生を阻害することも見出された [Wuら (2003年)、Neuron、37巻: 197~207頁を参照]。よって、GDF11は、筋疾患および神経変性疾患 (例えば、筋萎縮性側索硬化症) などの疾患を処置するのに、インビトロおよびインビボにおいて適用することができる。

【0089】

一部には、本明細書に提示されているデータは、A c t R I I アンタゴニスト（阻害剤）を使用して、がんを処置することができることを実証する。特に、A c t R I I A / B 抗体、A c t R I I A ポリペプチド、A c t R I I B ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ二量体のいずれか別々による処置が、がんモデルにおける腫瘍負荷を減少し、生存時間を増加したことが示された。さらに、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストと組み合わせたA c t R I I A / B 抗体を使用して、いずれかの薬剤単独で観察される効果と比較して、抗腫瘍活性を相乗的に増加させ得ることが示された。いずれか特定の機構に束縛されることを望まないが、A c t R I I A / B 抗体、A c t R I I A ポリペプチド、A c t R I I B ポリペプチドおよびA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ二量体の効果が、主としてA c t R I I シグナル伝達アンタゴニスト効果に起因することが予測される。機構に 10
関係なく、本明細書に提示されているデータから、A c t R I I シグナル伝達アンタゴニストが、がん患者における腫瘍負荷の重症度を低減し、生存を延長することが明らかである。

【0090】

本明細書で記載されている研究において使用されたがんのための動物モデルは、ヒトにおける有効性を予測するものと考慮され、したがって、本開示は、A c t R I I アンタゴニストを、単独で、または1つまたは複数の支持療法および／または追加的な活性剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせて使用して、がんを処置し、特に、がんの1つまたは複数の合併症の重症度および／または 20
は進行を予防または低減する（例えば、腫瘍負荷を低減し、生存時間を増加させる）ための方法を提供する。加えて、データは、A c t R I I アンタゴニスト療法の有効性が、免疫系に依存することを指し示す。したがって、一部には、本開示は、A c t R I I アンタゴニストを免疫療法薬として使用して、特に、多種多様ながん（例えば、免疫抑制および／または免疫疲弊に関連するがん）を処置することができるという発見に関する。他の公知の免疫腫瘍学的薬剤と同様に、患者における免疫応答を増強するA c t R I I アンタゴニストの能力は、がん分野外のより幅広い治療上の意義を有することができる。例えば、免疫増強剤が、免疫抑制および／または免疫疲弊を促進する多種多様な感染性疾患、特に、病原因子の処置において有用となり得ることが提案された。また、このような免疫増強剤は、ワクチン（例えば、感染性疾患およびがんワクチン）の免疫化有効性のブーストにおいて有用となり得る。したがって、本開示は、単独でまたは組み合わせて使用して、任意選択で、1つまたは複数の支持療法および／または追加的な活性剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなど、免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせて、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させる、がんを処置する、感染性疾患（病原体）を処置する、および／または免疫化有効性を増加させることができる 30
様々なA c t R I I アンタゴニストを提供する。

【0091】

本明細書で開示される通り、A c t R I I アンタゴニストという用語は、例えば、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド〔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）、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0およびB M P 9〕を阻害するアンタゴニスト；1つまたは複数のA c t R I I 関連I型、II型または共受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I BおよびA L K 4）を阻害するアンタゴニスト；および1つまたは複数のA c t R I I 関連下流シグナル伝達構成成分（例えば、S m a d 2および3など、S m a dタンパク質）を阻害するアンタゴニストを含む、A c t R I I シグナル伝達のアンタゴナイズに使用することができる種々の薬剤を指す。本開示の方法および使用に従って使用されるべきA c t R I I アンタゴニストは、種々の形態、例えば、リガンドトラップ（例えば、可溶性A c t R I I A ポリペプチド、A c t R I I B ポリペプチドおよびA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ二量体）、抗体アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A / B 抗体、またはA c t R I I A 抗体およびA c t R I I B 抗体の組合せ）、小分子アンタゴニスト〔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）、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、B M 40
50

P9、ALK4、ActRIIA、ActRIIBおよび1つまたは複数のSmadタンパク質（例えば、Smad2および3）のうち1つまたは複数を阻害する小分子] およびヌクレオチドアンタゴニスト [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）、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10、BMP9、ALK4、ActRIIA、ActRIIBおよび1つまたは複数のSmadタンパク質（例えば、Smad2および3）のうち1つまたは複数を阻害するヌクレオチド配列] を含む。

【0092】

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、それが使用される特定の文脈から明らかである。

【0093】

「ヘテロマー」または「ヘテロ多量体」という用語は、本明細書で使用する場合、少なくとも第1のポリペプチド鎖と、第2のポリペプチド鎖とを含む複合体であって、第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、第1のポリペプチド鎖と、少なくとも1つのアミノ酸残基だけ異なる複合体を指す。ヘテロマーは、第1および第2のポリペプチド鎖により形成される「ヘテロ二量体」を含む場合もあり、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖に加えて、1つまたは複数のポリペプチド鎖が存在する高次構造を形成する場合もある。ヘテロ多量体の例示的な構造は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体およびさらなるオリゴマー構造を含む。本明細書では、ヘテロ二量体を、X:Yまたは、これと同義に、X-Yと表示する[表示中、Xは、第1のポリペプチド鎖を表示し、Yは、第2のポリペプチド鎖を表示する]。本明細書では、高次ヘテロマー構造および高次オリゴマー構造も、対応する形で表示する。

【0094】

「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。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。

【0095】

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。

【0096】

参照ポリペプチド（またはヌクレオチド）配列に照らした「配列同一性パーセント（%）」とは、配列を決定し、必要な場合、最大の配列同一性パーセントを達成するようにギャップを導入した後における、保存的置換は配列同一性の一部と考えない場合の、候補配列内のアミノ酸残基（または核酸）の百分率であって、参照ポリペプチド（ヌクレオチド）配列内のアミノ酸残基（または核酸）と同一であるアミノ酸残基（または核酸）の百分率と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定することを目的とするアラインメントは、当該分野の技術の範囲内にある種々の方式で、例えば、BLASTソフトウェア、BLAST-2ソフトウェア、ALIGNソフトウェア、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなど、一般に利用可能な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、配列を決定するのに適切なパラメータであって、比較される配列の全長にわたり最大のアラインメントを達成するのに必要とされる、任意のア

10

20

30

40

50

ルゴリズムを含むパラメータを決定することができる。しかし、本明細書の目的では、アミノ酸（核酸）配列同一性％値は、配列比較コンピュータプログラムである、ALIGN-2を使用して生成する。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. により作成され、ソースコードは、使用説明書と共に、米国著作権局、Washington D.C.、20559に提出され、ここで、米国著作権登録第TXU510087号として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc.、South San Francisco, Calif. から一般に利用可能であるが、ソースコードからコンパイルすることもできる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含む、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム上の使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムにより設定され、変化しない。

10

【0097】

その全ての文法的形態において、「アゴナイズ」とは、タンパク質および／もしくは遺伝子を活性化させる（例えば、そのタンパク質の遺伝子発現を活性化させるか、もしくは増幅することにより、または不活性タンパク質を活性状態に入るように誘導することにより）か、またはタンパク質および／もしくは遺伝子の活性を増大させる過程を指す。

【0098】

その全ての文法的形態において、「アンタゴナイズ」とは、タンパク質および／もしくは遺伝子を阻害する（例えば、そのタンパク質の遺伝子発現を阻害するか、もしくは減少させることにより、または活性タンパク質を不活性状態に入るように誘導することにより）か、またはタンパク質および／もしくは遺伝子の活性を減少させる過程を指す。

20

【0099】

本明細書で使用する場合、他に記されていないならば、「Xに実質的に結合しない」は、薬剤が、「X」に対し約 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 超もしくはそれを超える（例えば、 K_D の決定に使用されるアッセイによって検出可能な結合なし） K_D を有する、または「X」に対し相対的に弱い結合、例えば、約 $1 \times 10^{-8} M$ もしくは約 $1 \times 10^{-9} M$ を有することを意味すると意図される。

【0100】

本明細書および特許請求の範囲を通して数値と関連して使用される場合の「約」および「およそ」という用語は、当業者にとって馴染みがあり、許容可能な、正確さの区間を表す。一般に、このような正確さの区間は、 $\pm 10\%$ である。代替的に、特に、生物学的系では、「約」および「およそ」という用語は、ある大きさの程度内、好ましくは、所与の値の ≤ 5 倍であり、より好ましくは、 ≤ 2 倍以内である値を意味し得る。

30

【0101】

本明細書で開示される数値範囲は、範囲を規定する数について包含的である。

【0102】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という用語は、その用語が使用される文脈によりそうでないことが明らかに指示されるのでない限り、複数の言及を含む。本明細書では、「1つの(a)」(または「1つの(an)」)という用語、ならびに「1つまたは複数の」および「少なくとも1つの」という用語を、互換的に使用することができる。さらに、本明細書で使用される場合の「および／または」とは、2つまたはこれを超える指定された特色または構成要素であって、他の特色または構成要素を伴うかまたは伴わない特色または構成要素の各々を具体的に開示するものとして理解されるものとする。したがって、本明細書において、「Aおよび／またはB」などの語句において使用される「および／または」という用語は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」（単独）、および「B」（単独）を含むことを意図する。同様に、「A、B、および／またはC」などの語句において使用される「および／または」という用語は、以下の態様：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）の各々を包摂することを意図

40

50

する。

【0103】

本明細書を通して、「～を含む (comprise)」という語、または「～を含む (comprises)」もしくは「～を含むこと (comprising)」などの変化形は、言明された整数または整数の群の包含を含意するものであり、他のいずれの整数または整数の群の除外も含意するものではないと理解される。

【0104】

2. A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドおよび A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体

ある特定の態様では、本開示は、A c t R I I ポリペプチドおよびその使用（例えば、免疫応答の増加を必要とする対象における免疫応答の増加およびがんまたは病原体の処置）に関する。本明細書で使用する場合、「A c t R I I」という用語は、I I 型アクチビン受容体のファミリーを指す。このファミリーは、アクチビン受容体 I I A 型 (A c t R I I A) およびアクチビン受容体 I I B 型 (A c t R I I B) を含む。一部の態様では、本開示は、本明細書において概して、「A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体」または「A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体複合体」と称される、少なくとも1つの A c t R I I B ポリペプチドおよび少なくとも1つの A L K 4 ポリペプチドを含むヘテロ多量体およびその使用（例えば、免疫応答の増加を必要とする対象における免疫応答の増加およびがんまたは病原体の処置）に関する。

【0105】

本明細書で使用する場合、用語「A c t R I I B」とは、任意の種に由来するアクチビン受容体 I I B 型 (A c t R I I B) タンパク質のファミリーと、変異誘発または他の改変によるこのような A c t R I I B タンパク質に由来する改変体とを指す。本明細書における A c t R I I B に対する言及は、現在同定されている形態のうちの任意の1つに対する言及であるものと理解される。A c t R I I B ファミリーのメンバーは、一般に、システムインリッチな領域を含むリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび予測セリン／スレオニンキナーゼ活性を持つ細胞質ドメインから構成される、膜貫通タンパク質である。

【0106】

用語「A c t R I I B ポリペプチド」は、A c t R I I B ファミリーメンバーの任意の天然に存在するポリペプチド、ならびに、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、融合体およびペプチド模倣形態を含む）を含むポリペプチドを包含する。このような改変体 A c t R I I B ポリペプチドの例は、本開示を通して提供されるほか、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第 W O 2 0 0 6 / 0 1 2 6 2 7 号、同第 W O 2 0 0 8 / 0 9 7 5 4 1 号および同第 W O 2 0 1 0 / 1 5 1 4 2 6 号においても提供されている。本明細書で記載される、全ての A c t R I I B 関連ポリペプチドのアミノ酸の番号付けは、そうでないことが具体的に指示されない限りにおいて、下記で提供される、ヒト A c t R I I B 前駆体のタンパク質配列（配列番号1）の番号付けに基づく。

【0107】

ヒト A c t R I I B 前駆体のタンパク質配列は、以下の通りである。

10

20

30

40

50

【化 1】

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
 51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
 101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY

10

【化 2】

301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHGGL
 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 501 TNVDLPPKES SI (配列番号 1)

20

【0108】

シグナルペプチドは、一重下線で指し示し、細胞外ドメインは、太字フォントで指し示し、潜在的な、内因性N-連結グリコシル化部位は、二重下線で指し示す。

【0109】

プロセッシング後の細胞外A c t R I I Bポリペプチド配列は、以下の通りである。

【化 3】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD
 FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (配列番号 2)

30

【0110】

一部の実施形態では、タンパク質は、N末端における「SGR・・・」配列により生成することができる。細胞外ドメインのC末端「テール」は、一重下線で指し示す。「テール」を欠失させた配列(Δ15配列)は、以下の通りである。

【化 4】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDD
 FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (配列番号 3)

【0111】

配列番号1の64位においてアラニン(A64)を有するA c t R I I Bの形態についてはまた、文献、例えば、H i l d e n ら(1994年)、B l o o d、83巻(8号): 2163~2170頁を参照されたい、においても報告されている。A64置換を有するA c t R I I Bの細胞外ドメインを含むA c t R I I B-F c融合タンパク質は、アクチビンおよびGDF11に対するアフィニティが比較的低いことが確認された。これに対し、64位においてアルギニン(R64)を有する、同じA c t R I I B-F c融合タンパク質は、アクチビンおよびGDF11に対するアフィニティが、低nM~高pMの範囲である。したがって、R64を有する配列を、本開示におけるヒトA c t R I I Bのための「野生型」参照配列として使用する。

64位においてアラニンを有するA c t R I I Bの形態は、以下の通りである。

50

【化 5】

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
 51 GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
 101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELCHV AETMSRGLSY
 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK

10

【化 6】

351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQORDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG
 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPL
 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 501 TNVDLPPKES SI (配列番号 4)

【0112】

シグナルペプチドは、一重下線で指し示し、細胞外ドメインは、太字フォントで指し示す。

【0113】

代替的な A 6 4 形態の、プロセッシング後の細胞外 A c t R I I B ポリペプチド配列は、以下の通りである。

【化 7】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDD
 FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (配列番号 5)

【0114】

一部の実施形態では、タンパク質は、N末端における「SGR・・・」配列により生成することができる。細胞外ドメインのC末端「テール」は、一重下線で指し示す。「テール」を欠失させた配列（Δ 1 5 配列）は、以下の通りである。

【化 8】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDD
 FNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (配列番号 6)

【0115】

ヒト A c t R I I B 前駆体タンパク質をコードする核酸配列であって、A c t R I I B 前駆体のアミノ酸 1 ～ 5 1 3 をコードする、Genbank 参照配列 NM_001106.3 のヌクレオチド 2 5 ～ 1 5 6 0 を表す核酸配列を、下記（配列番号 7）に示す。示される配列は、6 4 位においてアルギニンを提示するが、代わりに、アラニンを提示するように改変することができる。シグナル配列に下線を付す。

20

30

40

50

【化 9】

1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
 51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
 101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
 151 GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG ACAGCCCCCA
 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC
 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCCTA
 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
 551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC

10

【化 10】

601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
 851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTCTCATAC
 901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
 951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG
 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (配列番号 7)

20

30

40

【0116】

プロセッシング後のヒト細胞外 A c t R I I B ポリペプチドをコードする核酸配列は、以下
 (配列番号 8) の通りである。示される配列は、64 位においてアルギニンを提示するが
 、代わりに、アラニンを提示するように改変することができる。

50

【化 1 1】

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACTG
 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC
 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
 301 GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC

10

(配列番号 8)

【0 1 1 7】

ヒト *ActRIIB* 細胞外ドメインおよびヒト *ActRIIA* 細胞外ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを、図 1 に例示する。このアラインメントは、両方の受容体内のアミノ酸残基であって、*ActRII* リガンドに直接接触すると考えられるアミノ酸残基を指し示す。例えば、複合 *ActRII* 構造は、*ActRIIB* リガンドの結合ポケットが、部分的に、残基 Y 31、N 33、N 35、L 38～T 41、E 47、E 50、Q 53～K 55、L 57、H 58、Y 60、S 62、K 74、W 78～N 83、Y 85、R 87、A 92、および E 94～F 101 により規定されることを指し示した。これらの位置では、保存的変異が許容されることが予測される。

20

【0 1 1 8】

加えて、*ActRIIB* は、完全に保存された細胞外ドメインの大きな連なりを伴って、脊椎動物間で良好に保存されている。例えば、図 2 は、多様な *ActRIIB* オーソログと比較してヒト *ActRIIB* 細胞外ドメインの多重配列アラインメントを描示する。*ActRIIB* に結合するリガンドの多くもまた、高度に保存されている。したがって、これらのアラインメントから、リガンド結合ドメイン内の鍵となるアミノ酸位置であって、正常な *ActRIIB* リガンド結合活性に重要なアミノ酸位置を予測するほか、正常な *ActRIIB* リガンド結合活性を著明に変更せずに、置換を許容する可能性が高いアミノ酸位置も予測することが可能である。したがって、本開示の方法に従い有用な活性ヒト *ActRIIB* 変体ポリペプチドは、別の脊椎動物 *ActRIIB* の配列に由来する、対応する位置における 1 つまたは複数のアミノ酸を含んでもよいし、ヒトまたは他の脊椎動物配列内の残基と類似する残基を含んでもよい。以下の例は、限定的であると意図せずに、活性 *ActRIIB* 変体を規定するこの手法を例示する。ヒト細胞外ドメイン（配列番号 103）内の L 46 は、*Xenopus* の *ActRIIB*（配列番号 105）ではバリンであるので、この位置は変更することができ、任意選択で、V、I、もしくは F などの別の疎水性残基、または A などの非極性残基に変更することができる。ヒト細胞外ドメイン内の E 52 は *Xenopus* では K であり、この部位が E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y およびおそらく A などの極性残基を含む、広範な変化を許容し得ることを示す。ヒト細胞外ドメイン内の T 93 は *Xenopus* では K であり、広範な構造バリエーションがこの位置で許容され、S、K、R、E、D、H、G、P、G および Y などの極性残基が好まれることを示す。ヒト細胞外ドメイン内の F 108 は *Xenopus* では Y であり、したがって Y または他の疎水性基、例えば I、V または L が許容されるはずである。ヒト細胞外ドメイン内の E 111 は *Xenopus* では K であり、D、R、K および H、ならびに Q および N を含む荷電残基がこの位置で許容されることを示す。ヒト細胞外ドメイン内の R 112 は *Xenopus* では K であり、R および H を含む塩基性残基がこの位置で許容されることを示す。ヒト細胞外ドメイン内の 119 位の A は、比較的保存が不良であり、齧歯動物では P として現れ、*Xenopus* では V として現れるので、この位置では、本質的に任意のアミノ酸が許容されるはずである。

30

40

50

【0119】

さらに、当該分野では、ActRIIタンパク質は、特にリガンド結合に関する、構造機能的特徴との関係で特徴付けられている [Attisanoら (1992年)、Cell、68巻 (1号) : 97~108頁; Greenwaldら (1999年)、Nature Structural Biology、6巻 (1号) : 18~22頁; Allendorphら (2006年)、PNAS、103巻 (20号) : 7643~7648頁; Thompsonら (2003年)、The EMBO Journal、22巻 (7号) : 1555~1566頁; ならびに米国特許第7,709,605号、同第7,612,041号、および同第7,842,663号]。本明細書の教示に加えて、これらの参考文献も、1つまたは複数の正常な活性 (例えば、リガンド結合活性) を保持するActRII B改変体をどのようにして生成するのかについての指針を十分に提供している。

10

【0120】

例えば、3フィンガーの毒素フォールドとして公知の構造モチーフを規定することは、I型受容体およびII型受容体によるリガンド結合に重要であり、各単量体の受容体の細胞外ドメイン内の様々な位置に配置された保存されたシステイン残基により形成される [Greenwaldら (1999年)、Nat Struct Biol、6巻 : 18~22頁; およびHinck (2012年)、FEBS Lett、586巻 : 1860~1870頁]。したがって、これらの保存されたシステインの最外殻により画されるようなヒトActRII Bのコアとなるリガンド結合性ドメインは、配列番号1 (ActRII B前駆体) の29~109位に対応する。これらのシステインによって画されるコア配列に隣接する構造的に秩序のより乏しいアミノ酸は、必ずしもリガンド結合性を変更することなく、N末端で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28残基だけ、かつ/またはC末端で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25残基だけ短縮することができる。N末端および/またはC末端短縮型についての例示的なActRII B細胞外ドメインとして、配列番号2、3、5、および6が挙げられる。

20

【0121】

Attisanoらは、ActRII Bの細胞外ドメインのC末端におけるプロリンノットの欠失が、受容体のアクチビンに対するアフィニティを低減することを示した。本明細書の配列番号1のアミノ酸20~119を含有するActRII B-Fc融合タンパク質である「ActRII B (20~119)-Fc」は、GDF11およびアクチビンへの結合が、プロリンノット領域と、完全膜近傍ドメインとを含むActRII B (20~134)-Fcと比べて低減されている (例えば、米国特許第7,842,663号を参照されたい)。しかし、ActRII B (20~129)-Fcタンパク質は、プロリンノット領域が破壊されていてもなお、野生型と比べてある程度低減されているが、同様の活性を保持する。

30

【0122】

よって、アミノ酸134、133、132、131、130および129 (配列番号1に関する) で終止するActRII B細胞外ドメインは全て、活性であることが予測されるが、134または133で終止する構築物は、最も活性であり得る。同様に、残基129~134 (配列番号1に関する) のいずれかにおける変異も、リガンド結合アフィニティを、大幅に変更することはないと予測される。この裏付けとして、当該分野では、P129およびP130 (配列番号1に関する) の変異は、リガンド結合を、実質的に減少しないことが公知である。したがって、本開示のActRII Bポリペプチドは、アミノ酸109 (最終システイン) という前方の位置で終結し得るが、109および119において、または109~119の間 (例えば、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118または119) で終結する形態は、リガンド結合が低減されることが予測される。アミノ酸119 (配列番号1に関する) は、保存が良好で

40

50

ないので、たやすく変更または切断される。128（配列番号1に関する）またはこの後方の位置で終結するA c t R I I BポリペプチドおよびA c t R I I Bに基づくG D Fトラップは、リガンド結合活性を保持するはずである。配列番号1に関して、119および127でまたは119～127の間（例えば、119、120、121、122、123、124、125、126または127）で終結するA c t R I I BポリペプチドおよびA c t R I I Bに基づくG D Fトラップは、中程度の結合能を有するであろう。これらの形態のいずれも、臨床状況または実験状況に応じて、使用が所望され得る。

【0123】

A c t R I I BのN末端では、アミノ酸29またはこの前方の位置（配列番号1に関する）で始まるタンパク質は、リガンド結合活性を保持することが予測される。アミノ酸29は、最初のシステインを表示する。24位（配列番号1に関する）における、アラニンからアスパラギンへの変異は、リガンド結合に実質的に影響を及ぼさず、N結合型グリコシル化配列を導入する〔米国特許第7,842,663号〕。これは、シグナル切断ペプチドとシステイン架橋領域との間の領域であって、アミノ酸20～29に対応する領域内の変異が、良好に許容されることを確認する。特に、20、21、22、23および24位（配列番号1に関する）に始まるA c t R I I BポリペプチドおよびA c t R I I Bに基づくG D Fトラップは、一般的なりガンド結合（binding）活性を保持するはずであり、25、26、27、28および29位（配列番号1に関する）に始まるA c t R I I BポリペプチドおよびA c t R I I Bに基づくG D Fトラップもまた、リガンド結合活性を保持すると予測される。例えば、米国特許第7,842,663号では、驚くべきことに、22、23、24または25で始まるA c t R I I B構築物は、最も大きな活性を有することが実証されている。

【0124】

まとめると、A c t R I I Bの活性部分（例えば、リガンド結合部分）の一般式は、配列番号1のアミノ酸29～109を含む。したがって、A c t R I I Bポリペプチドは、例えば、配列番号1のアミノ酸20～29のいずれか1つ（例えば、アミノ酸20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29のいずれか1つで始まる）に対応する残基で始まり、配列番号1のいずれか1つのアミノ酸109～134（例えば、アミノ酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、または134のいずれか1つで終わる）に対応する位置で終わるA c t R I I Bの部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなり得る。他の例として、配列番号1の20～29（例えば、20位、21位、22位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、または29位のいずれか1つ）または21～29（例えば、21位、22位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、または29位のいずれか1つ）の位置で始まり、配列番号1の119～134（例えば、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、または134位のいずれか1つ）、119～133（例えば、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、または133位のいずれか1つ）、129～134（例えば、129位、130位、131位、132位、133位、または134位のいずれか1つ）、または129～133（例えば、129位、130位、131位、132位、または133位のいずれか1つ）の位置で終わるポリペプチドが挙げられる。他の例として、配列番号1の20～24（例えば、20位、21位、22位、23位、または24位のいずれか1つ）、21～24（例えば、21位、22位、23位、または24位のいずれか1つ）、または22～25（例えば、22位、23位、または25位のいずれか1つ）の位置で始まり、配列番号1の109～13

10

20

30

40

50

4 (例えば、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、または134位のいずれか1つ)、119~134 (例えば、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、または134位のいずれか1つ) または129~134 (例えば、129位、130位、131位、132位、133位、または134位のいずれか1つ) の位置で終わる構築物が挙げられる。上述の範囲内の改変体、特に、配列番号1の対応する部分に対し少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む、から本質的になるまたはからなる改変体も想定される。

【0125】

本明細書で記載されている改変は、多様な形で組み合わせることができる。一部の実施形態では、ActRIIB改変体は、リガンド結合ポケット内の、1、2、5、6、7、8、9、10または15個を超えない保存的アミノ酸変化と、任意選択で、リガンド結合ポケットの40、53、55、74、79および／または82位における、0、1つまたはこれを超える非保存的変更とを含む。ばらつきが特に良好に許容され得る、結合ポケットの外側の部位は、細胞外ドメイン（上記で言及した）のアミノ末端およびカルボキシ末端と、42~46および65~73位（配列番号1に関する）とを含む。65位におけるアスパラギンからアラニンへの変更（N65A）は、R64バックグラウンドにおけるリガンド結合を減少させるとは思われない〔米国特許第7,842,663号〕。この変化はおそらく、バックグラウンドをA64とするときの、N65におけるグリコシル化を消失させることからこの領域内の著名な変化は、許容される可能性が高いことが実証される。R64A変化は、許容が不良であるが、R64Kは、許容が良好であるので、64位には、Hなど、別の塩基性残基も、許容され得る〔米国特許第7,842,663号〕。その上、当該分野で記載されている変異誘発プログラムの結果は、保存することが有益であることが多いアミノ酸位置がActRIIBに存在することを指し示す。配列番号1に関して、このような位置は、80位（酸性または疎水性アミノ酸）、78位（疎水性、特に、トリプトファン）、37位（酸性、特に、アスパラギン酸またはグルタミン酸）、56位（塩基性アミノ酸）、60位（疎水性アミノ酸、特に、フェニルアラニンまたはチロシン）を含む。よって、本開示は、ActRIIBポリペプチドにおいて保存され得るアミノ酸のフレームワークを提供する。保存することが所望され得る他の位置を次に挙げる：全て配列番号1に関する、52位（酸性アミノ酸）、55位（塩基性アミノ酸）、81位（酸性）、98（極性または荷電、特に、E、D、RまたはK）。

【0126】

ActRIIB細胞外ドメインへのさらなるN結合型グリコシル化部位（N-X-S/T）の付加の許容が良好であることがすでに実証されている（例えば、米国特許第7,842,663号を参照）。したがって、N-X-S/T配列は一般に、例えば、図1に定義されている、本開示のActRIIBポリペプチドにおけるリガンド結合ポケットの外側の位置に導入することができる。非内在性N-X-S/T配列の導入に特に適した部位は、アミノ酸20~29、20~24、22~25、109~134、120~134または129~134（配列番号1に関する）を含む。N-X-S/T配列は、ActRIIB配列およびFcドメインまたは他の融合構成成分の間のリンカーに、ならびに任意選択で、融合構成成分それ自体に導入することもできる。このような部位は、最小の労力で、既存のSもしくはTに関して正確な位置にNを導入することにより、または既存のNに対応する位置にSもしくはTを導入することにより、導入することができる。よって、N結合型グリコシル化部位を作製するであろう所望される変更を次に示す：A24N、R64N、S67N（おそらく、N65A変更と組み合わせた）、E105N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112SおよびR112T（配列番

10

20

30

40

50

号1に関する)。グリコシル化されると予測される任意のSは、グリコシル化によって提供される保護により、免疫原性部位を作製することなくTに変更され得る。同様に、グリコシル化されると予測される任意のTは、Sに変更され得る。よって、S67TおよびS44T（配列番号1に関する）の変更が想定される。同様に、A24N改変体において、S26T変更を使用することができる。したがって、本開示のActRIIBポリペプチドは、上述の通り1つまたは複数の追加的な非内在性N結合型グリコシル化コンセンサス配列を有する改変体となることができる。

【0127】

ある特定の実施形態では、本開示は、そのフラグメント、機能的な改変体および修飾形態、ならびにその使用（例えば、免疫応答の増加を必要とする患者における免疫応答の増加、およびがんの処置）を含む、少なくとも1つのActRIIBポリペプチドを含むActRIIBアンタゴニスト（阻害剤）に関する。好ましくは、ActRIIBポリペプチドは、可溶性である（例えば、ActRIIBの細胞外ドメイン）。一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、1つまたは複数のTGFβスーパーファミリーリガンド〔例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC、アクチビンE）、BMP6、GDF3、BMP10および／またはBMP9〕の活性（例えば、Smadシグナル伝達）をアンタゴナイズする。したがって、一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、1つまたは複数のTGFβスーパーファミリーリガンド〔例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC、アクチビンE）、BMP6、GDF3、BMP10および／またはBMP9〕に結合する。一部の実施形態では、本開示のActRIIBポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸20～29に対応する残基から始まり（例えば、アミノ酸20、21、22、23、24、25、26、27、28または29のいずれか1つから始まる）、配列番号1のアミノ酸109～134に対応する位置で終結する（例えば、アミノ酸109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133または134のいずれか1つで終結する）ActRIIBの部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなる。一部の実施形態では、ActRIIBポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸29～109と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、からなる、またはから本質的になる。一部の実施形態では、本開示のActRIIBポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸29～109と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、からなる、またはから本質的になり、配列番号1のL79に対応する位置は、酸性アミノ酸（自然発生の酸性アミノ酸DおよびEまたは人工の酸性アミノ酸）である。ある特定の実施形態では、本開示のActRIIBポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸25～131と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、からなる、またはから本質的になる。ある特定の実施形態では、本開示のActRIIBポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸25～131と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、からなる、またはから本質的になり、配列番号1のL79に対応する位置は、酸性アミノ酸である。一部の実施形態では、本開示のActRIIBポリペプチドは、配列番号1、2、3、4、5、6、58、59、60、

10

20

30

40

50

63、64、65、66、68、69、70、73、77、78、128、131、132および133のうちいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む、からなる、またはから本質的になる。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I Bポリペプチドは、配列番号1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、68、69、70、73、77、78、128、131、132および133のうちいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む、からなる、またはから本質的になり、配列番号1のL79に対応する位置は、酸性アミノ酸である。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I Bポリペプチドは、少なくとも1つのA c t R I I Bポリペプチドを含む、からなる、またはから本質的になり、配列番号1のL79に対応する位置は、酸性アミノ酸ではない（すなわち、自然発生の酸性（acid）アミノ酸DもしくはEまたは人工の酸性アミノ酸残基ではない）。

10

【0128】

ある特定の実施形態では、本開示は、A c t R I I Aポリペプチドに関する。本明細書で使用する場合、「A c t R I I A」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体I I A型（A c t R I I A）タンパク質のファミリー、および変異誘発または他の修飾によるこのようなA c t R I I Aタンパク質に由来する改変体を指す。本明細書におけるA c t R I I Aの参照は、現在同定された形態のいずれか1つの参照であると理解される。A c t R I I Aファミリーのメンバーは一般に、システインリッチ領域を含むリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および予測されるセリン／スレオニンキナーゼ活性を有す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。

20

【0129】

「A c t R I I Aポリペプチド」という用語は、A c t R I I Aファミリーメンバーの任意の自然発生のポリペプチド、および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、融合体およびペプチド模倣形態を含む）を含むポリペプチドを含む。このような改変体A c t R I I Aポリペプチドの例は、本開示を通して、ならびにこれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願公開番号WO2006/012627およびWO2007/062188において提供される。本明細書で記載されている全A c t R I I A関連ポリペプチドのアミノ酸のナンバリングは、他に特に表示がなければ、下に示すヒトA c t R I I A前駆体タンパク質配列（配列番号9）のナンバリングに基づく。

30

【0130】

ヒトA c t R I I A前駆体タンパク質配列を次に示す：

【化12】

```
1  MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC
51 YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV
101 YFCCCEGNMC NEKFSYFPPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI
151 AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVVKAR
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
```

40

50

【化 1 3】

401 CTAADGPVDE YMLPFEEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDIWQKHAG
 451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM
 501 VTNVDFPPKE SSL (配列番号 9)

【0 1 3 1】

シグナルペプチドは、一重下線によって指し示され；細胞外ドメインは、太字フォントで指し示され；潜在的内在性N結合型グリコシル化部位は、二重下線によって指し示される。

【0 1 3 2】

プロセシングされた細胞外ヒトA c t R I I Aポリペプチド配列を次に示す：

【化 1 4】

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDD
 INCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (配列番号 10)

【0 1 3 3】

細胞外ドメインのC末端「テール」は、一重下線によって指し示される。「テール」が欠失した配列（Δ 1 5 配列）を次に示す：

【化 1 5】

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDD
 INCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (配列番号 11)

【0 1 3 4】

ヒトA c t R I I A前駆体タンパク質をコードする核酸配列を、次のように下に示す（配列番号12）；Genbank参照配列NM_001616.4のヌクレオチド159～1700。シグナル配列に下線を引く。

【化 1 6】

1 ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GCGGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTC
 51 TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA
 101 ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT
 151 TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
 201 TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
 251 ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
 301 TATTTTGTGT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT
 351 TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC
 401 CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT
 451 GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC
 501 CTACCCCTCT GTACTTGTTC CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCACCTT
 551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG
 601 GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC
 651 TGTCAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG
 701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT
 751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC

10

20

30

40

50

【化 17】

801 AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG
 851 TCTCTTGGAA TGAAGTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG
 901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC
 951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAAAACAACC
 1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT TGAGGCTGGC
 1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC
 1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTTGA
 1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT GGCTTCTCGC
 1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA
 1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTGTGTC
 1301 ATAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA
 1351 ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA
 1401 AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA
 1451 GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTCACAATG
 1501 GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (配列番号 12)

10

20

【0135】

プロセシングされたヒト *ActRIIA* ポリペプチドをコードする核酸配列を次に示す：

【化 18】

1 ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTCTTTA ATGCTAATTG
 51 GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA
 101 AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC
 151 ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA
 201 CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTTGTT
 251 GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG
 301 GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC (配列番号 13)

30

【0136】

ActRIIA は、脊椎動物の間で十分に保存されており、細胞外ドメインの大きいストレッチが完全に保存されている。例えば、図3は、様々な *ActRIIA* オルソログと比較して、ヒト *ActRIIA* 細胞外ドメインの多重配列アライメントを描写する。*ActRIIA* に結合するリガンドの多くも高度に保存されている。したがって、これらのアライメントから、正常な *ActRIIA* -リガンド結合活性に重要なリガンド結合性ドメイン内の鍵となるアミノ酸位置を予測すると共に、正常な *ActRIIA* -リガンド結合活性を有意に変更することなく、置換に許容がある可能性があるアミノ酸位置を予測することが可能である。したがって、本明細書で開示されている方法に従って有用な活性ヒト *ActRIIA* 改変体ポリペプチドは、対応する位置に、別の脊椎動物 *ActRIIA* の配列由来の1つまたは複数のアミノ酸を含むことができる、またはヒトもしくは他の脊椎動物配列における残基と同様の残基を含むことができる。

40

【0137】

限定を意味するものではないが、次の例は、活性 *ActRIIA* 改変体を定義する本手法を説明する。図3に説明される通り、ヒト細胞外ドメイン内の F13 は、*Ovis aries* (配列番号 108)、*Gallus gallus* (配列番号 111)、*Bos T*

50

aurus（配列番号112）、Tyto alba（配列番号113）およびMyotis davidii（配列番号114）ActRIIAではYであり、F、WおよびYを含む芳香族残基がこの位置で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のQ24は、Bos Taurus ActRIIAではRであり、D、R、K、HおよびEを含む荷電残基がこの位置で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のS95は、Gallus gallusおよびTyto alba ActRIIAではFであり、E、D、K、R、H、S、T、P、G、Yなどの極性残基、およびおそらくL、IまたはFなどの疎水性残基を含む多種多様な変化がこの部位で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のE52は、Ovis aries ActRIIAではDであり、DおよびEを含む酸性残基がこの位置で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のP29は、比較的保存が不良であり、Ovis aries ActRIIAではS、Myotis davidii ActRIIAではLとして現れるので、この位置では、本質的に任意のアミノ酸が許容されるはずである。

【0138】

さらに、上記で論じた、ActRIIタンパク質は、構造／機能的特徴の観点から、特に、リガンド結合に関して、当該分野において特徴付けられた[Attisanoら（1992年）Cell 68巻（1号）：97～108頁；Greenwaldら（1999年）Nature Structural Biology 6巻（1号）：18～22頁；Allendorphら（2006年）PNAS 103巻（20号）：7643～7648頁；Thompsonら（2003年）The EMBO Journal 22巻（7号）：1555～1566頁；ならびに米国特許第7,709,605号、同第7,612,041号および同第7,842,663号]。本明細書の教示加えて、これらの参考文献は、1つまたは複数の所望の活性（例えば、リガンド結合活性）を保持するActRIIA改変体を、どのようにして生成するのかについての指針を、十分に提供している。

【0139】

例えば、3フィンガーの毒素フォールドとして公知の構造モチーフを規定することは、I型およびII型受容体によるリガンド結合に重要であり、単量体の各受容体の細胞外ドメイン内の様々な位置に配置された、保存的システイン残基により形成される[Greenwaldら（1999年）Nat Struct Biol 6巻：18～22頁；およびHinck（2012年）FEBS Lett 586巻：1860～1870頁]。したがって、これらの保存的システインの最外殻により画される、ヒトActRIIAの、コアとなるリガンド結合性ドメインは、配列番号9（ActRIIA前駆体）の30～110位に対応する。したがって、このようなシステインが画すコア配列に隣接する構造的に規則正しくないアミノ酸は、必ずしもリガンド結合を変更することなく、N末端において約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29残基、C末端において約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25残基で切断することができる。例示的なActRIIA細胞外ドメインの切断型は、配列番号10および11を含む。

【0140】

したがって、ActRIIAの活性部分（例えば、リガンド結合）の一般式は、配列番号9のアミノ酸30～110を含む、から本質的になる、またはからなるポリペプチドである。したがって、ActRIIAポリペプチドは、例えば、配列番号9のアミノ酸21～30のいずれか1つに対応する残基から始まり（例えば、アミノ酸21、22、23、24、25、26、27、28、29または30のいずれか1つから始まる）、配列番号9のアミノ酸110～135のいずれか1つに対応する位置で終結する（例えば、アミノ酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133または135のいずれか1つで終結する）ActRIIAの部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89

%、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、から本質的になる、またはからなることができる。他の例として、配列番号9の21~30（例えば、アミノ酸21、22、23、24、25、26、27、28、29または30のいずれか1つから始まる）、22~30（例えば、アミノ酸22、23、24、25、26、27、28、29または30のいずれか1つから始まる）、23~30（例えば、アミノ酸23、24、25、26、27、28、29または30のいずれか1つから始まる）、24~30（例えば、アミノ酸24、25、26、27、28、29または30のいずれか1つから始まる）から選択される位置から始まり、配列番号9の111~135（例えば、アミノ酸111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134または135のいずれか1つで終結する）、112~135（例えば、アミノ酸112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134または135のいずれか1つで終結する）、113~135（例えば、アミノ酸113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134または135のいずれか1つで終結する）、120~135（例えば、アミノ酸120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134または135のいずれか1つで終結する）、130~135（例えば、アミノ酸130、131、132、133、134または135のいずれか1つで終結する）、111~134（例えば、アミノ酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133または134のいずれか1つで終結する）、111~133（例えば、アミノ酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132または133のいずれか1つで終結する）、111~132（例えば、アミノ酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131または132のいずれか1つで終結する）または111~131（例えば、アミノ酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130または131のいずれか1つで終結する）から選択される位置で終結する構築物が挙げられる。上述の範囲内の改変体、特に、配列番号9の対応する部分に対し少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む、から本質的になるまたはからなる改変体も想定される。よって、一部の実施形態では、Ac tR I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸30~110と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるポリペプチドを含む、から本質的になる、またはからなることができる。任意選択で、Ac tR I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸30~110と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であり、リガンド結合ポケットに1、2、5、10または15個を超えない保存的アミノ酸変化を含む、ポリペプチドを含む。

【0141】

ある特定の実施形態では、本開示は、そのフラグメント、機能的な改変体および修飾形態

10

20

30

40

50

、ならびにその使用（例えば、免疫応答の増加を必要とする患者における免疫応答の増加、およびがんの処置）を含む少なくとも1つのA c t R I I Aポリペプチドを含むA c t R I I Aアンタゴニスト（阻害剤）に関する。好ましくは、A c t R I I Aポリペプチドは、可溶性である（例えば、A c t R I I Aの細胞外ドメイン）。一部の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、1つまたは複数のT G F β スーパーファミリーリガンド〔例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（アクチビンA、アクチビンB、アクチビンA B、アクチビンC、アクチビンE）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0および／またはB M P 9〕の（例えば、S m a dシグナル伝達）を阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、1つまたは複数のT G F β スーパーファミリーリガンド〔例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（アクチビンA、アクチビンB、アクチビンA B、アクチビンC、アクチビンE）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0および／またはB M P 9〕に結合する。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸21～30に対応する残基から始まり（例えば、アミノ酸21、22、23、24、25、26、27、28、29または30のいずれか1つから始まる）、配列番号9のアミノ酸110～135のいずれか1つに対応する位置で終結する（例えば、アミノ酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133または135のいずれか1つで終結する）A c t R I I Aの部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、から本質的になる、またはからなる。一部の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸30～110と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、からなる、またはから本質的になる。ある特定の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸21～135と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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、からなる、またはから本質的になる。一部の実施形態では、A c t R I I Aポリペプチドは、配列番号9、10、11、50、54および57のうちいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む、からなる、またはから本質的になる。

【0142】

ある特定の態様では、本開示は、G D Fトラップポリペプチド（「G D Fトラップ」とも称される）に関する。一部の実施形態では、本開示のG D Fトラップは、改変体A c t R I I Aポリペプチドが、対応する野生型A c t R I I Aポリペプチドよりも1つまたは複数の変更されたリガンド結合活性を有するような、A c t R I I Aポリペプチド（例えば、「野生型」または無修飾A c t R I I Aポリペプチド）の細胞外ドメイン（リガンド結合性ドメインとも称される）に1つまたは複数の変異（例えば、アミノ酸付加、欠失、置換、およびこれらの組合せ）を含む改変体A c t R I I Aポリペプチド（例えば、A c t R I I AおよびA c t R I I Bポリペプチド）である。好ましい実施形態では、本開示のG D Fトラップポリペプチドは、対応する野生型A c t R I I Aポリペプチドと同様の少なくとも1つの活性を保持する。例えば、好ましいG D Fトラップは、G D F 1 1および／またはG D F 8に結合し、その機能を阻害する（例えば、アンタゴナイズする）。一部の実施形態では、本開示のG D Fトラップは、T G F β スーパーファミリーのリガンドの1つまたは複数にさらに結合し、これを阻害する。したがって、本開示は、1つまたは複数のA c t R I I Aリガンドに対する結合特異性が変更したG D Fトラップポリペプチドを提供する。

【0143】

説明するために、アクチビン（アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンCおよび／またはアクチビンE）、特に、アクチビンAなど、1つまたは複数のActRII結合リガンドよりも、GDF11および／またはGDF8に対する変更されたリガンド結合性ドメインの選択性を増加させる1つまたは複数の変異を選択することができる。任意選択で、変更されたリガンド結合性ドメインは、野生型リガンド結合性ドメインに対する比と比べて少なくとも2、5、10、20、50、100またはさらには1000倍大きい、アクチビン結合に関する K_d の、GDF11および／またはGDF8結合に関する K_d に対する比を有する。任意選択で、変更されたリガンド結合性ドメインは、野生型リガンド結合性ドメインと比べて少なくとも2、5、10、20、50、100またはさらには1000倍大きい、アクチビンの阻害に関するIC₅₀の、GDF11および／またはGDF8の阻害に関するIC₅₀に対する比を有する。任意選択で、変更されたリガンド結合性ドメインは、アクチビンの阻害に関するIC₅₀よりも少なくとも2、5、10、20、50、100またはさらには1000倍低いIC₅₀で、GDF11および／またはGDF8を阻害する。

【0144】

ある特定の好ましい実施形態では、本開示のGDFトラップは、GDF11および／またはGDF8（ミオスタチンとしても公知）に優先的に結合するように設計される。任意選択で、GDF11および／またはGDF8結合トラップは、アクチビンBにさらに結合することができる。任意選択で、GDF11および／またはGDF8結合トラップは、BMP6にさらに結合することができる。任意選択で、GDF11および／またはGDF8結合トラップは、BMP10にさらに結合することができる。任意選択で、GDF11および／またはGDF8結合トラップは、アクチビンBおよびBMP6にさらに結合することができる。ある特定の実施形態では、本開示のGDFトラップは、例えば、野生型ActRIIポリペプチドと比較して、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンA/B、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE）に対し縮小された結合アフィニティを有する。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のGDFトラップポリペプチドは、アクチビンAに対し縮小された結合アフィニティを有する。

【0145】

ActRIIBタンパク質のアミノ酸残基（例えば、配列番号1に関してE39、K55、Y60、K74、W78、L79、D80およびF101）は、ActRIIBリガンド結合ポケットに存在し、例えば、アクチビンA、GDF11およびGDF8を含むそのリガンドへの媒介性結合に役立つ。よって、本開示は、これらのアミノ酸残基に1つまたは複数の変異を含む、ActRIIB受容体の変更されたリガンド結合性ドメイン（例えば、GDF8/GDF11結合性ドメイン）を含むGDFトラップポリペプチドを提供する。

【0146】

具体例として、ActRIIBのリガンド結合性ドメインの正に荷電したアミノ酸残基Asp（D80）を異なるアミノ酸残基へと変異させて、GDF8に優先的に結合するが、アクチビンに結合しないGDFトラップポリペプチドを産生することができる。好ましくは、配列番号1に関するD80残基は、無電荷アミノ酸残基、負のアミノ酸残基および疎水性アミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基へと変化させられる。さらに別の具体例として、配列番号1の疎水性残基L79を変更させて、変更されたアクチビン-GDF11/GDF8結合特性を付与することができる。例えば、L79P置換は、アクチビン結合よりも大きな程度までGDF11結合を低減する。対照的に、酸性アミノ酸[アスパラギン酸またはグルタミン酸；L79DまたはL79E置換]によるL79の置き換えは、GDF11結合アフィニティを保持しつつ、アクチビンA結合アフィニティを大幅に低減する。例示的な実施形態では、本明細書で記載されている方法は、任意選択で1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換、付加または欠失と組み合わせた、配列番号1の79位に対応する位置に酸性アミノ酸（例えば、DまたはE）を含む改変体ActRIIBポリペプチドであるGDFトラップポリペプチドを利用する。

【0147】

ある特定の態様では、本開示は、A L K 4ポリペプチドおよびその使用（例えば、免疫応答の増加を必要とする患者における免疫応答の増加、およびがんまたは病原体の処置）に関する。本明細書で使用する場合、「A L K 4」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体様キナーゼ-4タンパク質のファミリー、および変異誘発または他の修飾によるこのようなA L K 4タンパク質に由来する改変体を指す。本明細書におけるA L K 4の参照は、現在同定された形態のいずれか1つの参照であると理解される。A L K 4ファミリーのメンバーは一般に、システインリッチ領域を有するリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および予測されるセリン／スレオニンキナーゼ活性を有す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。

10

【0148】

用語「A L K 4ポリペプチド」は、A L K 4ファミリーメンバーの任意の天然に存在するポリペプチドのほか、有用な活性を保持する任意のその改変体（変異体、フラグメント、融合体、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。本明細書で記載される、全てのA L K 4関連ポリペプチドのアミノ酸の番号付けは、そうでないことが具体的に指示されない限りにおいて、下記のヒトA L K 4前駆体のタンパク質配列（配列番号14）の番号付けに基づく。

【0149】

ヒトA L K 4前駆体のタンパク質配列（NCBI参照配列NP_004293）は、以下の通りである。

20

【化19】

1 MAESAGASSE FPLVLLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
 ACMVSIFNLD
 61 GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSIDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS
 GHLKEPEHPS
 121 **MWGPVELVGI** IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE
 MCLSKDKTLQ
 181 DLVYDLSTSG SGSGLPFLVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD
 VAVKIFSSRE
 241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL
 FDYLNRYTVT
 301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA
 IADLGLAVRH
 361 DAVTDTIDIA PNQRVGTRKY MAPEVLDETI NMKHFDSFKC ADIYALGLVY
 WEIARRCNSG
 421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG
 KMMRECWYAN
 481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (配列番号 14)

30

40

【0150】

シグナルペプチドは、一重下線で指し示し、細胞外ドメインは、太字フォントで指し示す。

【0151】

プロセッシング後の細胞外ヒトA L K 4ポリペプチド配列は、以下の通りである。

50

【化 2 0】

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSI FNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPFYCL
SSEDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (配列番号 15)

【0152】

A L K 4 前駆体タンパク質をコードする核酸配列を、下記（配列番号 16）に示し、G e n b a n k 参照配列 NM_004302.4 のヌクレオチド 78～1592 に対応する。
シグナル配列に下線を付し、細胞外ドメインを太字のフォントで指し示す。

【化 2 1】

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCCGGCAG
CGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGG
CCAACCTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATG
GAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTA
CTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGA
TCGACTTGAGGGTGCCCACTGGTTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCG
GTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCCGGTGTTCCTCCTGTTCCCTCATCATCATCATTGT
TTTCCTTGTCATTAACCTATCATCAGCGTGTCTATCACAAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAG
ATCCCTCATGTGAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTC
TCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCCGAACCAT
CGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCGCTGGAGGG
GTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCA
GAGATATAACAGACGGTCATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAA
TAAAGATAATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTTTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCC
TGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCT
GCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGAAGCCTGGAAT
TGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAG
CAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCATGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCCGAAT
CAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAA
ACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTG
CTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTG
CCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAA
CATCCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGGAAGATGATGCGAGAGT

【化 2 2】

GTTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCTCCCAG
CTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (配列番号 16)

【0153】

細胞外 A L K 4 ポリペプチドをコードする核酸配列は、以下の通りである。

10

20

30

40

【化 2 3】

TCCGGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCCAACTA
CACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACC
ATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTG
AGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTT
GAGGGTGCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCGGTGGAG
(配列番号 17)

10

【0154】

ヒト A L K 4 前駆体タンパク質配列の代替アイソフォームであるアイソフォーム B (N C B I 参照配列 N P _ 0 6 4 7 3 2 . 3) を次に示す：

【化 2 4】

1 MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH
61 LKEPEHPSMW GPVELVGIIA GPVFLFLII IIVFLVINYH QRVYHNRQRL DMEDPSCMC
121 LSKDKTLQDL VYDLSTSGSG SGLPLFVQRT VARTIVLQEI IGKGRFGEVW RGRWRGGDVA
181 VKIFSSREER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS DYHEHGSLEF
241 YLNRYTVTIE GMIKLALSAA SGLAHLHMEI VGTQGKPGIA HRDLKSKNIL VKKNGMCAIA
301 DLGLAVRHDA VTDITIDIAPN QRVGTKRYMA PEVLDETINM KHFDSEFKCAD IYALGLVYWE
361 IARRCNSSGV HEEYQLPYD LVPSDPSIEE MRKVVCQKL RPNIPNWWQS YEALRVMGKM
421 MRECWYANGA ARLTALRIKK TLSQLSVQED VKI (配列番号 18)

20

細胞外ドメインは、太字フォントで指し示されている。

【0155】

プロセッシングされた細胞外 A L K 4 ポリペプチド配列を次に示す：

【化 2 5】

1 MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH
61 LKEPEHPSMW GPVE (配列番号 19)

30

【0156】

A L K 4 前駆体タンパク質 (アイソフォーム B) をコードする核酸配列を下に示し (配列番号 20)、これは、G e n b a n k 参照配列 N M _ 0 2 0 3 2 7 . 3 のヌクレオチド 1 8 6 ~ 1 5 4 7 に対応する。細胞外ドメインをコードするヌクレオチドは、太字フォントで指し示されている。

40

【化 2 6】

1 ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG
51 CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA
101 GCTCGGAGGA CCTGCGCAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC
151 AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC
201 GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AGCTGGTAGG CATCATCGCC GGCCCGGTGT
251 TCCTCCTGTT CCTCATCATC ATCATTGTTT TCCTTGTCAT TAACTATCAT
301 CAGCGTGTCT ATCACAACCG CCAGAGACTG GACATGGAAG ATCCCTCATG

50

【化 27】

```

351 TGAGATGTGT CTCTCCAAAG ACAAGACGCT CCAGGATCTT GTCTACGATC
401 TCTCCACCTC AGGGTCTGGC TCAGGGTTAC CCCTCTTTGT CCAGCGCACA
451 GTGGCCCGAA CCATCGTTTT ACAAGAGATT ATTGGCAAGG GTCGGTTTTGG
501 GGAAGTATGG CGGGGCCGCT GGAGGGGTGG TGATGTGGCT GTGAAAATAT
551 TCTCTTCTCG TGAAGAACGG TCTTGGTTCA GGGAAGCAGA GATATACCAG
601 ACGGTCATGC TGCGCCATGA AAACATCCTT GGATTTATTG CTGCTGACAA
651 TAAAGATAAT GGCACCTGGA CACAGCTGTG GCTTGTCTCT GACTATCATG
701 AGCACGGGTC CCTGTTTGAT TATCTGAACC GGTACACAGT GACAATTGAG
751 GGGATGATTA AGCTGGCCTT GTCTGCTGCT AGTGGGCTGG CACACCTGCA
801 CATGGAGATC GTGGGCACCC AAGGGAAGCC TGGAATTGCT CATCGAGACT
851 TAAAGTCAAA GAACATTCTG GTGAAGAAAA ATGGCATGTG TGCCATAGCA
901 GACCTGGGCC TGGCTGTCCG TCATGATGCA GTCACGACA CCATTGACAT
951 TGCCCCGAAT CAGAGGGTGG GGACCAAACG ATACATGGCC CCTGAAGTAC
1001 TTGATGAAAC CATTAATATG AAACACTTTG ACTCCTTTAA ATGTGCTGAT
1051 ATTTATGCCC TCGGGCTTGT ATATTGGGAG ATTGCTCGAA GATGCAATTC
1101 TGGAGGAGTC CATGAAGAAT ATCAGCTGCC ATATTACGAC TTAGTGCCCT
1151 CTGACCCTTC CATTGAGGAA ATGCGAAAGG TTGTATGTGA TCAGAAGCTG
1201 CGTCCCAACA TCCCCAATG GTGGCAGAGT TATGAGGCAC TGCGGGTGAT
1251 GGGGAAGATG ATGCGAGAGT GTTGGTATGC CAACGGCGCA GCCCGCCTGA
1301 CGGCCCTGCG CATCAAGAAG ACCCTCTCCC AGCTCAGCGT GCAGGAAGAC
1351 GTGAAGATCT AA ( 配列番号 20)

```

10

【0157】

細胞外 A L K 4 ポリペプチド (アイソフォーム B) をコードする核酸配列を次に示す：

【化 28】

```

1 ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG
51 CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA
101 GCTCGGAGGA CCTGCGCAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC
151 AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC
201 GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AGCTGGTAGG ( 配列番号 21)

```

20

【0158】

A L K 4 は、脊椎動物間で、完全に保存された細胞外ドメインの大きな連なりを伴って、良好に保存されている。例えば、図 4 は、多様な A L K 4 オーソログと比較してヒト A L K 4 細胞外ドメインの多重配列アラインメントを描示する。A L K 4 に結合するリガンドの多くもまた、高度に保存されている。したがって、これらのアラインメントからは、リガンド結合性ドメイン内の鍵となるアミノ酸位置であって、通常の A L K 4 - リガンドの結合活性に重要なアミノ酸位置を予測することが可能であるほか、通常の A L K 4 - リガンドの結合活性を顕著に変更させずに、置換に対して許容性を有する可能性が高いアミノ酸位置を予測することも可能である。したがって、本開示の方法に従い有用な活性ヒト A L K 4 改変体ポリペプチドは、別の脊椎動物 A L K 4 の配列に由来する、対応する位置における 1 つまたは複数のアミノ酸を含んでもよいし、ヒトまたは他の脊椎動物配列内の残基と類似する残基を含んでもよい。

30

【0159】

限定を意味するものではないが、次の例は、活性 A L K 4 改変体を定義するこの手法を説明する。図 4 において説明される通り、ヒト A L K 4 細胞外ドメイン (配列番号 115) 内の V 6 は、Mus musculus A L K 4 (配列番号 119) ではイソロイシンであることから、この位置を変更することができ、任意選択で、Gallus gallus A L K 4 (配列番号 118) に観察される通り、L、I もしくは F などの別の疎水性残基または A などの非極性残基へと変更することができる。ヒト細胞外ドメイン内の E 40 は、Gallus gallus A L K 4 では K であり、E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y などの極性残基およびおそらく A などの非極性残基を含む多種多様な変化がこの部位で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内の S 15 は、Gallus gallus A L K 4 では D であり、幅広い構造改変が、この位置で許容されることが

40

50

指し示され、S、T、R、E、K、H、G、P、GおよびYなど、極性残基が好ましい。ヒト細胞外ドメイン内のE40は、*Gallus gallus* ALK4ではKであり、D、R、K、Hを含む荷電残基ならびにQおよびNが、この位置で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のR80は、*Condylura cristata* ALK4（配列番号116）ではKであり、R、KおよびHを含む塩基性残基が、この位置で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のY77は、*Sus scrofa* ALK4（配列番号120）ではFであり、F、WおよびYを含む芳香族残基が、この位置で許容されることが指し示される。ヒト細胞外ドメイン内のP93は、比較的保存が不良であり、*Erinaceus europaeus* ALK4（配列番号117）ではSとして、*Gallus gallus* ALK4ではNとして現れるので、この位置では、本質的に任意のアミノ酸が許容されるはずである。

10

【0160】

さらに、当該分野では、ALK4タンパク質は、特にリガンド結合に関する、構造機能的特徴との関係で特徴付けられている[例えば、Harrisonら（2003年）、*J Biol Chem*、278巻（23号）：21129～21135頁；Romanoら（2012年）、*J Mol Model*、18巻（8号）：3617～3625頁；およびCalvaneseら（2009年）、15巻（3号）：175～183頁]。本明細書の教示に加えて、これらの参考文献も、1つまたは複数の正常な活性（例えば、リガンド結合活性）を保持するALK4変異体をどのようにして生成するのかについての指針を十分に提供している。

20

【0161】

例えば、3フィンガーの毒素フォールドとして公知の構造モチーフを規定することは、I型受容体およびII型受容体によるリガンド結合に重要であり、単量体の各受容体の細胞外ドメイン内の様々な位置に配置された、保存的システイン残基によって形成される[Greenwaldら（1999年）*Nat Struct Biol* 6巻：18～22頁；およびHinck（2012年）*FEBS Lett* 586巻：1860～1870頁]。したがって、これらの保存的システインの最外殻により画される、ヒトALK4の、コアとなるリガンド結合性ドメインは、配列番号14（ALK4前駆体）の34～101位に対応する。このようなシステインが画すコア配列に隣接する構造的に規則正しくないアミノ酸は、必ずしもリガンド結合を変更することなく、N末端において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33残基、および／またはC末端において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24もしくは25残基で切断することができる。N末端および／またはC末端切断のための例示的なALK4細胞外ドメインは、配列番号15および19を含む。

30

【0162】

したがって、ALK4の活性部分（例えば、リガンド結合部分）の一般式は、配列番号14に関するアミノ酸34～101を含む。したがって、ALK4ポリペプチドは、例えば、配列番号14のアミノ酸24～34のいずれか1つ（例えば、アミノ酸24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、または34のいずれか1つで始まる）に対応する残基で始まり、配列番号14の任意の1つのアミノ酸101～126（例えば、アミノ酸101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、または126のいずれか1つで終わる）に対応する位置で終わるALK4の部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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んでもよいし、から本質的になってもよいし、からなってもよい。他の例として、配列番号14の24～34（例えば、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、

40

50

31位、32位、33位、または34位のいずれか1つ)、25~34(例えば、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、または34位のいずれか1つ)、または26~34(例えば、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、または34位のいずれか1つ)の位置で始まり、配列番号14の101~126(例えば、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、または126位のいずれか1つ)、102~126(例えば、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、または126位のいずれか1つ)、101~125(例えば、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、または125位のいずれか1つ)、101~124(例えば、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、または124位のいずれか1つ)、101~121(例えば、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、または121位のいずれか1つ)、111~126(例えば、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、または126位のいずれか1つ)、111~125(例えば、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、または125位のいずれか1つ)、111~124(例えば、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、または124位のいずれか1つ)、121~126(例えば、121位、122位、123位、124位、125位、または126位のいずれか1つ)、121~125(例えば、121位、122位、123位、124位、または125位のいずれか1つ)、121~124(例えば、121位、122位、123位、または124位のいずれか1つ)、または124~126(例えば、124位、125位、または126位のいずれか1つ)の位置で終わる構築物が挙げられる。これらの範囲内の改変体、特に配列番号14の対応する部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するもの、もまた企図される。

【0163】

本明細書に記載のバリエーションは、様々な形で組み合わせることができる。一部の実施形態では、ALK4改変体は、1、2、5、6、7、8、9、10または15以下の保存的アミノ酸変化をリガンド結合ポケットに含む。結合ポケット外の部位(変動が特によく許容され得る)は細胞外ドメインのアミノおよびカルボキシ末端を含む(上記)。

【0164】

ある特定の実施形態では、本開示は、そのフラグメント、機能的な改変体および修飾形態、ならびにその使用(例えば、免疫応答の増加を必要とする患者における免疫応答の増加、およびがんの処置)を含む、少なくとも1つのALK4ポリペプチドを含むヘテロ多量体であるActRIIアンタゴニスト(阻害剤)に関する。好ましくは、ALK4ポリペプチドは、可溶性である(例えば、ALK4の細胞外ドメイン)。一部の実施形態では、ALK4ポリペプチドを含むヘテロ多量体は、1つまたは複数のTGFβスーパーファミ

10

20

30

40

50

リーリガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（アクチビン A、アクチビン B、アクチビン A B、アクチビン C、アクチビン E）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0 および／または B M P 9] の（例えば、S m a d シグナル伝達）を阻害する。一部の実施形態では、A L K 4 ポリペプチドを含むヘテロ多量体は、1 つまたは複数の T G F β スーパーファミリーリガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（アクチビン A、アクチビン B、アクチビン A B、アクチビン C、アクチビン E）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0 および／または B M P 9] に結合する。一部の実施形態では、ヘテロ多量体は、配列番号 1 4 に関するアミノ酸 3 4 ~ 1 0 1 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % 同一である少なくとも 1 つの A L K 4 ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ヘテロ多量体は、配列番号 1 4、1 5、1 8、1 9、7 3、7 4、7 6、7 7、7 9 および 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である少なくとも 1 つの A L K 4 ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ヘテロ多量体は、配列番号 1 4、1 5、1 8、1 9、7 4、7 6、7 9、8 0、1 4 3 および 1 4 5 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である少なくとも 1 つの A L K 4 ポリペプチドからなるまたはから本質的になる少なくとも 1 つの A L K 4 ポリペプチドを含む。

【0165】

ある特定の態様では、本開示は、その使用（例えば、免疫応答の増加を必要とする患者における免疫応答の増加、およびがんの処置）を含む、本明細書において概して「A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体複合体」または「A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体」と称される、1 つまたは複数の A L K 4 受容体ポリペプチド（例えば、配列番号 1 4、1 5、1 8、1 9、7 4、7 6、7 9、8 0、1 4 3 および 1 4 5 ならびにこれらの改変体）および 1 つまたは複数の A c t R I I B 受容体ポリペプチド（例えば、配列番号 1、2、3、4、5、6、5 8、5 9、6 0、6 3、6 4、6 5、6 6、6 8、6 9、7 0、7 1、7 3、7 7、7 8、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 9、1 4 1 およびこれらの改変体）を含むヘテロ多量体複合体に関する。好ましくは、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、可溶性である [例えば、ヘテロ多量体複合体は、A L K 4 受容体の可溶性部分（ドメイン）および A c t R I I B 受容体の可溶性部分（ドメイン）を含む]。一般に、A L K 4 および A c t R I I B の細胞外ドメインは、このような受容体の可溶性部分に対応する。したがって、一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、A L K 4 受容体の細胞外ドメインおよび A c t R I I B 受容体の細胞外ドメインを含む。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、1 つまたは複数の T G F β スーパーファミリーリガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（アクチビン A、アクチビン B、アクチビン A B、アクチビン C、アクチビン E）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0 および／または B M P 9] の（例えば、S m a d シグナル伝達）を阻害する。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、1 つまたは複数の T G F β スーパーファミリーリガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（アクチビン A、アクチビン B、アクチビン A B、アクチビン C、アクチビン E）、B M P 6、G D F 3、B M P 1 0 および／または B M P 9] に結合する。一部の実施形態では、A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、配列番号 1 4、1 5、1 8、1 9、7 4、7 6、7 7、7 9、8 0、1 4 3 および 1 4 5 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一である配列を含む、から本質的になる、またはからなる少なくとも 1 つの A L K 4 ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示の A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体複合体は、配列番号 1 4 のアミノ酸 2 4 ~ 3 4、2 5 ~ 3 4 または 2 6 ~ 3 4 のいずれか 1 つに対応する残基から

10

20

30

40

50

始まり、配列番号14の101～126、102～126、101～125、101～124、101～121、111～126、111～125、111～124、121～126、121～125、121～124または124～126由来の位置で終結するALK4の部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、からなる少なくとも1つのALK4ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ALK4:ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号14に関するアミノ酸34～101と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、からなる少なくとも1つのALK4ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ALK4-ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号1、2、3、4、5、6、58、59、60、63、64、65、66、68、69、70、71、73、77、78、131、132、133、139、141のうちいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、からなる少なくとも1つのActRIIBポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のALK4:ActRIIBヘテロ多量体複合体は、配列番号1のアミノ酸20～29、20～24、21～24、22～25または21～29のいずれか1つに対応する残基から始まり、109～134、119～134、119～133、129～134または129～133由来の位置で終結するActRIIBの部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、からなる少なくとも1つのActRIIBポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ALK4:ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号1のアミノ酸29～109と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、からなる少なくとも1つのActRIIBポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ALK4:ActRIIBヘテロ多量体は、配列番号1のアミノ酸25～131と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、からなる少なくとも1つのActRIIBポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本開示のALK4:ActRIIBヘテロ多量体複合体は、配列番号1のL79に対応する位置が酸性アミノ酸ではない（すなわち、自然発生のDもしくはEアミノ酸残基または人工の酸性アミノ酸残基ではない）少なくとも1つのActRIIBポリペプチドを含む。本開示のALK4:ActRIIBヘテロ多量体は、例えば、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体およびさらにより高次のオリゴマー構造を含む。例えば、図21～図23を参照されたい。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のヘテロ多量体複合体は、ALK4:ActRIIBヘテロ二量体である。

【0166】

一部の実施形態では、本開示は、治療効率または安定性（例えば、保管寿命およびin vivo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を目的として、ALK4ポリペプチドおよび／またはActRIIPポリペプチドの構造を修飾することにより、機能的な改変体の作製することを想定する。改変体は、アミノ酸置換、欠失、付加またはこれらの組合せによって産生することができる。例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンによる、アスパラギン酸のグルタミン酸による、スレオニンのセリンによる単離された置き換え、またはアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸による同様の置き換え（例えば、保存的変異）に、その結果得られる分子の生物活性に主要な効果がないことを予測するのは妥当である。保存的置き換えは、その側鎖に関連するアミノ酸のファミリー内で

10

20

30

40

50

起こる置き換えである。本開示のポリペプチドのアミノ酸配列の変化が、機能的なホモログをもたらすか否かは、野生型ポリペプチドと同様の様式で、細胞における応答を産生する、または例えば、BMP 2、BMP 2 / 7、BMP 3、BMP 4、BMP 4 / 7、BMP 5、BMP 6、BMP 7、BMP 8 a、BMP 8 b、BMP 9、BMP 10、GDF 3、GDF 5、GDF 6 / BMP 13、GDF 7、GDF 8、GDF 9 b / BMP 15、GDF 11 / BMP 11、GDF 15 / MIC 1、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC、nodal、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、ニューロツリン、アルテミン、パーセフィン、MIS、およびLeftyを含む1つもしくは複数のリガンドに結合する、改変体ポリペプチドの能力を評価することにより容易に決定することができる。

【0167】

ある特定の実施形態では、本開示は、ポリペプチドのグリコシル化を変更することができるような、ALK 4 ポリペプチドおよび／またはActRIIポリペプチドの特異的な変異を想定する。このような変異は、O結合型またはN結合型グリコシル化部位など、1つまたは複数のグリコシル化部位を導入するまたは消失させることができるように選択することができる。アスパラギン結合型グリコシル化認識部位は一般に、適切な細胞グリコシル化酵素によって特異的に認識されるトリペプチド配列である、アスパラギン-X-スレオニンまたはアスパラギン-X-セリン（式中、「X」は任意のアミノ酸である）を含む。変更は、ポリペプチドの配列への1つまたは複数のセリンまたはスレオニン残基の付加またはこれによる置換（O結合型グリコシル化部位のため）によって為すこともできる。グリコシル化認識部位の1番目または3番目のアミノ酸位置の一方または両方における種々のアミノ酸置換または欠失（および／または2番目の位置におけるアミノ酸欠失）は、修飾されたトリペプチド配列における非グリコシル化をもたらす。ポリペプチドにおける炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的または酵素によるカップリングによる。使用されるカップリング機序に応じて、（a）アルギニンおよびヒスチジン；（b）遊離カルボキシル基；（c）システインの遊離スルフヒドリル基など、遊離スルフヒドリル基；（d）セリン、スレオニンもしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基など、遊離ヒドロキシル基；（e）フェニルアラニン、チロシンもしくはトリプトファンの芳香族残基など、芳香族残基；または（f）グルタミンのアミド基に、糖（複数可）を接合することができる。ポリペプチドに存在する1つまたは複数の炭水化物部分の除去は、化学的および／または酵素により達せられることができる。化学的脱グリコシルは、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または均等な化合物へのポリペプチドの曝露が関与し得る。この処置は、アミノ酸配列をインタクトに保ちながら、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）を除いた大部分または全ての糖の切断をもたらす。ポリペプチドにおける炭水化物部分の酵素による切断は、Thotakuraら [Meth. Enzymol. (1987年) 138巻：350頁] によって記載されている通り、種々のエンド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、ポリペプチドの配列は、使用される発現系の種類に応じて適宜調整することができる。一般に、ヒトにおける使用のための本開示のActRIIポリペプチド、ALK 4 ポリペプチドおよびヘテロ多量体は、HEK 293 またはCHO細胞系など、適したグリコシル化をもたらす哺乳動物細胞系において発現させることができるが、他の哺乳動物発現細胞系も同様に、有用であることが予測される。

【0168】

本開示は、変異体、特に、ALK 4 および／またはActRIIポリペプチドならびに切断型変異体のコンビナトリアル変異体のセットを生成する方法をさらに想定する。コンビナトリアル変異体のプールは、機能的に活性である（例えば、TGF β スーパーファミリールリガンド結合）ALK 4 および／またはActRII配列の同定に特に有用である。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示し、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、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドおよびA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体改変体は、1つまたは複数のT G F -ベータスーパーファミリーリガンド（例えば、B M P 2、B M P 2 / 7、B M P 3、B M P 4、B M P 4 / 7、B M P 5、B M P 6、B M P 7、B M P 8 a、B M P 8 b、B M P 9、B M P 10、G D F 3、G D F 5、G D F 6 / B M P 13、G D F 7、G D F 8、G D F 9 b / B M P 15、G D F 11 / B M P 11、G D F 15 / M I C 1、T G F β 1、T G F β 2、T G F β 3、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンAC、n o d a l、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ニューラルツリン、アルテミン、パーセフィン、M I S、およびL e f t y）に結合する、T G F β スーパーファミリー受容体へのT G F β スーパーファミリーリガンドの結合を予防する、および／またはT G F -ベータスーパーファミリーリガンドに起因するシグナル伝達に干渉する能力に関してスクリーニングすることができる。

【0169】

A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体の活性は、細胞に基づくアッセイまたはi n v i v o で試験することもできる。例えば、がん細胞におけるがん成長に関与する遺伝子の発現におけるA c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体の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T G F -ベータスーパーファミリーリガンドタンパク質（例えば、B M P 2、B M P 2 / 7、B M P 3、B M P 4、B M P 4 / 7、B M P 5、B M P 6、B M P 7、B M P 8 a、B M P 8 b、B M P 9、B M P 10、G D F 3、G D F 5、G D F 6 / B M P 13、G D F 7、G D F 8、G D F 9 b / B M P 15、G D F 11 / B M P 11、G D F 15 / M I C 1、T G F β 1、T G F β 2、T G F β 3、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC、n o d a l、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ニューラルツリン、アルテミン、パーセフィン、M I S、およびL e f t y）の存在下で行うことができ、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体（heteromultimers）および任意選択でT G F β スーパーファミリーリガンドを産生することができるように、細胞をトランスフェクトすることができる。同様に、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体ヘテロ多量体をマウスまたは他の動物に投与することができ、当該分野で認識されている方法を使用して、筋肉形成および強度など、1つまたは複数の測定値を評価することができる。同様に、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドもしくはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体またはその改変体の活性は、例えば、本明細書で記載されているアッセイおよび当該分野の共通知識のアッセイによって、がん細胞において、このような細胞の成長におけるいずれかの効果に関して試験することができる。S M A D 応答性レポーター遺伝子は、このような細胞系において使用して、下流シグナル伝達における効果をモニタリングすることができる。

【0170】

参照A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体と比べて増加した選択性または全般的に増加した効力を有するコンビナトリアル由来改変体を生成することができる。このような改変体は、組換えDNA構築物から発現される場合、遺伝子療法プロトコルにおいて使用することができる。同様に、変異誘発は、対応する無修飾A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体とは劇的に異なる細胞内半減期を有する改変体を生じることができる。例えば、変更されたタンパク質は、無修飾ポリペプチドのタンパク質分解または破壊もしくはそうでなければ不活性化をもたらす他の細胞過程に対する安定性をより高く、または安定性をより低くすることができる。このような改変体およびこれをコードする遺伝子を利用して、ポリペプチドの半減期をモジュレートすることにより、ポリペプ

10

20

30

40

50

チド複合体レベルを変更することができる。例えば、短い半減期は、より一過性の生物学的効果を生じることができ、誘導性発現系の一部の場合、細胞内における組換えポリペプチド複合体レベルのより厳密な制御を可能にすることができる。Fc融合タンパク質において、変異を、リンカー（あるとすれば）および／またはFc部分に為して、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチドまたはALK4:ActRIIBヘテロ多量体の半減期を変更することができる。

【0171】

コンビナトリアルライブラリーは、潜在的ALK4および／またはActRII配列の少なくとも部分をそれぞれ含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーとして産生することができる。例えば、潜在的ALK4および／またはActRIIコードヌクレオチド配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、より大きい融合タンパク質（例えば、ファージディスプレイのための）のセットとして発現できるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物は、遺伝子配列へと酵素によりライゲーションすることができる。

【0172】

潜在的な相同体のライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から生成し得る、多くの方式が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動式DNA合成器で実行することができ、次いで、合成遺伝子は、発現に適切なベクターにライゲーションすることができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当該分野で周知である[Narang, SA (1983年)、Tetrahedron, 39巻:3頁; Itakuraら (1981年)、Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton編、Amsterdam, Elsevier, 273~289頁; Itakuraら (1984年)、Annu. Rev. Biochem., 53巻:323頁; Itakuraら (1984年)、Science, 198巻:1056頁; Ikeら (1983年)、Nucleic Acid Res., 11巻:477頁]。このような技法は、他のタンパク質の指向進化で利用されている[Scottら、(1990年)、Science, 249巻:386~390頁; Robertsら (1992年)、PNAS USA, 89巻:2429~2433頁; Devlinら (1990年)、Science, 249巻:404~406頁; Cwirllaら、(1990年)、PNAS USA, 87巻:6378~6382頁のほか、米国特許第5,223,409号、同第5,198,346号、および同第5,096,815号]。

【0173】

あるいは、他の形態の変異誘発を利用して、コンビナトリアルライブラリーを生成することができる。例えば、本開示のActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチドまたはALK4:ActRIIBヘテロ多量体は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発[Ruffら (1994年) Biochemistry 33巻:1565~1572頁; Wangら (1994年) J. Biol. Chem. 269巻:3095~3099頁; Balintら (1993年) Gene 137巻:109~118頁; Grodbergら (1993年) Eur. J. Biochem. 218巻:597~601頁; Nagashimaら (1993年) J. Biol. Chem. 268巻:2888~2892頁; Lowmanら (1991年) Biochemistry 30巻:10832~10838頁; およびCunninghamら (1989年) Science 244巻:1081~1085頁]を使用したスクリーニングによって、リンカースキャニング変異誘発[Gustinら (1993年) Virology 193巻:653~660頁; およびBrownら (1992年) Mol. Cell Biol. 12巻:2644~2652頁; McKnightら (1982年) Science 232巻:316頁]によって、飽和変異誘発[Meyersら (1986年) Science 232巻:613頁]によって; PCR変異誘発[Leungら (1989年) Method Cell Mol Biol 1巻:11~19頁]によって; または化学的変異誘発[Millerら (1992年) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; およびGreenerら (1994年) Strategies in Mol Biol 7巻:32~34頁]

を含むランダム変異誘発によってライブラリーから生成および単離することができる。特にコンビナトリアル状況におけるリンカースキャニング変異誘発は、トランケート（生物活性）形態の A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドを同定するための魅力的な方法である。

【0174】

点変異および切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、また、そのことについては、ある特定の特性を有する遺伝子産物に関して c D N A ライブラリーをスクリーニングするための広範囲の技法が当該分野で公知である。このような技法は一般に、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたは A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適応可能となるであろう。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広く使用されている技法は典型的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングする工程と、その結果得られるベクターライブラリーにより適切な細胞を形質転換する工程と、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの相対的に容易な単離を促進する条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させる工程とを含む。好ましいアッセイは、T G F - ベータリガンド（例えば、B M P 2、B M P 2 / 7、B M P 3、B M P 4、B M P 4 / 7、B M P 5、B M P 6、B M P 7、B M P 8 a、B M P 8 b、B M P 9、B M P 1 0、G D F 3、G D F 5、G D F 6 / B M P 1 3、G D F 7、G D F 8、G D F 9 b / B M P 1 5、G D F 1 1 / B M P 1 1、G D F 1 5 / M I C 1、T G F β 1、T G F β 2、T G F β 3、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン A B、アクチビン A C、n o d a l、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ニューロリン、アルテミン、パーセフィン、M I S、および L e f t y）結合アッセイおよび／または T G F - ベータリガンド媒介性細胞シグナル伝達アッセイを含む。

【0175】

ある特定の実施形態では、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたは A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドに自然に存在するいずれかに加えて、翻訳後修飾をさらに含むことができる。このような修飾として、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、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたは A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、ポリエチレングリコール、脂質、多糖または単糖およびリン酸塩など、非アミノ酸エレメントを含むことができる。A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドまたは A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体の機能性におけるこのような非アミノ酸エレメントの効果は、他のヘテロ多量体複合体改変体に関して本明細書に記載されている通り試験することができる。本開示のポリペプチドが、細胞において新生形態のポリペプチドを切断することにより産生される場合、翻訳後プロセッシングがタンパク質の正確なフォールディングおよび／または機能に重要となることもできる。異なる細胞（例えば、C H O、H e L a、M D C K、2 9 3、W I 3 8、N I H - 3 T 3 または H E K 2 9 3）は、このような翻訳後活性に特異的な細胞の仕組みおよび特徴的機構を有し、A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドの正確な修飾およびプロセッシングを確実にするように選択することができる。

【0176】

ある特定の態様では、本開示の A c t R I I ポリペプチドおよび／または A L K 4 ポリペプチドは、A c t R I I ポリペプチド（例えば、A c t R I I A または A c t R I I B ポリペプチド）または A L K 4 ポリペプチドの少なくとも部分（ドメイン）および 1 つまたは複数の異種部分（ドメイン）を含む融合タンパク質である。このような融合ドメインの周知の例として、ポリヒスチジン、G l u - G l u、グルタチオン S - トランスフェラーゼ（G S T）、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（F c）、マルトース結合タンパク質（M B P）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、所望の特性を付与することができるよう

に選択することができる。例えば、一部の融合ドメインは、アフィニティ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のため、グルタチオン、アミラーゼおよびニッケルまたはコバルトコンジュゲート樹脂など、アフィニティクロマトグラフィーのための関連するマトリックスが使用される。このようなマトリックスの多くは、(HIS₆) 融合パートナーと共に有用な Pharmacia GST 精製システムおよび QIAexpress (商標) システム (Qiagen) など、「キット」形態で利用できる。別の例として、融合ドメインは、ActRII ポリペプチドの検出を促進することができるように選択することができる。このような検出ドメインの例として、様々な蛍光タンパク質 (例えば、GFP) と共に、通常、特異的抗体を利用できる短いペプチド配列である、「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体を容易に利用できる周知のエピトープタグは、FLAG、インフルエンザウイルス赤血球凝集素 (HA) および c-myc タグを含む。一部の事例では、融合ドメインは、関連するプロテアーゼが、融合タンパク質を部分的に消化し、これにより、そこから組換えタンパク質を遊離させることを可能にする、第 Xa 因子またはトロンビンに対応する部位など、プロテアーゼ切断部位を有する。続いて、その後のクロマトグラフィー分離によって、融合ドメインから遊離されたタンパク質を単離することができる。選択することができる他の種類の融合ドメインは、例えば、免疫グロブリン由来の定常ドメイン (例えば、Fc ドメイン) を含む、多量体化 (例えば、二量体形成、四量体形成) ドメインおよび機能ドメイン (追加的な生物学的機能を付与する) を含む。本明細書で記載されている通り、一部の実施形態では、好ましい多量体化ドメインは、非対称的ペア形成を促進して、ヘテロ多量体構造 (例えば、ALK4: ActRIIB ヘテロ多量体) を形成する、修飾された Fc ドメインである。

【0177】

ある特定の態様では、本開示の ActRII ポリペプチドおよび／または ALK4 ポリペプチドは、ポリペプチドを「安定化」することができる1つまたは複数の修飾を含有する。「安定化」とは、破壊減少、腎臓によるクリアランス減少または薬剤の他の薬物動態効果によるものか否かに関係なく、in vitro 半減期、血清半減期を増加させることを意味する。例えば、このような修飾は、ポリペプチドの保管寿命を増強する、ポリペプチドの循環半減期を増強する、および／またはポリペプチドのタンパク質分解を低減する。このような安定化修飾として、融合タンパク質 (例えば、ActRII ポリペプチドまたは ALK4 ポリペプチドドメインおよびスタビライザードメインを含む融合タンパク質を含む)、グリコシル化部位の修飾 (例えば、本開示のポリペプチドへのグリコシル化部位の付加を含む) および炭水化物部分の修飾 (例えば、本開示のポリペプチドからの炭水化物部分の除去を含む) が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書で使用する場合、「スタビライザードメイン」という用語は、融合タンパク質の場合のような融合ドメイン (例えば、免疫グロブリン Fc ドメイン) を指すだけではなく、ポリエチレングリコールなど、炭水化物部分または非タンパク質性部分など、非タンパク質性修飾も含む。ある特定の好ましい実施形態では、ActRII ポリペプチドおよび／または ALK4 ポリペプチドは、ポリペプチドを安定化する異種ドメイン (「スタビライザー」ドメイン)、好ましくは、in vivo でポリペプチドの安定性を増加させる異種ドメインと融合される。免疫グロブリンの定常ドメイン (例えば、Fc ドメイン) との融合体は、広範囲のタンパク質に所望される薬物動態特性を付与す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体は、所望される安定化特性を付与することができる。

【0178】

一部の実施形態では、本開示の ALK4 および／または ActRII ポリペプチドは、Fc 融合タンパク質である。ヒト IgG1 の Fc 部分 (G1Fc) に使用することができるネイティブアミノ酸配列の例を下に示す (配列番号 22)。点線の下線は、ヒンジ領域を指し示し、実線の下線は、自然発生の改変体を有する位置を指し示す。一部には、本開示は、配列番号 22 に対し 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、9

10

20

30

40

50

9 % または 100 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、から本質的になるまたはからなるポリペプチドを提供する。G1Fcにおける自然発生の改変体は、配列番号22 (UniProt P01857を参照) で使用されるナンバリング方式に従ったE134DおよびM136Lを含むであろう。

【化29】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSEEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK ( 配列番号 22)

```

10

【0179】

任意選択で、IgG1 Fcドメインは、Asp-265、リジン322およびAsn-434などの残基に1つまたは複数の変異を有する。ある特定の事例では、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IgG1 Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べて、Fcγ受容体への結合能が低減される。他の事例では、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IgG1 Fcドメインと比べて、MHCクラスI関連Fc受容体 (FcRN) への結合能が増加する。

20

【0180】

ヒトIgG2のFc部分 (G2Fc) に使用することができるネイティブアミノ酸配列の例を下に示す (配列番号23)。点線の下線は、ヒンジ領域を指し示し、二重下線は、配列にデータベース矛盾が存在する位置を指し示す (UniProt P01859に従う)。一部には、本開示は、配列番号23に対し70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む、から本質的になるまたはからなるポリペプチドを提供する。

【化30】

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPM L DSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

```

30

【化31】

```

201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK ( 配列番号 23)

```

【0181】

ヒトIgG3のFc部分 (G3Fc) に使用することができるアミノ酸配列の2つの例を下に示す。G3Fcにおけるヒンジ領域は、他のFc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。下に示す第1のG3Fc配列 (配列番号24) は、単一の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G3Fc配列 (配列番号25) は、全長ヒンジ領域を含有する。各事例では、点線の下線は、ヒンジ領域を指し示し、実線の下線は、UniProt P01859に従った自然発生の改変体を有する位置を指し示す。一部には、本開示は、配列番号24または25に対し70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む、から本質的になるまたはからなるポリペプチドを提供する。

40

50

【化 3 2】

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK ( 配列番号 24)

```

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK ( 配列番号 25)

```

10

【0182】

G3Fc (例えば、Uniprot P01860を参照) における自然発生の改変体は、配列番号24で使用するナンバリング方式へと変換された場合のE68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Yを含み、本開示は、これらの改変の1つまたは複数を含むG3Fc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IgG3遺伝子 (IGHG3) は、異なるヒンジの長さによって特徴付けられる構造多型を示す [Uniprot P01859を参照]。特に、改変体WISは、V領域の大部分およびCH1領域の全体を欠いている。これは、ヒンジ領域に正常に存在する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領域の全体およびヒンジの一部を欠く。改変体OMMは、アレル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1つまたは複数を含むG3Fcドメインを含む追加的な融合タンパク質を提供する。

20

30

【0183】

ヒトIgG4のFc部分 (G4Fc) に使用することができるネイティブアミノ酸配列の例を下に示す (配列番号26)。点線の下線は、ヒンジ領域を指し示す。一部には、本開示は、配列番号26に対し70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む、から本質的になるまたはからなるポリペプチドを提供する。

【化 3 3】

```

1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK ( 配列番号 26)

```

40

【0184】

G1Fc配列 (配列番号22) に関してFcドメインにおける種々の操作された変異が本明細書に提示されており、G2Fc、G3FcおよびG4Fcにおける類似の変異は、図18におけるG1Fcとそれらとのアライメントに由来し得る。不等なヒンジの長さにより、アイソタイプアライメント (図18) に基づく類似のFc位置は、配列番号22、2

50

3、24、25および26において異なるアミノ酸番号を保有する。ナンバリングが、UniProtデータベースに見られるIgG1重鎖定常ドメイン全体（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3領域からなる）を包摂する場合、ヒンジ、CH2およびCH3領域からなる免疫グロブリン配列（例えば、配列番号22、23、24、25および26）における所与のアミノ酸位置が、同じ位置とは異なる番号によって同定されるであろうと察知することもできる。例えば、ヒトG1Fc配列（配列番号22）、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン（UniProt P01857）およびヒトIgG1重鎖における選択されたCH3位置の間の対応を次に示す。

【表1-1】

異なるナンバリング方式におけるCH3位置の対応		
G1Fc (ナンバリングは、ヒンジ領域における第1のスレオニンから始まる)	IgG1 重鎖定常ドメイン (ナンバリングは、CH1から始まる)	IgG1 重鎖 (Kabatら、1991年*のEUナンバリングスキーム)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366

【表1-2】

L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
*Kabatら(編)1991年; <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 第5版、1巻、NIH, Bethesda, MD の688～696頁。		

【0185】

ある特定の態様では、本明細書に開示されているポリペプチドは、少なくとも1つのAcetRIB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少なくとも1つのALK4ポリペプチドを含む、タンパク質複合体を形成することができる。好ましくは、本明細書に開示されているポリペプチドは、ヘテロ二量体複合体を形成するが、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体およびさらなるオリゴマー構造などが挙げられるがこれらに限定されない、より高次のヘテロ多量体複合体（ヘテロ多量体）も含まれる（例えば、図21～図23を参照）。一部の実施形態では、ALK4および／またはAcetRIBポリペプチドは、少なくとも1つの多量体化ドメインを含む。本明細書で開示される通り、「多量体化ドメイン」という用語は、少なくとも第1のポリペプチドおよび少なくとも第2のポリペプチドの間の共有結合または非共有結合相互作用を促進する、あるアミノ酸または一連のアミノ酸を指す。本明細書に開示されているポリペプチドは、共有結合または非共有結合により、多量体化ドメインに接続することができる。好ましくは、多量体化ドメインは、第1のポリペプチド（例えば、ALK4ポリペプチド）および第2のポリペプチド（例えば、AcetRIBポリペプチド）の間の相互作用を促進して、ヘテロ多量体形成（例え

ば、ヘテロ二量体形成)を促進し、任意選択で、ホモ多量体形成(例えば、ホモ二量体形成)を邪魔するか、またはそうでなければ忌避し、これにより、所望のヘテロ多量体(例えば、図22を参照)の収量を増加させる。

【0186】

当該分野で公知の多くの方法を使用して、ALK4:ActRIIBヘテロ多量体を生成することができる。例えば、天然には生じないジスルフィド結合は、フリーのチオールが第2のポリペプチド(例えば、ActRIIBポリペプチド)上の別のフリーのチオール含有残基と相互作用して、ジスルフィド結合が第1のポリペプチドと、第2のポリペプチドとの間で形成されるように、第1のポリペプチド(例えば、ALK4ポリペプチド)上で、天然に生じるアミノ酸をシステインなどのフリーのチオール含有残基で置きかえることにより構築することができる。ヘテロ多量体の形成を促進する相互作用の追加の例は、Kjaergaardら、WO2007147901などに記載されているイオン性相互作用; Kannanら、U.S. 8,592,562などに記載されている静電ステアリング効果; Christensenら、U.S. 20120302737などに記載されているコイルドコイル相互作用; PackおよびPlueckthun、(1992年)、Biochemistry、31巻:1579~1584頁などに記載されているロイシンジッパー; およびPackら、(1993年)、Bio/Technology、11巻:1271~1277頁などに記載されているヘリックスターンヘリックスモチーフを含むが、これらに限定されない。多様なセグメントの連結は、例えば、化学的架橋、ペプチドリンカー、ジスルフィド架橋などによる共有結合、またはアビジン-ビオチンなどによるアフィニティ相互作用、またはロイシンジッパー技術を介して得ることができる。

【0187】

ある特定の態様では、多量体化ドメインは、相互作用ペアの1つの構成成分を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に開示のポリペプチドは、第2のポリペプチドに共有結合的または非共有結合的に会合した第1のポリペプチドを含むタンパク質複合体を形成することができる。ここで、第1のポリペプチドは、ALK4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のポリペプチドは、ActRIIBポリペプチドのアミノ酸配列および相互作用ペアの第2のメンバーのアミノ酸配列を含む。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であり得るが、実効的な実施形態はホモ二量体の複合体を形成することができる相互作用ペアもまた利用し得る。相互作用ペアの1つのメンバーは、例えば、配列番号2、3、5、6、15、および19のいずれか1つと少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、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の配列を含むか、から本質的になるか、またはからなるポリペプチド配列を含む本明細書に記載されるようなALK4またはActRIIBポリペプチドに融合されてもよい。血清半減期の延長などの特性/活性の改善を付与するように相互作用ペアを選択することもでき、特性/活性の改善をもたらすように別の部分をその上に結合させるアダプターとして作用するように相互作用ペアを選択することもできる。例えば、ポリエチレングリコール部分を、相互作用ペアの構成要素の一方または両方へと結合させて、血清半減期の改善などの特性/活性の改善をもたらすことができる。

【0188】

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であってもよく、これは、ペアのメンバーが、自己会合よりも優先的に互い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(例えば、図22を参照)。代替的に、相互作用ペア非誘導型であってもよく、これは、アのメンバーが、実質的な優先性なく互いに会合することも自己会合することもでき、そのため、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。したがって、非誘導相互作用ペアの第1および第2のメンバーは会合して、ホモ二量体複合体またはヘテロ二量体の複合体を形成してもよい。任意選択で、相互作用ペアの第1のメン

バー（例えば、非対称ペアまたは非誘導相互作用ペア）は、共有結合的に相互作用ペアの第2のメンバーに会合する。任意選択で、相互作用ペアの第1のメンバー（例えば、非対称ペアまたは非誘導相互作用ペア）は、非共有結合的に相互作用ペアの第2のメンバーに会合する。

【0189】

具体例として、本開示は、ヘテロ多量体形成を促進するように修飾された、ヒトIgG1、IgG2、IgG3および／またはIgG4に由来するCH1、CH2またはCH3ドメインなど、免疫グロブリンの定常ドメインを含むポリペプチドに融合されたALK4またはActRIIBを含む融合タンパク質を提供する。単一の細胞系からの非対称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。二特異性抗体の生産において顕著に直面する通り、鎖会合課題は、単一の細胞系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間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係る[Kleinら(2012年)mAbs 4巻:653~663頁]。同じ細胞において2つの異なる重鎖および2つの異なる軽鎖が産生される場合、この問題は最も急を要し、この事例では、典型的には1通りのみが望まれる場合に、総計16通りの可能な鎖の組合せ（これらのうちいくつかは同一であるが）が存在する。にもかかわらず、同じ原理は、2つの異なる（非対称）重鎖のみを組み込む所望の多重鎖融合タンパク質の収量縮小を説明する。

【0190】

単一細胞株においてFc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[Kleinら(2012年)mAbs 4巻:653~663頁;およびSpiesら(2015)、Molecular Immunology 67(2A):95-106]。Fc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SEEDbodyペア形成およびロイシンジッパーベースのペア形成が挙げられるがこれらに限定されない[Ridgwayら(1996年)Protein Eng 9巻:617~621頁;Merchantら(1998年)Nat Biotech 16巻:677~681頁;Davisら(2010年)Protein Eng Des Sel 23巻:195~202頁;Gunasekaranら(2010);285:19637-19646;Wranićら(2012)J Biol Chem 287:43331-43339;US 5932448;WO1993/011162;WO2009/089004およびWO2011/034605]。本明細書において記載されるように、これらの方法を使用して、ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ多量体複合体を生成することができる。例えば、図23を参照のこと。

【0191】

ALK4:ActRIIBヘテロ多量体およびこのようなヘテロ多量体を作製する方法は、以前に開示されている。例えば、その教示全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO2016/164497を参照されたい。

【0192】

融合タンパク質（例えば、免疫グロブリンFc融合タンパク質）の異なるエレメントを、所望の機能性と一貫した任意の様式で配列することができることが理解される。例えば、ActRIIポリペプチドドメインまたはALK4ポリペプチドドメインは、異種ドメインに対しC末端に設置することができる、あるいは、異種ドメインは、ActRIIポリペプチドドメインまたはALK4ポリペプチドドメインに対しC末端に設置することができる。ActRIIポリペプチドドメインまたはALK4ポリペプチドドメインおよび異種ドメインは、融合タンパク質において隣接している必要はなく、追加的なドメインまたはアミノ酸配列が、いずれかのドメインに対しCもしくはN末端にまたはドメイン間に含まれていてよい。

【0193】

例えば、A c t R I I（またはA L K 4）受容体融合タンパク質は、式A-B-Cに表記されているアミノ酸配列を含むことができる。B部分は、A c t R I I（またはA L K 4）ポリペプチドドメインに対応する。AおよびC部分は独立して0、1つまたは2つ以上のアミノ酸となることができ、AおよびC部分の両方は、存在する場合、Bにとって異種である。Aおよび／またはC部分は、リンカー配列を介してB部分に接合することができる。リンカーは、グリシン（例えば、2～10、2～5、2～4、2～3個のグリシン残基）またはグリシンおよびプロリン残基リッチとなることができ、例えば、スレオニン／セリンおよびグリシンの単一の配列、またはスレオニン／セリンおよび／またはグリシンの反復配列、例えば、G G G（配列番号27）、G G G G（配列番号28）、T G G G G（配列番号29）、S G G G G（配列番号30）、T G G G（配列番号31）、S G G G（配列番号32）またはG G G G S（配列番号33）シングレットまたは反復を含有することができる。ある特定の実施形態では、A c t R I I（またはA L K 4）融合タンパク質は、式A-B-C（式中、Aは、リーダー（シグナル）配列であり、Bは、A c t R I I（A L K 4）ポリペプチドドメインからなり、Cは、in vivo安定性、in vivo半減期、取り込み／投与、組織局在もしくは分布、タンパク質複合体の形成、および／または精製のうち1つまたは複数を増強するポリペプチド部分である）に表記されているアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、A c t R I I（A L K 4）融合タンパク質は、式A-B-C（式中、Aは、T P Aリーダー配列であり、Bは、A c t R I I（またはA L K 4）受容体ポリペプチドドメインからなり、Cは、免疫グロブリンF cドメインである）に表記されているアミノ酸配列を含む。好ましい融合タンパク質は、配列番号50、54、57、58、60、63、64、66、70、71、73、74、76、77、78、79、80、123、128、131、132、139、141、143および145のいずれか1つに表記されているアミノ酸配列を含む。

【0194】

あるいは、A c t R I Iアンタゴニストは、本明細書で記載されている通り1つまたは複数の単鎖リガンドトラップを含むことができ、このトラップは任意選択で、1つまたは複数のA L K 4またはA c t R I I Bポリペプチドおよび追加的なA L K 4：A c t R I I B単鎖リガンドトラップと共有結合または非共有結合により会合してよい〔U S 2 0 1 1／0 2 3 6 3 0 9およびU S 2 0 0 9／0 0 1 0 8 7 9〕。図27を参照されたい。本明細書で記載されている通り、単鎖リガンドトラップは、多価となるのにコイルドコイルF cドメインなどの任意の多量体化ドメインへの融合を要求しない。一般に、本開示の単鎖リガンドトラップは、少なくとも1つのA L K 4ポリペプチドドメインおよび1つのA c t R I I Bポリペプチドドメインを含む。本明細書において概して、結合性ドメイン（B D）と称されるA L K 4およびA c t R I I Bポリペプチドドメインは任意選択で、リンカー領域によって接続されていてよい。A L K 4：A c t R I I B単鎖リガンドトラップは、以前に記載された。例えば、それぞれの教示全体が参照により本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 6／1 6 4 4 9 7を参照されたい。

【0195】

ある特定の好ましい実施形態では、本明細書で記載されている方法に従って使用されるべきA c t R I Iポリペプチド、A L K 4ポリペプチドおよびA L K 4：A c t R I I Bヘテロ多量体は、単離された複合体である。本明細書で使用する場合、単離されたタンパク質（またはタンパク質複合体）またはポリペプチド（またはポリペプチド複合体）は、その天然環境の構成成分から分離されたものである。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドまたはヘテロ多量体は、例えば、電気泳動（例えば、S D S-P A G E、等電点電気泳動（I E F）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換または逆相H P L C）によって決定された場合、95%、96%、97%、98%または99%超の純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法は、当該分野で周知である〔Flatmanら、（2007年）J. Chromatogr. B 848巻：79～87頁〕。

【0196】

ある特定の実施形態では、本開示のA c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドおよびA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体は、種々の当該分野で公知の技法によって產生することができる。例えば、本開示のポリペプチドは、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) に記載されている技法など、標準タンパク質化学技法を使用して合成することができる。加えて、自動ペプチド合成機が市販されている (A d v a n c e d C h e m T e c h M o d e l 396 ; M i l l i g e n / B i o s e a r c h 9600)。あるいは、そのフラグメントまたは改変体を含む本開示のポリペプチドおよび複合体は、当該分野で周知の通り、様々な発現系 [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、組換えにより產生することができる。さらなる実施形態では、本開示の修飾または無修飾ポリペプチドは、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、ペプシンまたは対形成塩基性アミノ酸変換酵素 (P A C E) を使用することにより、組換えにより產生された全長A L K 4 および / またはA c t R I I B ポリペプチドの消化によって產生することができる。コンピュータ解析 (市販のソフトウェア、例えば、Mac Vector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc. を使用) 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。

【0197】

3. A c t R I I および / またはA L K 4 ポリペプチドをコードする核酸

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されているA c t R I I および / またはA L K 4 ポリペプチド (そのフラグメント、機能的な改変体および融合タンパク質を含む) をコードする、単離されたおよび / または組換えの核酸を提供する。例えば、配列番号16は、自然発生のヒトA L K 4 前駆体ポリペプチドをコードし、配列番号17は、A L K 4 のプロセッシングされた細胞外ドメインをコードする。対象核酸は、一本鎖または二本鎖となることができる。このような核酸は、DNAまたはRNA分子となることができる。これらの核酸は、例えば、本明細書で記載されている通りのA c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチドおよびA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体を作製するための方法において使用することができる。

【0198】

本明細書で使用する場合、単離核酸とは、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸は、その核酸分子を通常含有するが、その核酸分子が染色体外またはその天然の染色体位置と異なる染色体位置に存在する細胞内に含有される核酸分子を含む。

【0199】

ある特定の実施形態では、本開示のA L K 4 またはA c t R I I ポリペプチドをコードする核酸は、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146ならびにその改変体のいずれか1つを含むと理解される。改変体ヌクレオチド配列は、アレル改変体を含む、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って異なる配列を含み、したがって、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146のいずれか1つに表示されているヌクレオチド配列とは異なるコード配列を含むであろう。

【0200】

ある特定の実施形態では、本開示のA L K 4 またはA c t R I I ポリペプチドは、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%

、96%、97%、98%、99%または100%同一である配列を含む、から本質的になる、またはからなる単離されたまたは組換えの核酸配列によってコードされる。当業者は、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である配列と相補的な配列を含む、から本質的になる、またはからなる核酸配列も、本開示の範囲内にあることを察知するであろう。さらなる実施形態では、本開示の核酸配列は、単離されていても、組換えであっても、および／または異種ヌクレオチド配列と融合されていてよい、またはDNAライブラリー中に存在してもよい。

10

【0201】

他の実施形態では、本開示の核酸は、ストリンジェントな条件下で、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146に表示されているヌクレオチド配列、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146の相補体配列、またはそのフラグメントにハイブリダイズするヌクレオチド配列も含む。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件が変動し得ることを容易に理解するであろう。例えば、6.0×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、約45℃でハイブリダイゼーションを行い、続いて2.0×SSC、50℃の洗浄を行うことができる。例えば、洗浄工程における塩濃度は、約2.0×SSC、50℃の低ストリンジェンシーから、約0.2×SSC、50℃の高ストリンジェンシーまで選択することができる。加えて、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へと増加させることができる。温度および塩の両方を変動させることができる、または他の変数を変化させつつ、温度もしくは塩濃度を一定に保つことができる。一実施形態では、本開示は、2×SSC、室温の洗浄が続いて行われる6×SSC、室温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

30

【0202】

遺伝暗号の縮重のため、配列番号7、8、12、13、16、17、20、21、55、61、67、72、75、124、125、126、127、129、130、134、135、136、137、138、140、142、144および146に表記されている核酸とは異なる単離された核酸も、本開示の範囲内にある。例えば、多数のアミノ酸が、2つ以上のトリプレットによって表示される。同じアミノ酸を指定するコドンまたは同義（例えば、CAUおよびCACは、ヒスチジンの同義である）は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を与えない「サイレント」変異をもたらすことができる。しかし、対象タンパク質のアミノ酸配列に変化を生じるDNA配列多型が、哺乳動物細胞の間に存在するであろうと予測される。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1つまたは複数のヌクレオチド（ヌクレオチドの最大約3～5%）におけるこのような改変が、天然のアレル改変により、所与の種の個体間に存在し得ることを察知するであろう。ありとあらゆるこのようなヌクレオチド改変およびその結果得られるアミノ酸多型は、本開示の範囲内にある。

40

【0203】

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

50

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。一部の実施形態では、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、使用される宿主細胞により変化する。

10

【0204】

本開示の特定の態様では、本主題の核酸は、A L K 4 および／または A c t R I I 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、A L K 4 および／または A c t R I I 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、A L K 4 および／または A c t R I I 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。

20

30

【0205】

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部分を、原核細胞、真核細胞（酵母、鳥類、昆虫または哺乳動物）のいずれか一方または両方における発現に適したベクターにライゲーションすることにより産生することができる。組換えTGFβスーパーファミリーI型および／またはII型受容体ポリペプチドの産生のための発現ビヒクルは、プラスミドおよび他のベクターを含む。例えば、適したベクターは、次の型のプラスミドを含む：E. coliなどの原核細胞における発現のための、pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミドおよびpUC由来プラスミド。

40

【0206】

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、p

50

S V T 7、p k o - n e o および p H y g 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、p B R 3 2 2）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（B P V - 1）またはエプスタインバーウイルス（p H E B o、p R E P 由来および p 2 0 5）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、[M o l e c u l a r C l o n i n g A L a b o r a t o r y M a n u a l、3 r d E d.、S a m b r o o k、F r i t s c h および M a n i a t i s 編 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、2 0 0 1 年]。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、p V L 由来のベクター（例えば、p V L 1 3 9 2、p V L 1 3 9 3 および p V L 9 4 1）、p A c U W 由来のベクター（例えば、p A c U W L）および p B l u e B a c 由来のベクター（例えば、β - g a l を含む p B l u e B a c I I I）が挙げられる。

10

【0207】

好ましい実施形態では、ベクターは、C H O 細胞における本主題の A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドの生成のために設計される（例えば、P c m v - S c r i p t ベクター（S t r a t a g e n e、L a J o l l a、C a l i f.）、p c D N A 4 ベクター（I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C a l i f.）および p C I - n e o ベクター（P r o m e g a、M a d i s o n、W i s c））。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 A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドの発現を引き起こすために使用され得る。

20

【0208】

本開示はまた、1 または複数の本主題の A L K 4 および／または A c t R I I トラップポリペプチドのコード配列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、A L K 4 および／または A c t R I I トラップポリペプチドは、E . c o l i 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 [例えば、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞株] 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。

30

【0209】

したがって、本開示はさらに、本主題の A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドを生成する方法に関する。例えば、A L K 4 および／または A c t R I I 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、A L K 4 および／または A c t R I I 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。ポリペプチドは、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、A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドは、細胞質または膜画分から単離されてもよいし、回収し、溶解された細胞から得られてもよい。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、A L K 4 および／または A c t R I I 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精製、および A L K 4 および／または A c t R I I ポリペプチドに融合させたドメインに結合する作用因子によるアフィニティ精製（例えば、プロテ

40

50

ンAカラムを使用して、ALK4-Fcおよび／またはActRII-Fc融合タンパク質を精製することができる)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。一部の実施形態では、ALK4および／またはActRII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。

【0210】

一部の実施形態では、例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程によって、精製は達成される。ウイルス濾過および緩衝液交換によって精製を完了することができる。ALK4-Fcおよび／またはActRII-Fc融合タンパク質ならびにそれらのヘテロマー複合体は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定される場合に、90%、95%、96%、98%または99%を超える純度およびSDS PAGEによって決定される場合に、90%、95%、96%、98%または99%を超える純度まで精製することができる。純度の標的レベルは、哺乳動物系、特に、非ヒト霊長類、齧歯類（マウス）およびヒトにおける所望される結果の達成に十分なレベルとなるべきである。

【0211】

別の実施形態では、組換えALK4および／またはActRIIポリペプチドの所望の部分のN末端におけるポリ(His)／エンテロキナーゼ切断部位配列など、精製リーダー配列をコードする融合遺伝子は、Ni²⁺金属樹脂を使用したアフィニティー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。続いて、エンテロキナーゼによる処置により、精製リーダー配列をその後除去して、精製されたALK4および／またはActRIIポリペプチドならびにそれらのヘテロマー複合体をもたらすことができる[Hochuliら(1987年)J. Chromatography 411巻:177頁;およびJanknechtら(1991年)PNAS USA 88巻:8972頁]。

【0212】

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(stagger-ended)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(filling-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。

【0213】

4. 抗体ActRIIアンタゴニスト

ある特定の態様では、本開示は、抗体、または抗体の組合せであるActRIIアンタゴニスト(阻害剤)に関する。ActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、1つもしくは複数のActRII関連リガンド[例えば、GDF11、GDF8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9]または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体(例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4)に結合し得る。特に、本開示は、望ましい効果を達成することを必要とする対象において望ましい効果を達成する(例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置する)ために

、A c t R I I アンタゴニスト抗体、もしくはA c t R I I アンタゴニスト抗体の組合せを、単独で、または1つもしくは複数のさらなる支持療法および／もしくは活性薬剤と組み合わせて使用する方法を提供する。ある特定の好ましい実施形態では、A c t R I I アンタゴニスト抗体を、免疫療法剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせて使用することができる。

【0214】

ある特定の好ましい態様では、本開示のA c t R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともA c t R I I 受容体（例えば、A c t R I I A および／またはA c t R I I B）を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともA c t R I I A およびA c t R I I B（A c t R I I A / B 抗体）に結合する。一部の代替的な実施形態では、A c t R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともA c t R I I A に結合するが、A c t R I I B には結合しないか、または実質的に結合しない（例えば、 1×10^{-7} M より大きい K_D でA c t R I I B に結合するか、または比較的低い結合、例えば、約 1×10^{-8} M もしくは約 1×10^{-9} M を有する）。他の代替的な実施形態では、A c t R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともA c t R I I B に結合するが、A c t R I I A には結合しない、または実質的に結合しない（例えば、 1×10^{-7} M より大きい K_D でA c t R I I A に結合するか、または比較的低い結合、例えば、約 1×10^{-8} M もしくは約 1×10^{-9} M を有する）。本明細書で使用される場合、A c t R I I 抗体（抗A c t R I I 抗体）は、一般的に、抗体がA c t R I I を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでA c t R I I（例えば、A c t R I I A および／またはA c t R I I B）に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗A c t R I I 抗体の、関連しない非A c t R I I タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、B i a c o r e、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のA c t R I I への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗A c t R I I 抗体は、異なる種に由来するA c t R I I 間で保存されたA c t R I I（A c t R I I A および／またはA c t R I I B）のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗A c t R I I 抗体は、ヒトA c t R I I（例えば、A c t R I I A および／またはA c t R I I B）に結合する。他の好ましい実施形態では、抗A c t R I I 抗体は、1つまたは複数のリガンド〔例えば、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 10、およびB M P 9〕が、A c t R I I（例えば、A c t R I I A および／またはA c t R I I B）に結合するのを阻害し得る。A c t R I I A は、A c t R I I B に対する配列相同性を有し、したがって、A c t R I I A に結合する抗体は、いくつかの場合、A c t R I I B に結合する、および／またはそれを阻害することができ、その逆も当てはまることに留意すべきである。一部の実施形態では、抗A c t R I I 抗体は、A c t R I I（例えば、A c t R I I A および／またはA c t R I I B）と、1つまたは複数のリガンド〔例えば、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 10、およびB M P 9〕とに結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、抗A c t R I I 抗体は、A c t R I I A とA c t R I I B とに結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、少なくとも抗A c t R I I A 抗体と、少なくとも抗A c t R I I B 抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんを処置すること）に関する。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗A c t R I I A 抗体と、例えば、1つまたは複数のリガンド〔例えば、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6

10

20

30

40

50

、BMP10、およびBMP9]に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置すること）に関する。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗AcctRIIB抗体と、例えば、1つまたは複数のリガンド[例えば、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9]および／またはALK4に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんを処置すること）に関する。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗AcctRIIA抗体と、抗AcctRIIB抗体と、例えば、1つまたは複数のリガンド[例えば、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9]および／またはALK4に結合する少なくとも1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんを処置すること）に関する。

【0215】

ある特定の態様では、本開示のAcctRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともGDF11を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、AcctRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともGDF11に結合する。本明細書で使用される場合、GDF11抗体（抗GDF11抗体）は、一般的に、抗体がGDF11を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでGDF11に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗GDF11抗体の、関連しない非GDF11タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、Biacore、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のGDF11への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗GDF11抗体は、異なる種に由来するGDF11間で保存されたGDF11のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗GDF11抗体は、ヒトGDF11に結合する。他の好ましい実施形態では、抗GDF11抗体は、GDF11が同族I型および／またはII型受容体（例えば、AcctRIIA、AcctRIIB、およびALK4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介するGDF11媒介性シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害し得る。GDF11は、GDF8に対する高い配列相同性を有し、したがって、GDF11に結合する抗体はまた、いくつかの場合、GDF8に結合する、および／またはそれを阻害することができることに留意すべきである。一部の実施形態では、抗GDF11抗体は、1つもしくは複数のさらなるリガンド[例えば、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9]に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、AcctRIIA、AcctRIIB、およびALK4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗GDF11抗体と、例えば、異なるリガンド[例えば、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9]に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、AcctRIIA、AcctRIIB、およびALK4）に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用に関する。

【0216】

ある特定の態様では、本開示のAcctRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともGDF8を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、Acct

10

20

30

40

50

R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくとも G D F 8 に結合する。本明細書で使用される場合、G D F 8 抗体（抗 G D F 8 抗体）は、一般的に、抗体が G D F 8 を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティで G D F 8 に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗 G D F 8 抗体の、関連しない非 G D F 8 タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）、B i a c o r e、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体の G D F 8 への結合の約 10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 % 未満、または約 1 % 未満である。ある特定の実施形態では、抗 G D F 8 抗体は、異なる種に由来する G D F 8 間で保存された G D F 8 のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗 G D F 8 抗体は、ヒト G D F 8 に結合する。他の好ましい実施形態では、抗 G D F 8 抗体は、G D F 8 が同族 I 型および／または I I 型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、および A L K 4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介する G D F 8 媒介性シグナル伝達（例えば、S m a d シグナル伝達）を阻害し得る。G D F 8 は、G D F 11 に対する高い配列相同性を有し、したがって、G D F 8 に結合する抗体はまた、いくつかの場合、G D F 11 に結合する、および／またはそれを阻害することができることに留意すべきである。一部の実施形態では、抗 G D F 8 抗体は、1 つもしくは複数のさらなるリガンド [例えば、G D F 11、アクチビン（例えば、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン A B、アクチビン A C）、G D F 3、B M P 6、B M P 10、および B M P 9] に結合する、ならびに／または 1 つもしくは複数の I 型および／もしくは I I 型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、および A L K 4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗 G D F 8 抗体と、例えば、異なるリガンド [例えば、G D F 11、アクチビン（例えば、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン A B、アクチビン A C）、G D F 3、B M P 6、B M P 10、および B M P 9] に結合する、ならびに／または 1 つもしくは複数の I 型および／もしくは I I 型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、および A L K 4）に結合する 1 つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用に関する。

【0217】

ある特定の態様では、本開示の A c t R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともアクチビン（例えば、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン A B、アクチビン A C）を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともアクチビンに結合する。本明細書で使用される場合、アクチビン抗体（抗アクチビン抗体）とは、一般的に、抗体がアクチビンを標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでアクチビンに結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗アクチビン抗体の、関連しない非アクチビタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）、B i a c o r e、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のアクチビンへの結合の約 10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 % 未満、または約 1 % 未満である。ある特定の実施形態では、抗アクチビン抗体は、異なる種に由来するアクチビン間で保存されたアクチビンのエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗アクチビン抗体は、ヒトアクチビンに結合する。他の好ましい実施形態では、抗アクチビン抗体は、アクチビンが同族 I 型および／または I I 型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、および A L K 4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介するアクチビン媒介性シグナル伝達（例えば、S m a d シグナル伝達）を阻害し得る。アクチビンは、配列相同性を共有し、したがって、1 つのアクチビン（例えば、アクチビン A）に結合する抗体は 1 つまたは複数のさらなるアクチビン（例えば、アクチビン B、アクチビン A B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン A C）に結合することができることに留意すべきである。一部の実施形態では、抗アクチビン抗体は、少

10

20

30

40

50

なくともアクチビンAおよびアクチビンBに結合する。一部の実施形態では、抗アクチビン抗体は、1つもしくは複数のさらなるリガンド〔例えば、GDF11、GDF8、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9〕に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗アクチビン抗体と、例えば、異なるリガンド〔例えば、GDF8、GDF11、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9〕に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用に関する。

10

【0218】

ある特定の態様では、本開示のActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともGDF3を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、ActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともGDF3に結合する。本明細書で使用される場合、GDF3抗体（抗GDF3抗体）とは、一般的に、抗体がGDF3を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでGDF3に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗GDF3抗体の、関連しない非GDF3タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、Biacore、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のGDF3への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗GDF3抗体は、異なる種に由来するGDF3間で保存されたGDF3のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗GDF3抗体は、ヒトGDF3に結合する。他の好ましい実施形態では、抗GDF3抗体は、GDF3が同族I型および／またはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介するGDF3媒介性シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害し得る。一部の実施形態では、抗GDF3抗体は、1つもしくは複数のさらなるTGF-βリガンド〔例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、BMP6、BMP10、およびBMP9〕に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗GDF3抗体と、例えば、異なるTGF-βリガンド〔例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、BMP6、BMP10、およびBMP9〕に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置すること）に関する。

20

30

40

【0219】

ある特定の態様では、本開示のActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともBMP6を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、ActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともBMP6に結合する。本明細書で使用される場合、BMP6抗体（抗BMP6抗体）とは、一般的に抗体がBMP6を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでBMP6に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗BMP6抗体の、関連しない非BMP6タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、Biacore、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のBMP6への結合の約10%、9%、8%、7%、

50

6 %、5 %、4 %、3 %、2 %未満、または約1 %未満である。ある特定の実施形態では、抗BMP6抗体は、異なる種に由来するBMP6間で保存されたBMP6のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗BMP6抗体は、ヒトBMP6に結合する。他の好ましい実施形態では、抗BMP6抗体は、BMP6が同族I型および／またはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介するBMP6媒介性シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害し得る。一部の実施形態では、抗BMP6抗体は、1つもしくは複数のさらなるTGF-βリガンド（例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP10、およびBMP9）に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗BMP6抗体と、例えば、異なるTGF-βリガンド（例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP10、およびBMP9）に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置すること）に関する。

【0220】

ある特定の態様では、本開示のActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともBMP9を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、ActRIIアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともBMP9に結合する。本明細書で使用される場合、BMP9抗体（抗BMP9抗体）とは、一般的に抗体がBMP9を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでBMP9に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗BMP9抗体の、関連しない非BMP9タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、Biacore、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のBMP9への結合の約10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %未満、または約1 %未満である。ある特定の実施形態では、抗BMP9抗体は、異なる種に由来するBMP9間で保存されたBMP9のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗BMP9抗体は、ヒトBMP9に結合する。他の好ましい実施形態では、抗BMP9抗体は、BMP9が同族I型および／またはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介するBMP9媒介性シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害し得る。一部の実施形態では、抗BMP9抗体は、1つもしくは複数のさらなるTGF-βリガンド（例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP10、およびBMP6）に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗BMP9抗体と、例えば、異なるTGF-βリガンド（例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP10、およびBMP6）に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、ActRIIA、ActRIIB、およびALK4）に結合する1つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置すること）に関する。

【0221】

ある特定の態様では、本開示のA c t R I Iアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともB M P 1 0を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともB M P 1 0に結合する。本明細書で使用される場合、B M P 1 0抗体（抗B M P 1 0抗体）とは、一般的に抗体がB M P 1 0を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでB M P 1 0に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗B M P 1 0抗体の、関連しない非B M P 1 0タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）、B i a c o r e、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のB M P 1 0への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗B M P 1 0抗体は、異なる種に由来するB M P 1 0間で保存されたB M P 1 0のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗B M P 1 0抗体は、ヒトB M P 1 0に結合する。他の好ましい実施形態では、抗B M P 1 0抗体は、B M P 1 0が同族I型および／またはII型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4）に結合するのを阻害し、かくして、これらの受容体を介するB M P 1 0媒介性シグナル伝達（例えば、S m a dシグナル伝達）を阻害し得る。一部の実施形態では、抗B M P 1 0抗体は、1つもしくは複数のさらなるT G F- β リガンド〔例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、およびB M P 9〕に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4）に結合する多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗B M P 1 0抗体と、例えば、異なるT G F- β リガンド〔例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、およびB M P 9〕に結合する、ならびに／または1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体（例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4）に結合する1つまたは複数のさらなる抗体を含む、抗体の組合せ、ならびにその使用（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置すること）に関する。

【0222】

他の態様では、本開示のA c t R I Iアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともA L K 4を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニスト抗体、または抗体の組合せは、少なくともA L K 4に結合する。本明細書で使用される場合、A L K 4抗体（抗A L K 4抗体）とは、一般的に抗体がA L K 4を標的とする際に診断剤および／または治療剤として有用であるような十分なアフィニティでA L K 4に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗A L K 4抗体の、関連しない非A L K 4タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）、B i a c o r e、または他のタンパク質間相互作用もしくは結合アフィニティアッセイによって測定された場合、抗体のA L K 4への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗A L K 4抗体は、異なる種に由来するA L K 4間で保存されたA L K 4のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗A L K 4抗体は、ヒトA L K 4に結合する。他の好ましい実施形態では、抗A L K 4抗体は、1つまたは複数のT G F- β リガンド〔例えば、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9〕がA L K 4に結合するのを阻害し得る。一部の実施形態では、抗A L K 4抗体は、A L K 4と、1つまたは複数のT G F- β リガンド〔例えば、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビ

ン A B、アクチビン A C)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、および B M P 9] ならびに／または A c t R I I (A c t R I I A および／もしくは A c t R I I B) とに結合する多特異性抗体 (例えば、二特異性抗体) である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せが、抗 A L K 4 抗体と、例えば、1 つまたは複数のリガンド [例えば、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン A B、アクチビン A C)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、および B M P 9] ならびに／または A c t R I I (A c t R I I A および／もしくは A c t R I I B) に結合する 1 つまたは複数のさらなる抗体とを含む、抗体の組合せ、ならびにその使用に関する。

【0223】

用語「抗体」は、本明細書では最も広い意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体 (例えば、二特異性抗体)、およびそれらが所望の抗原結合活性を示す限り、抗体フラグメントを含むが、これらに限定されない様々な抗体構造を包含する。抗体フラグメントとは、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含むインタクト抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例は、F v、F a b、F a b'、F a b'-S H、F (a b₂)；ダイアボディー；線状抗体；単鎖抗体分子 (例えば、s c F v)；および抗体フラグメントから形成される多特異性抗体を含むがこれらに限定されない。例えば、Hudsonら (2003年) Nat. Med. 9巻: 129~134頁；Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、RosenburgおよびMoore編、(Springer-Verlag、New York)、269~315頁 (1994年)；WO 93/16185；ならびに米国特許第5,571,894号、第5,587,458号、および第5,869,046号を参照されたい。本明細書に開示される抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、それに結合し、検出することができる標識を含む (例えば、標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素コファクターであってもよい)。好ましい実施形態では、本開示の抗体は、単離された抗体である。

【0224】

ダイアボディーは、二価または二特異性であり得る、2つの抗原結合性部位を有する抗体フラグメントである。例えば、EP 404,097；WO 1993/01161；Hudsonら (2003年)、Nat. Med.、9巻: 129~134頁；および Hollingerら (1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻: 6444~6448頁を参照されたい。トリアボディー (triabody) およびテトラボディー (tetrabody) もまた、Hudsonら (2003年)、Nat. Med.、9巻: 129~134頁において記載されている。

【0225】

単ドメイン抗体とは、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部、または抗体の軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む抗体フラグメントである。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である。例えば、米国特許第6,248,516号を参照されたい。

【0226】

抗体フラグメントを、本明細書に記載されるような、インタクト抗体のタンパク質分解的消化ならびに組換え宿主細胞 (例えば、E. coli またはファージ) による産生を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製することができる。

【0227】

本明細書の抗体は、任意のクラスの抗体であり得る。抗体のクラスとは、その重鎖により保有される定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体の5つの主要なクラス: Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、および Ig M が存在し、これらのいくつかは、サブクラス (アイソタイプ)、例えば、Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、Ig G₄、Ig A₁、および Ig A₂ にさらに分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。

【0228】

一般に、本明細書に開示される方法における使用のための抗体は、好ましくは、高い結合アフィニティでその標的抗原に特異的に結合する。アフィニティは、 K_D 値として表され得、固有の結合アフィニティを反映する（例えば、最小化されたアビディティ効果を有する）。典型的には、結合アフィニティは、無細胞設定であっても、または細胞関連設定であっても、*in vitro*で測定される。例えば、表面プラズモン共鳴（*Biacore*（商標）アッセイ）、放射標識抗原結合アッセイ（*RIA*）、および*ELISA*を含む、本明細書に開示されるものを含む、当該分野で公知のいくつかのアッセイのいずれかを使用して、結合アフィニティ測定値を得ることができる。一部の実施形態では、本開示の抗体は、その標的抗原〔例えば、*ActRIIB*、*ActRIIA*、*ALK4*、*GDF8*、*アクチビン*（例えば、*アクチビンA*、*アクチビンB*、*アクチビンC*、*アクチビンE*、*アクチビンAB*、*アクチビンAC*）、*GDF3*、*BMP6*、*BMP10*、および*BMP9*〕に、少なくとも 1×10^{-7} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-8} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-9} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-10} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-11} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-12} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-13} もしくはそれよりも強い、または 1×10^{-14} もしくはそれよりも強い K_D で結合する。

【0229】

ある特定の実施形態では、 K_D は、以下のアッセイにより記載されるように、関心のある抗体の*Fab*バージョンおよびその標的抗原で実施される*RIA*により測定される。*Fab*の抗原に対する溶液結合アフィニティは、*Fab*を、滴定系列の非標識抗原の存在下において、最低濃度の放射性標識された抗原（例えば、 ^{125}I で標識された）と平衡化し、次いで、結合した抗原を、抗*Fab*抗体でコーティングしたプレートで捕捉することにより測定する〔例えば、*Chen*ら（1999年）、*J. Mol. Biol.*、293巻：865～881頁を参照されたい〕。アッセイ条件を確立するために、マルチウェルプレート（例えば、*Thermo Scientific*製の*MICROTITER*（登録商標））を、捕捉用抗*Fab*抗体（例えば、*Cappel Labs*製）でコーティングし（例えば、一晚にわたり）、その後、好ましくは、室温（例えば、およそ23℃）において、ウシ血清アルブミンでブロッキングする。非吸着型プレートでは、放射性標識された抗原を、関心のある*Fab*の系列希釈液と混合する〔例えば、*Presta*ら、（1997年）、*Cancer Res.*、57巻：4593～4599頁における抗*VEGF*抗体である、*Fab-12*の評価と符合する〕。次いで、関心のある*Fab*を、好ましくは、一晚にわたりインキュベートするが、平衡に到達することを確保するように、インキュベーションは、長時間（例えば、約65時間）にわたり継続することもできる。その後、混合物を、好ましくは、室温で約1時間にわたるインキュベーションのために、捕捉プレートに移す。次いで、溶液を除去し、プレートを、好ましくは、ポリソルベート20とPBSとの混合物で、複数回洗浄する。プレートを乾燥させたら、シンチレーション剤（例えば、*Packard*製の*MICROSCINT*（登録商標））を添加し、ガンマカウンタ（例えば、*Packard*製の*TOPCOUNT*（登録商標））上で、プレートをカウントする。

【0230】

別の実施形態によれば、 K_D は、例えば、抗原CM5チップを約10応答単位（RU）で固定化させた、*BIACORE*（登録商標）2000または*BIACORE*（登録商標）3000（*Biacore, Inc.*、*Piscataway, N. J.*）を使用する、表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定する。略述すると、供給元の指示書に従い、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、*Biacore, Inc.*）を、*N*-エチル-*N'*-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）および*N*-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化させる。例えば、抗原は、10mMの酢酸ナトリウム、pH4.8で、5μg/mL（約0.2μM）まで希釈してから、5μL/分の流量で注入して、およそ10応答単位（RU）のタンパ

10

20

30

40

50

ク質のカップリングを達成することができる。抗原を注入した後、1 Mのエタノールアミンを注入して、未反応基をブロックする。反応速度の測定のため、Fabの2倍系列希釈液（0.78 nM～500 nM）を、0.05%のポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））界面活性剤を含むPBS（PBST）に、およそ25 μ L／分の流量で注入する。会合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）は、例えば、単純な一対一ラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を使用して、会合センサーグラムおよび解離センサーグラムのフィッティングを同時に行うことにより計算する。平衡解離定数（ K_D ）は、 k_{off}/k_{on} 比として計算する[例えば、Chenら、（1999年）、J. Mol. Biol.、293巻：865～881頁を参照されたい]。オン速度が、例えば、上記の表面プラズモン共鳴アッセイで $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、オン速度は、徐々に増大する濃度の抗原の存在下におけるPBS中、20 nMの抗抗原抗体（Fab形態）の蛍光発光強度（例えば、励起＝295 nm；発光＝340 nm、16 nmのバンドパス）であって、攪拌型キュベットを有するストップフロー装置型分光光度計（Aviv Instruments）、または8000シリーズのSLM-AMINCO（登録商標）分光光度計（Thermo Spectronic）などの分光計により測定した場合の、蛍光発光強度の増加または減少を測定する蛍光消光法を使用することにより決定することができる。

【0231】

ヒトActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9の核酸およびアミノ酸配列は、当該分野で周知であり、かくして、本開示に従う使用のための抗体アンタゴニストは、当該分野における知識および本明細書に提供される教示に基づいて、当業者によって慣例的に作製され得る。

【0232】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体とは、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来する一方、重鎖および／または軽鎖の残余は異なる供給源または種に由来する抗体を指す。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号；およびMorrissonら、（1984年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81巻：6851～6855頁に記載されている。一部の実施形態では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長動物に由来する可変領域）と、ヒト定常領域とを含む。一部の実施形態では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスを、親抗体のクラスまたはサブクラスから変化させた「クラススイッチ」抗体である。一般に、キメラ抗体は、その抗原結合フラグメントを含む。

【0233】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるキメラ抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体とは、非ヒト超可変領域（HVR）に由来するアミノ酸残基と、ヒトフレームワーク領域（FR）に由来するアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つの可変ドメインであり、典型的には2つの可変ドメインであって、HVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のHVR（例えば、CDR）に対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のFRに対応する、可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」とは、ヒト化を経た抗体を指す。

【0234】

ヒト化抗体およびそれらを作製する方法は、例えば、AlmagroおよびFransson（2008年）、Front. Biosci.、13巻：1619～1633頁において総説されており、例えば、Riechmannら、（1988年）、Nature

10

20

30

40

50

、332巻：323～329頁；Queenら（1989年）、*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*、86巻：10029～10033頁；米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、および同第7,087,409号；Kashmiriら、（2005年）、*Methods*、36巻：25～34頁〔SDR（a-CDR）グラフティングについて記載する〕；Padlan、*Mol. Immunol.*、（1991年）、28巻：489～498頁（「リサーチエシニング」について記載する）；Dall'Acquaら（2005年）、*Methods*、36巻：43～60頁（「FRシャフリング」について記載する）；Osbourneら（2005年）、*Methods*、36巻：61～68頁；ならびにKlimkaら、*Br. J. Cancer*（2000年）、83巻：252～260頁（FRシャフリングへの「誘導選択」アプローチについて記載する）においてさらに記載されている。

【0235】

ヒト化のために使用され得るヒトフレームワーク領域は、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域〔例えば、Simsら（1993年）、*J. Immunol.*、151巻：2296頁を参照されたい〕；軽鎖可変領域または重鎖可変領域の特定の亜集団による、ヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域〔例えば、Carterら（1992年）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、89巻：4285頁；およびPrestaら（1993年）、*J. Immunol.*、151巻：2623頁を参照されたい〕；ヒト成熟（体細胞変異させた）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系列フレームワーク領域〔例えば、AlmagroおよびFransson（2008年）、*Front. Biosci.*、13巻：1619～1633頁を参照されたい〕；およびFRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域〔例えば、Bacaら、（1997年）、*J. Biol. Chem.*、272巻：10678～10684頁；およびRosokら、（1996年）、*J. Biol. Chem.*、271巻：22611～22618頁を参照されたい〕を含むがこれらに限定されない。

【0236】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体を、当該分野で公知の様々な技術を使用して産生することができる。ヒト抗体は、van Dijkおよびvan de Winkel（2001年）*Curr. Opin. Pharmacol.* 5巻：368～74頁およびLonberg（2008年）*Curr. Opin. Immunol.* 20巻：450～459頁に一般的に記載されている。

【0237】

免疫原〔例えば、ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9〕を、抗原性チャレンジに応答してインタクトヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクト抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に投与することによって、ヒト抗体を調製することができる。そのような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えた、または染色体外に存在する、もしくは動物の染色体中に無作為に組み込まれた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有する。そのようなトランスジェニック動物では、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般に、不活化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を取得するための方法の概説については、例えば、Lonberg（2005年）*Nat. Biotechnol.* 23巻：1117～1125頁；米国特許第6,075,181号および第6,150,584号（XENOMOUSE（商標）技術を記載する）；米国特許第5,770,429号（HuMaB（登録商標）技術を記載する）；米国特許第7,041,870号（K-M MOUSE（登録商標）技術を記載する）；ならびに米国特許出願公開第2007/0061900号（VelociMouse（登録商標）技術を記載する）を参照されたい。そのような動物によって生成されるインタクト抗体に由来するヒト可変領域を、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって

さらに改変することができる。

【0238】

本明細書で提供されるヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法により作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫細胞株およびマウスーヒトヘテロ骨髓腫細胞株は記載されている [例えば、Kozbor、J. Immunol.、(1984年)、133巻:3001頁; Brodeurら (1987年)、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63頁、Marcel Dekker, Inc.、New York; および Boernerら (1991年)、J. Immunol.、147巻:86頁を参照されたい]。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体はまた、Liら、(2006年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、103巻:3557~3562頁において記載されている。追加の方法は、例えば、米国特許第7,189,826号 (ハイブリドーマ細胞株からのヒトモノクローナルIgM抗体の生成について記載) および Ni、Xiandai Mianyixue (2006年)、26巻(4号):265~268頁 (2006年) (ヒトーヒトハイブリドーマについて記載) において記載されている方法を含む。ヒトハイブリドーマ技術 (トリオーマ技術) はまた、Vollmers および Brandlein (2005年)、Histol. Histopathol.、20巻(3号):927~937頁; ならびに Vollmers および Brandlein (2005年)、Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.、27巻(3号):185~91頁において記載されている。

【0239】

本明細書で提供されるヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーより選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成することができる。次いで、このような可変ドメイン配列を、所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。ヒト抗体を抗体ライブラリーより選択するための技法は、本明細書で記載される。

【0240】

例えば、本開示の抗体は、1つまたは複数の所望の活性を有する抗体のためのコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離することができる。当該分野では、ファージディスプレイライブラリーを生成し、このようなライブラリーを、所望の結合特徴を保有する抗体についてスクリーニングするための、様々な方法が公知である。このような方法は、例えば、Hoogenboomら (2001年)、Methods in Molecular Biology、178巻:1~37頁、O'Brienら編、Human Press、Totowa、N. J. において総説されており、例えば、McCaffertyら (1991年)、Nature、348巻:552~554頁; Clacksonら、(1991年)、Nature、352巻:624~628頁; Marksら (1992年)、J. Mol. Biol.、222巻:581~597頁; Marks および Bradbury (2003年)、Methods in Molecular Biology、248巻:161~175頁、Lo編、Human Press、Totowa、N. J.; Sidhuら (2004年)、J. Mol. Biol.、338巻(2号):299~310頁; Leeら (2004年)、J. Mol. Biol.、340巻(5号):1073~1093頁; Fellouse (2004年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻(34号):12467~12472頁; ならびに Leeら (2004年)、J. Immunol. Methods、284巻(1~2号):119~132頁においてさらに記載されている。

【0241】

ある特定のファージディスプレイ法では、VHおよびVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって別々にクローニングされ、ファージライブラリー中で無作為に組み換えられ、次いで、Winterら (1994年) Ann. Rev. Immunol.、1

10

20

30

40

50

2 巻：433～455 頁に記載されたように抗原結合性ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、単鎖 Fv (scFv) フラグメントとして、または Fab フラグメントとして、抗体フラグメントを展示する。免疫化された供給源に由来するライブラリーは、ハイブリドーマの構築を要求することなく、免疫原 [例えば、ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、アクチビン (例えば、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、アクチビン E、アクチビン AB、アクチビン AC)、GDF3、BMP6、BMP10、および BMP9] に対する高アフィニティ抗体を提供する。あるいは、ナイーブなレパートリーをクローニングして (例えば、ヒトから)、Griffiths ら (1993 年) EMBO J、12 巻：725～734 頁によって記載された免疫化なしに様々な非自己およびまた、自己抗原に対する抗体の単一の供給源を提供することができる。最後に、Hoogenboom および Winter (1992 年) J. Mol. Biol.、227 巻：381～388 頁によって記載されたように、幹細胞に由来する非再配置 V 遺伝子セグメントをクローニングし、高度に可変性の CDR3 領域をコードし、in vitro での再配置を達成するための無作為配列を含有する PCR プライマーを使用することによって、ナイーブなライブラリーを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許刊行物としては、例えば、米国特許第 5,750,373 号、ならびに米国特許出願公開第 2005/0079574 号、第 2005/0119455 号、第 2005/0266000 号、第 2007/0117126 号、第 2007/0160598 号、第 2007/0237764 号、第 2007/0292936 号、および第 2009/0002360 号が挙げられる。

【0242】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、多特異性抗体、例えば、二特異性抗体である。多特異性抗体 (典型的に、モノクローナル抗体) は、1 つまたは複数の (例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはこれを超える) 抗原上の、少なくとも 2 つの (例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはこれを超える) 異なるエピトープに対する結合特異性を有する。

【0243】

「オクトパス抗体」を含む、3 個またはそれよりも多くの機能的抗原結合性部位を有する操作された抗体も、本明細書に含まれる (例えば、US 2006/0025576 A1 を参照されたい)。

【0244】

ある特定の実施形態では、本明細書で開示される抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体とは、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、可能な改変体抗体、例えば、天然に存在する変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の生成時に発生する改変体抗体 (このような改変体は、一般に少量で存在する) を除き同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。典型的に、異なるエピトープを指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープを指向する。したがって、修飾語「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の性質を指し示し、任意の特定の方法により抗体の生成を必要とするとはみなさないものとする。例えば、本方法に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換え DNA 法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を活用する方法、本明細書で記載されるモノクローナル抗体を作製するためのこのような方法および他の例示的な方法を含むがこれらに限定されない様々な技法により作製することができる。

【0245】

例えば、標準的なプロトコルを介して、GDF11 に由来する免疫原を使用することにより、抗タンパク質/抗ペプチド抗血清または抗タンパク質/抗ペプチドモノクローナル抗体を作製することができる [例えば、Antibodies: A Laboratory Manual (1988 年)、Harlow および Lane 編、Cold Spring

10

20

30

40

50

Harbor Pressを参照されたい]。マウス、ハムスター、またはウサギなどの哺乳動物は、GDF11ポリペプチドの免疫原性形態、抗体応答を誘発することが可能である抗原性フラグメント、または融合タンパク質で免疫化することができる。タンパク質またはペプチドに免疫原性を付与するための技法は、キャリアへのコンジュゲーションまたは当該分野で周知の他の技法を含む。GDF11ポリペプチドの免疫原性部分は、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫化の進行は、血漿中または血清中の抗体力価の検出によりモニタリングすることができる。免疫原を抗原とする標準的なELISAまたは他のイムノアッセイを使用して、抗体生成レベルおよび／または結合アフィニティレベルを評価することができる。

【0246】

GDF11の抗原性調製物で動物を免疫化した後、抗血清を得ることができ、所望の場合、ポリクローナル抗体を血清から単離することができる。モノクローナル抗体を生成するために、抗体生成細胞（リンパ球）を、免疫化動物から採取し、標準的な体細胞融合手順により、骨髄腫細胞など、不死化細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞をもたらすことができる。このような技法は、当該分野で周知であり、例えば、ハイブリドーマ技法[例えば、KohlerおよびMilstein（1975年）、Nature、256巻：495～497頁を参照されたい]、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法[例えば、Kozbarら（1983年）、Immunology Today、4巻：72頁を参照されたい]、およびヒトモノクローナル抗体を生成するEBVハイブリドーマ技法[Colerら（1985年）、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77～96頁]が挙げられる。ハイブリドーマ細胞は、GDF11ポリペプチドと特異的に反応性である抗体、およびこのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離されたモノクローナル抗体の生成について、免疫化学的にスクリーニングすることができる。

【0247】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入し、これにより、Fc領域改変体を生成することができる。Fc領域改変体は、1つまたは複数のアミノ酸位置において、アミノ酸改変（例えば、置換、欠失、および／または付加）を含む、ヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、またはヒトIgG4のFc領域）を含み得る。

【0248】

例えば、本開示は、全てではないが、いくつかのエフェクター機能を有する抗体改変体であって、それを、in vivoでの抗体の半減期が、不要であるか、または有害である、ある特定のエフェクター機能[例えば、補体依存性細胞傷害性(CDC)および抗体依存性細胞性細胞傷害性(ADCC)]にとって依然として重要である用途のための望ましい候補にする抗体改変体を企図する。インビトロおよび／またはインビボにおける細胞傷害作用アッセイを実行して、CDC活性および／またはADCC活性の低減／枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実行して、抗体が、FcγR結合を欠く（よって、ADCC活性を欠く可能性が高い）が、FcRnへの結合能は保持することを確保することができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞がFcγRIIIだけを発現するのに対し、単球はFcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、例えば、RavetchおよびKinet（1991年）、Annu. Rev. Immunol., 9巻：457～492頁にまとめられている。関心のある分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号；Hellstrom, I.ら（1986年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83巻：7059～7063頁、Hellstrom, I.ら（1985年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻：1499～1502頁；米国特許第5,821,337号；およびBruggemann, M.ら（1987年）、J. Exp. Med., 166巻：1351～1361頁において記載されている。代替的に

10

20

30

40

50

、非放射性アッセイ法を利用することができる（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞傷害作用アッセイ；Cell Technology, Inc.、Mountain View, Calif.；およびCytotoxic 96（登録商標）非放射性細胞傷害作用アッセイ、Promega, Madison, Wis.）。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞として、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。代替的に、または加えて、関心のある分子のADCC活性は、インビボにおいて、例えば、Clynesら（1998年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95巻：652～656頁において開示されている動物モデルなどの動物モデルにおいて評価することができる。また、C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合できず、よって、CDC活性を欠くことを確認することもできる〔例えば、WO2006/029879およびWO2005/100402における、C1q結合ELISAおよびC3c結合ELISAを参照されたい〕。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを実施することができる〔例えば、Gazzano-Santoroら（1996年）、J. Immunol. Methods、202巻：163頁；Cragg, M. S.ら（2003年）、Blood、101巻：1045～1052頁；ならびにCragg, M. S. およびM. J. Glennie（2004年）、Blood、103巻：2738～2743頁を参照されたい〕。当該分野で公知の方法を使用して、FcRnへの結合およびインビボにおけるクリアランス／半減期の決定もまた、実施することができる〔例えば、Petkova, S. B.ら（2006年）、Intl. Immunol.、18巻（12号）：1759～1769頁を参照されたい〕。

10

20

【0249】

エフェクター機能を低減した本開示の抗体は、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329のうちの1つまたは複数を置換した抗体を含む（米国特許第6,737,056号）。このようなFc変異体は、アミノ酸265位、269位、270位、297位、および327位のうちの2つまたはこれより多くにおいて置換を有するFc変異体であって、残基265および297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含むFc変異体を含む（米国特許第7,332,581号）。

【0250】

ある特定の実施形態では、システイン操作抗体、例えば、抗体の1つまたは複数の残基をシステイン残基で置換した「チオMAb」を創出することが望ましいと考えられる。特定の実施形態では、残基の置換を、抗体の接近可能な部位に施す。システインでこれらの残基を置換することにより、反応性のチオール基が抗体の接近可能な部位に配置され、抗体を、薬物部分またはリンカー-薬物部分など、他の部分にコンジュゲートして、本明細書でさらに記載されるような、免疫コンジュゲートを創出するのに使用することができる。ある特定の実施形態では、以下の残基：軽鎖のV205（Kabab番号付け）；重鎖のA118（EU番号付け）；および重鎖Fc領域のS400（EU番号付け）のうちの任意の1つまたは複数を、システインで置換することができる。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号において記載されているように生成することができる。

30

40

【0251】

加えて、望ましい抗体を同定するための抗体をスクリーニングするのに使用される技法は、得られる抗体の特性に影響を及ぼし得る。例えば、抗体を、溶液中の抗原の結合に使用する場合、溶液中での結合について試験することが望ましいと考えられる。抗体と抗原との相互作用を試験して、特に望ましい抗体を同定するために、様々な異なる技法が利用可能である。このような技法として、ELISA、表面プラズモン共鳴結合アッセイ（例えば、Biacore（登録商標）結合アッセイ、Biacore AB、Uppsala、Sweden）、サンドイッチアッセイ（例えば、IGEN International, Inc.、Gaithersburg、Marylandの常磁性ビーズシステム

50

）、ウェスタンブロット、免疫沈降アッセイ、および免疫組織化学が挙げられる。

【0252】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体および／または結合ポリペプチドのアミノ酸配列改変体が企図される。例えば、抗体および／または結合ポリペプチドの結合アフィニティおよび／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体および／または結合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列中に適切な改変を導入するか、またはペプチド合成により、抗体および／または結合ポリペプチドのアミノ酸配列改変体を調製することができる。そのような改変としては、例えば、抗体および／または結合ポリペプチドのアミノ酸配列からの欠失、および／またはその中への挿入、および／またはその中の残基の置換が挙げられる。最終構築物が所望の特徴、例えば、標的結合（ActRIIB、ActRIIA、ALK4、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、および／またはBMP9結合）を有するという条件で、欠失、挿入、および置換の任意の組合せを作製して、最終構築物に到達することができる。

10

【0253】

変更（例えば、置換）をHVR内に施して、例えば、抗体のアフィニティを改善することができる。このような変更は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセスにおいて高頻度で変異を経るコドンによりコードされる残基（例えば、Chowdhury（2008年）、Methods Mol. Biol.、207巻：179～196頁（2008年）を参照されたい）、および／またはSDR（a-CDR）に施すことができ、結果として得られる改変体VHまたは改変体VLを結合アフィニティについて調べる。当該分野では、二次ライブラリーを構築し、ここから再選択することによるアフィニティ成熟が記載されている[例えば、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology、178巻：1～37頁、O'Brienら編、Human Press、Totowa、N. J.（2001年）を参照されたい]。アフィニティ成熟の一部の実施形態では、様々な方法（例えば、エラーブローンPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向変異誘発）のいずれかにより、成熟のために選択された可変遺伝子に多様性を導入する。次いで、二次ライブラリーを創出する。次いで、ライブラリーをスクリーニングして、所望のアフィニティを有する任意の抗体改変体を同定する。多様性を導入する別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4～6残基）をランダム化する、HVR指向アプローチを伴う。抗原の結合に関与するHVR残基は、例えばアラニン走査変異誘発またはモデル化を使用して、特異的に同定することができる。特にCDR-H3およびCDR-L3は、しばしば標的化される。

20

30

【0254】

ある特定の実施形態では、このような変更が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減しない限りにおいて、1つまたは複数のHVR内に置換、挿入、または欠失を施すことができる。例えば、結合アフィニティを実質的に低減しない保存的変更（例えば、本明細書で提供される保存的置換）を、HVR内に施すことができる。このような変更は、HVR「ホットスポット」またはSDRの外部であり得る。上記で提供した改変体VH配列およびVL配列のある特定の実施形態では、各HVRは、不変であるか、または1つ、2つ、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

40

【0255】

変異誘発のために標的化され得る抗体および／または結合ポリペプチドの残基または領域の同定のための有用な方法は、CunninghamおよびWells（1989年）Science、244巻：1081～1085頁によって記載されたように、「アラニン走査変異誘発」と呼ばれる。この方法では、抗体または結合ポリペプチドの抗原との相互作用が影響されるかどうかを決定するために、残基または標的残基群（例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電残基）が同定され、中性の、または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンもしくはポリアラニン）によって置き換える。さらなる置換を、最初

50

の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入することができる。あるいは、またはさらに、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との接触点を同定することができる。そのような接触残基および近隣の残基を、置換のための候補として標的化または排除することができる。改変体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定することができる。

【0256】

アミノ酸配列の挿入は、1残基〜100またはこれより多くの残基を含有するポリペプチドの範囲の長さのアミノ末端融合体および／またはカルボキシル末端融合体のほか、単一または複数のアミノ酸残基の内部配列挿入も含む。末端挿入の例として、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入改変体として、抗体のN末端もしくはC末端の、酵素（例えば、ADEPTのための）、または抗体の血清中半減期を延長するポリペプチドへの融合体が挙げられる。

【0257】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体および／または結合性ポリペプチドを、当該分野で公知であり、たやすく利用可能である、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾することができる。抗体および／または結合性ポリペプチドの誘導体化に適する部分は、水溶性ポリマーを含むがこれらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例として、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマー）、およびデキストラン、またはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレン（propylene）グリコールホモポリマー、ポリプロピレン（polypropylene）オキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられるがこれらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中のその安定性のために、製造において有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量であることが可能であり、分枝状でもよく、非分枝状でもよい。抗体および／または結合ポリペプチドに付加させるポリマーの数は、変化させることができ、1つより多くのポリマーを付加させる場合、それらは、同じ分子でもよく、異なる分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および／または種類は、抗体の誘導体および／または結合ポリペプチドの誘導体が規定の条件下での治療に使用されようと、改善する抗体および／または結合ポリペプチドの特定の特性または機能を含むがこれらに限定されない検討事項に基づき決定することができる。

【0258】

本明細書に開示されるActRIIアンタゴニスト抗体のいずれかを、1つまたは複数のさらなるActRIIアンタゴニストと組み合わせて、所望の効果を達成することができる。例えば、ActRIIアンタゴニスト抗体を、i) 1つもしくは複数のさらなるActRIIアンタゴニスト抗体、ii) 1つもしくは複数のActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、および／もしくはALK4:ActRIIBヘテロ二量体；iii) 1つもしくは複数の小分子ActRIIアンタゴニスト；iv) 1つもしくは複数のポリヌクレオチドActRIIアンタゴニスト；v) 1つもしくは複数のフォリスタチンポリペプチド；ならびに／またはvi) 1つもしくは複数のFLRGポリペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0259】

5. 小分子アンタゴニスト

他の態様では、本開示は、小分子、または小分子の組合せであるActRIIアンタゴニスト（阻害剤）に関する。ActRIIアンタゴニスト小分子は、1つもしくは複数のActRII関連リガンド〔例えば、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC

)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、1つもしくは複数のI型および／もしくはI型受容体(例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4)、または1つもしくは複数のA c t R I I下流シグナル伝達構成成分(例えば、S m a d 2および／もしくは3)を阻害し得る。特に、本開示は、所望の効果を達成することを必要とする対象における所望の効果を達成する(例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置する)ために、A c t R I Iアンタゴニスト小分子、またはA c t R I Iアンタゴニスト小分子の組合せを、単独で、または1つもしくは複数のさらなる支持療法および／もしくは活性薬剤と組み合わせて使用する方法を提供する。ある特定の好ましい実施形態では、A c t R I Iアンタゴニスト小分子を、免疫療法剤(例えば、P D 1-P D L 1アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤)と組み合わせて使用することができる。

10

【0260】

一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニストは、少なくともA c t R I I AおよびA c t R I I Bを阻害する、小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A c t R I I AおよびA c t R I I Bを阻害する、小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I関連リガンド[例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニストは、少なくともA c t R I I Aを阻害する、小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A c t R I I Aを阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I関連リガンド[例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニストは、少なくともA c t R I I Bを阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A c t R I I Bを阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I関連リガンド[例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニストは、少なくともG D F 1 1を阻害する、小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、G D F 1 1を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I関連リガンド[例えば、G D F 8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニストは、少なくともG D F 8を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、G D F 8を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I関連リガンド[例えば、G D F 1 1、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I Iアンタゴニストは、少なくともアクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、およびアクチビンAE)を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、アクチビンを阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまた

20

30

40

50

は複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともG D F 3を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、G D F 3を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 6を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、B M P 6を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 1 0を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、B M P 1 0を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 9を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、B M P 9を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、およびB M P 1 0]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともA L K 4を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A L K 4を阻害する小分子アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、および／もしくはB M P 9]、A c t R I I A、および／またはA c t R I I Bをさらに阻害する。

【0261】

小分子A c t R I I アンタゴニストは、直接的または間接的阻害剤であってもよい。例えば、間接的な小分子A c t R I I アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、少なくとも1つもしくは複数のリガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体 (例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4) または1つもしくは複数のA c t R I I 下流シグナル伝達構成成分 (例えば、S m a d 2および／もしくは2) の発現 (例えば、転写、翻訳、細胞分泌、またはその組合せ) を阻害し得る。あるいは、直接的な小分子A c t R I I アンタゴニスト、または小分子アンタゴニストの組合せは、例えば、1つもしくは複数のリガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体 (例

10

20

30

40

50

例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4) または1つもしくは複数のA c t R I I 下流シグナル伝達構成成分(例えば、S m a d 2 および／もしくは3)のうちの1つまたは複数の直接的に結合し得る。1つまたは複数の間接的小分子A c t R I I アンタゴニストと、1つまたは複数の直接的な小分子A c t R I I アンタゴニストとの組合せを、本明細書に開示される方法に従って使用することができる。

【0262】

本開示の有機小分子アンタゴニストの結合を、公知の方法(例えば、P C T 公開W O O O / 0 0 8 2 3 およびW O O O / 3 9 5 8 5 を参照されたい)を使用して同定し、化学的に合成することができる。一般に、本開示の小分子アンタゴニストは、通常、約2000ダルトン未満のサイズ、あるいは、約1500、750、500、250または200ダルトン未満のサイズであり、そのような有機小分子は、本明細書に記載のポリペプチド[例えば、A L K 4、A c t R I I B、A c t R I I A、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]に、好ましくは特異的に結合することができる。そのような小分子アンタゴニストを、周知の技術を使用して過度の実験を行うことなく同定することができる。これに関して、ポリペプチド標的に結合することができる分子について有機小分子ライブラリーをスクリーニングするための技術は当該分野で周知であることに留意されたい(例えば、国際特許出願公開W O O O / 0 0 8 2 3 およびW O O O / 3 9 5 8 5 を参照されたい)。

【0263】

本開示の結合有機低分子は、例えば、アルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバメート、カーボネート、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、アリールハロゲン化物、アリールスルホネート、アルキルハロゲン化物、アルキルスルホネート、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアネート、スルホニル塩化物、ジアゾ化合物、および酸塩化物であり得る。

【0264】

本明細書に開示される小分子A c t R I I アンタゴニストはいずれも、1つまたは複数のさらなるA c t R I I アンタゴニストと組み合わせて、所望の、任意選択で、免疫療法剤(例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤)とさらに組み合わせて達成することができる。例えば、小分子A c t R I I アンタゴニストを、i) 1つもしくは複数のさらなるA c t R I I アンタゴニスト小分子、ii) 1つもしくは複数のA c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチド、および／もしくはA L K 4 : A c t R I I B ヘテロ二量体; iii) 1つもしくは複数の抗体A c t R I I アンタゴニスト; iv) 1つもしくは複数のポリヌクレオチドA c t R I I アンタゴニスト; v) 1つもしくは複数のフォリスタチンポリペプチド; ならびに／またはvi) 1つもしくは複数のF L R G ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0265】

6. ヌクレオチドA c t R I I アンタゴニスト

他の態様では、本開示は、ポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドの組合せであるA c t R I I アンタゴニスト(阻害剤)に関する。A c t R I I アンタゴニストポリヌクレオチドは、1つもしくは複数のA c t R I I 関連リガンド[例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、1つもしくは複数のI型および／もしくはII型受容体(例えば、A c t R I I A、A c t R I I B、およびA L K 4)、または1つもしくは複数のA c t R I I 下流シグナル伝達構成成分(例えば、S m a d 2 および／もしくは3)を阻害し得る。特に、本開示

は、所望の効果を達成することを必要とする対象における所望の効果を達成する（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、がんまたは病原体を処置する）ために、A c t R I I アンタゴニストポリヌクレオチド、またはA c t R I I アンタゴニストポリヌクレオチドの組合せを、単独で、または1つもしくは複数のさらなる支持療法および／もしくは活性薬剤と組み合わせて使用する方法を提供する。ある特定の好ましい実施形態では、A c t R I I アンタゴニストポリヌクレオチドを、免疫療法剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせて使用することができる。

【0266】

一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともA c t R I I AおよびA c t R I I Bを阻害する、ポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A c t R I I AおよびA c t R I I Bを阻害する、ポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9] および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともA c t R I I Aを阻害する、ポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A c t R I I Aを阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9] および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともA c t R I I Bを阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A c t R I I Bを阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9] および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともG D F 1 1を阻害する、ポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、G D F 1 1を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともG D F 8を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、G D F 8を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともアクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、およびアクチビンAE）を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、アクチビンを阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまた

10

20

30

40

50

は複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I ポリヌクレオチドは、少なくともG D F 3を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、G D F 3を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 6を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、B M P 6を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 1 0、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 1 0を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、B M P 1 0を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、およびB M P 9]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともB M P 9を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、B M P 9を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、およびB M P 1 0]、A c t R I I A、A c t R I I B、および／またはA L K 4をさらに阻害する。一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストは、少なくともA L K 4を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せである。一部の実施形態では、A L K 4を阻害するポリヌクレオチドアンタゴニスト、またはポリヌクレオチドアンタゴニストの組合せは、1つまたは複数のA c t R I I 関連リガンド [例えば、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、および／もしくはB M P 9]、A c t R I I A、および／またはA c t R I I Bをさらに阻害する。

【0267】

本開示のポリヌクレオチドアンタゴニストは、アンチセンス核酸、RNA i 分子 [例えば、小分子干渉RNA (s i RNA)、小分子ヘアピンRNA (s h RNA)、マイクロRNA (m i RNA)]、アプタマーおよび／またはリボザイムであり得る。ヒトA L K 4、A c t R I I A、A c t R I I B、G D F 1 1、G D F 8、アクチビン (例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC)、G D F 3、B M P 6、B M P 1 0、およびB M P 9の核酸およびアミノ酸配列は、当該分野で公知であり、かくして、本開示の方法に従う使用のためのポリヌクレオチドアンタゴニストは、当該分野における知識および本明細書に提供される教示に基づいて、当業者によって慣例的に作製され得る。

【0268】

例えば、アンチセンス技術は、アンチセンスDNAもしくはアンチセンスRNA、または三重螺旋形成を介して、遺伝子発現を制御するのに使用することができる。アンチセンス法は、例えば、Okano (1991年)、J. Neurochem.、56巻:560頁; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press、Boca Raton、Fla. (1988年)において論じられている。三重螺旋形成は、例えば、Cooneyら (1988年)、Science、241巻:456頁; および Dervanら、(1991年)、Science、251巻:1300頁において論じられている。方法は、ポリヌクレオチドの、相補性DNAまたはRNAへの結合に基づく。一部の実施形態では、アンチセンス核酸は、所望の遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的な一本鎖RNA配列または一本鎖DNA配列を含む。しかし、絶対的な相補性は、好ましいが、必要ではない。

【0269】

本明細書で言及される「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列とは、RNAとハイブリダイズし、安定的な二重鎖を形成することが可能であるのに十分な相補性を有する配列を意味し、したがって、本明細書で開示される遺伝子の二本鎖アンチセンス核酸の場合、二重鎖DNAの一本鎖を試験してもよく、三重鎖形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズする能力は、アンチセンス核酸の相補性の程度および長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズさせる核酸が大型であるほど、それが含有し得るRNAとの塩基のミスマッチも多くなるが、なおも安定的な二重鎖（または、場合に応じて、三重鎖）を形成する。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定する標準的な手順の使用により、ミスマッチの許容可能な程度を確認することができる。

【0270】

メッセンジャーの5'末端と相補的であるポリヌクレオチド、例えば、AUG開始コドンを含むそれまでの5'非翻訳配列は、翻訳の阻害において最も効率的に機能するはずである。しかしながら、mRNAの3'非翻訳配列と相補的な配列は、同様にmRNAの翻訳の阻害において有効であることが示されている[例えば、Wagner, R. (1994年) Nature 372巻:333~335頁を参照されたい]。かくして、本開示の遺伝子の5'または3'非翻訳非コード領域と相補的なオリゴヌクレオチドを、アンチセンス法において使用して、内因性mRNAの翻訳を阻害することができる。mRNAの5'非翻訳領域と相補的なポリヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含むべきである。mRNAコード領域と相補的なアンチセンスポリヌクレオチドは、翻訳の阻害剤としてあまり有効ではないが、本開示の方法に従って使用することができる。本開示のmRNAの5'非翻訳領域、3'非翻訳領域、またはコード領域にハイブリダイズするように設計されたかに応じて、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、好ましくは、6~約50ヌクレオチド長の範囲のオリゴヌクレオチドである。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも50ヌクレオチドである。

【0271】

一実施形態では、本開示のアンチセンス核酸は、外因性配列からの転写により、細胞内で生成される。例えば、ベクターまたはその一部は、転写され、本開示の遺伝子のアンチセンス核酸(RNA)を生成する。このようなベクターは、所望のアンチセンス核酸をコードする配列を含有する。このようなベクターは、所望のアンチセンスRNAを生成するように転写され得る限りにおいて、エピソームにとどまってもよく、染色体に組み込まれてもよい。このようなベクターは、当該分野で標準的な組換えDNA法により構築することができる。ベクターは、プラスミドベクターでもよく、ウイルスベクターでもよく、または当該分野で公知の他のベクターであって、脊椎動物細胞内の複製および発現のために使用されるベクターでもよい。本開示の所望の遺伝子またはこれらのフラグメントをコードする配列の発現は、脊椎動物細胞内、好ましくは、ヒト細胞内で作用することが当該分野で公知の任意のプロモーターによるものであり得る。このようなプロモーターは、誘導性

であっても、恒常的であってもよい。このようなプロモーターとして、SV40初期プロモーター領域〔例えば、Benoi stおよびChambon（1981年）、Nature、29巻：304～310頁を参照されたい〕、ラウス肉腫ウイルスの3'側長末端リピート内に含有されるプロモーター〔例えば、Yamamotoら（1980年）、Cell、22巻：787～797頁を参照されたい〕、ヘルペスチミジンプロモーター〔例えば、Wagnerら（1981年）、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、78巻：1441～1445頁を参照されたい〕、およびメタロチオネイン遺伝子の調節配列〔例えば、Brinsterら（1982年）、Nature、296巻：39～42頁を参照されたい〕が挙げられるがこれらに限定されない。

【0272】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドアンタゴニストは、1つまたは複数の遺伝子の発現を標的とする干渉RNAまたはRNAi分子である。RNAiとは、標的mRNAの発現を妨げるRNAの発現を指す。具体的には、RNAiは、siRNA（小分子干渉RNA）を介して特定のmRNAと相互作用することによって標的遺伝子をサイレンシングする。次いで、dsRNA複合体が、細胞による分解のために標的化される。siRNA分子は、十分に相補的である標的遺伝子（例えば、遺伝子と少なくとも80%同一である）の発現を妨げる、10～50ヌクレオチド長の二本鎖RNA二重鎖である。一部の実施形態では、siRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列と少なくとも85、90、95、96、97、98、99、または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0273】

さらなるRNAi分子は、短ヘアピンRNA（shRNA）；また、短干渉ヘアピンおよびマイクロRNA（miRNA）を含む。shRNA分子は、ループによって接続された標的遺伝子に由来するセンスおよびアンチセンス配列を含有する。shRNAは、核から細胞質に輸送され、mRNAと共に分解される。Pol IIIまたはU6プロモーターを使用して、RNAiのためのRNAを発現させることができる。Paddisonら〔Genes & Dev.（2002年）16巻：948～958頁、2002年〕は、RNAiを行うための手段として、ヘアピンに折り畳まれた小分子RNAを使用した。したがって、そのような短ヘアピンRNA（shRNA）分子もまた、本明細書に記載される方法において有利に使用される。機能的なshRNAのステムおよびループの長さは変化する；ステム長は、約25～約30ntあたりの範囲であってよく、ループサイズはサイレンシング活性に影響しない4～約25ntの範囲であってよい。いかなる特定の理論によっても束縛されることを望むものではないが、これらのshRNAはDICER RNaseの二本鎖RNA（dsRNA）産物と似ており、いずれにしても、特定の遺伝子の発現を阻害することについて同じ能力を有すると考えられる。shRNAを、レンチウイルスベクターから発現させることができる。miRNAは、「ステムループ」構造を特徴とするプレ-miRNAとして最初に転写された後、RISCによるさらなるプロセシングの後に成熟miRNAにプロセシングされる、約10～70ヌクレオチド長の一本鎖RNAである。

【0274】

siRNAを含むがこれに限定せず、RNAiを媒介する分子は、インビトロで、化学合成（Hohjoh、FEBS Lett、521巻：195～199頁、2002年）、dsRNAの加水分解（Yangら、Proc Natl Acad Sci USA、99巻：9942～9947頁、2002年）、T7 RNAポリメラーゼによるインビトロ転写（Donzeetら、Nucleic Acids Res、30巻：e46頁、2002年；Yuら、Proc Natl Acad Sci USA、99巻：6047～6052頁、2002年）、およびE. coli RNアーゼIIIなどのヌクレアーゼを使用する二本鎖RNAの加水分解（Yangら、Proc Natl Acad Sci USA、99巻：9942～9947頁、2002年）によって生成することができる。

【0275】

別の態様に従うと、本開示は、デコイDNA、二本鎖DNA、一本鎖DNA、複合体化DNA、封入型DNA、ウイルスDNA、プラスミドDNA、ネイキッドRNA、封入型R

10

20

30

40

50

NA、ウイルスRNA、二本鎖RNA、RNA干渉をもたらすことが可能な分子、またはこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されないポリヌクレオチドアンタゴニストを提供する。

【0276】

一部の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドアンタゴニストは、アプタマーである。アプタマーは、ALK4、ActRIIB、ActRIIA、GDF11、GDF8、アクチビン（例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC）、GDF3、BMP6、BMP10、およびBMP9ポリペプチドなどの、標的分子に特異的に結合する三次構造に結合し、それを形成する、二本鎖DNAおよび一本鎖RNA分子を含む核酸分子である。アプタマーの生成および治療の使用は、当該分野で確立されている。例えば、米国特許第5,475,096号を参照されたい。アプタマーに関するさらなる情報は、米国特許出願公開第20060148748号に見出すことができる。核酸アプタマーは、当該分野で公知の方法を使用して、例えば、指数的濃縮によるリガンドの系統的進化（SELEX）プロセスによって選択される。SELEXは、例えば、米国特許第5,475,096号、同第5,580,737号、同第5,567,588号、同第5,707,796号、同第5,763,177号、同第6,011,577号、および同第6,699,843号に記載のような、標的分子に非常に特異的に結合する核酸分子の*in vitro*進化のための方法である。アプタマーを同定するための別のスクリーニング方法は、米国特許第5,270,163号に記載されている。SELEXプロセスは、様々な2次元および3次元構造を形成する核酸の能力、ならびに単量体であっても、多量体であっても、他の核酸分子およびポリペプチドを含む、実質的に任意の化合物とのリガンドとして作用する（特異的結合ペアを形成する）ヌクレオチド単量体内で利用可能な化学的多用途性に基づくものである。任意のサイズおよび組成の分子が、標的として働き得る。SELEX法は、所望の結合アフィニティおよび選択性を達成するために、同じ一般的選択スキームを使用する、候補オリゴヌクレオチドの混合物からの選択ならびに結合、分離および増幅の段階的反復を含む。無作為化配列のセグメントを含んでもよい核酸の混合物から出発して、SELEX法は、結合にとって好ましい条件下で混合物と標的とを接触させる工程；標的分子に特異的に結合した核酸から未結合の核酸を分離する工程；核酸－標的複合体を解離させる工程；核酸－標的複合体から解離した核酸を増幅して、核酸のリガンド濃縮された混合物を得る工程を含む。結合、分離、解離および増幅の工程は、標的分子に対する高度に特異的な高アフィニティ核酸リガンドを得るために、必要に応じて多くのサイクルにわたって繰り返される。

【0277】

典型的に、このような結合分子は、動物に別個に投与される[例えば、O'Connor (1991年)、J. Neurochem.、56巻：560頁を参照されたい]が、このような結合分子はまた、宿主細胞により取り込まれたポリヌクレオチドからインビボで発現させることもでき、インビボで発現させることができる[例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press、Boca Raton、Fla. (1988年)を参照されたい]。

【0278】

本明細書に開示される任意のActRIIアンタゴニストポリヌクレオチドを、1つまたは複数のさらなるActRIIアンタゴニストと組み合わせて、所望のものを達成することができる。例えば、ActRIIアンタゴニストポリヌクレオチドを、i) 1つもしくは複数のさらなるActRIIアンタゴニストポリヌクレオチド、ii) 1つもしくは複数のActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、および／もしくはALK4:ActRIIBヘテロ二量体、iii) 1つもしくは複数のActRIIアンタゴニスト、iv) 1つもしくは複数の小分子ActRIIアンタゴニスト、v) 1つもしくは複数のフォリスタチンポリペプチド、ならびに／またはvi) 1つもしくは複数のFLRGポリペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0279】

7. フォリスタチンおよびFLRGアンタゴニスト

他の態様では、本明細書に開示される方法に従う使用のためのActRIIアンタゴニスト（阻害剤）は、所望の効果を達成する（例えば、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させ、病原体のがんを処置する）ために、単独で、または1つもしくは複数の追加的な支持療法および／もしくは本明細書に開示される活性薬剤と組み合わせて使用することができる、フォリスタチンまたはFLRGポリペプチドである。ある特定の好ましい実施形態では、フォリスタチンまたはFLRGポリペプチドを、免疫療法剤（例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせて使用することができる。

10

【0280】

用語「フォリスタチンポリペプチド」は、フォリスタチンの任意の天然起源のポリペプチドならび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、融合体、およびペプチド模倣形態を含む）を含むポリペプチドを含み、フォリスタチンの任意の機能的単量体または多量体をさらに含む。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のフォリスタチンポリペプチドは、アクチビン、特に、アクチビンAに結合する、および／またはその活性を阻害する。アクチビン結合特性を保持するフォリスタチンポリペプチドの改変体を、フォリスタチンとアクチビンの相互作用を含む以前の研究に基づいて同定することができる。例えば、WO2008/030367は、アクチビン結合にとって重要であることが示されている特異的フォリスタチンドメイン（「FSD」）を開示する。以下の配列番号46～48に示されるように、フォリスタチンのN末端ドメイン（「FSND」、配列番号46）、FSD2（配列番号48）、および比較的程度は低い、FSD1（配列番号47）は、アクチビン結合にとって重要であるフォリスタチン内にある例示的ドメインである。さらに、ポリペプチドのライブラリーを作製し、試験するための方法は、ActRIIポリペプチドの文脈で上に記載されており、そのような方法もまた、フォリスタチンの改変体を作製し、試験することに関する。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と少なくとも約80%同一であり、任意選択で、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれよりも高い同一性を有する配列を有する任意の公知のフォリスタチンの配列に由来するポリペプチドを含む。フォリスタチンポリペプチドの例は、例えば、WO2005/025601に記載されたような、成熟フォリスタチンポリペプチドまたはヒトフォリスタチン前駆体ポリペプチドのより短いアイソフォームもしくは他の改変体（配列番号44）を含む。

20

30

【0281】

ヒトフォリスタチン前駆体ポリペプチドのアイソフォームであるFST344は、以下の通りである。

【化34】

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWTMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRCVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC

```

40

【化35】

```

251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEDE DQDYSFPISS ILEW

```

(配列番号 44; NCBI 参照番号 NP_037541.1)

50

【0282】

シグナルペプチドに下線を付す；上記ではまた、このフォリスタチンアイソフォームを、下記に示される短いフォリスタチンアイソフォームである F S T 3 1 7 から弁別する、C 末端伸長部分を表す最後の 27 残基にも下線を付している。

【0283】

ヒトフォリスタチン前駆体ポリペプチドのアイソフォームである F S T 3 1 7 は、以下の通りである。

【化36】

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG
 RCQVLYKTEL
 51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWKMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
 101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR
 NECALLKARC
 151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSSTCV VDQTNNAAYCV TCNRICPEPA
 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
 251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT
 YASECAMKEA
 301 ACSSGVLLEV KHSWSCN (配列番号 45; NCBI 参照番号 NP_006341.1)

10

20

【0284】

シグナルペプチドに下線を付す。

フォリスタチンの N 末端ドメイン (F S N D) 配列は、以下の通りである。

【化37】

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN
 TLFKWMIFNGGAPNCIPCK (配列番号 46; FSND)

30

F S D 1 および F S D 2 の配列は以下の通りである：

【化38】

ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (配列番号 47; FSD1)
 KTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAAYCVT (配列番号 48; FSD2)

【0285】

他の態様では、本明細書に開示される方法に従う使用のための A c t R I I アンタゴニストは、フォリスタチン関連タンパク質 3 (F S T L 3) としても公知の、フォリスタチン様関連遺伝子 (F L R G) である。用語「F L R G ポリペプチド」は、F L R G の任意の天然起源のポリペプチド、ならび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、融合体、およびペプチド模倣形態を含む）を含む。ある特定の好ましい実施形態では、本開示の F L R G ポリペプチドは、アクチビン、特に、アクチビン A に結合する、および／またはその活性を阻害する。アクチビン結合特性を保持する F L R G ポリペプチドの改変体を、F L R G とアクチビンの相互作用をアッセイするための日常的な方法（例えば、米国特許第 6, 537, 966 号を参照されたい）を使用して同定することができる。さらに、ポリペプチドのライブラリーを作製し、試験するための方法は、A c t R I I ポリペプチドの文脈で上に記載されており、そのような方法もまた、F L R G の改変体を作製し、試験することに関する。F L R G ポリペプチドは、F L R G ポリペプチド

40

50

の配列と少なくとも約 80% 同一であり、任意選択で、少なくとも 85%、90%、95%、97%、99% またはそれよりも高い同一性を有する配列を有する任意の公知の FLRG の配列に由来するポリペプチドを含む。

【0286】

ヒト FLRG 前駆体（フォリスタチン関連タンパク質 3 前駆体）ポリペプチドは、以下の通りである。

【化39】

```

1   MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMGSG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL
51  VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD
101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECCELRA
151 ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC
201 PVPSSPGQEL CGNNNVITYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP
251 PGGESAEIEEE NFV ( 配列番号 49; NCBI 参照番号 NP_005851.1)

```

シグナルペプチドに下線を付す。

【0287】

ある特定の実施形態では、フォリスタチンポリペプチドおよび FLRG ポリペプチドの機能的な改変体または改変形態は、フォリスタチンポリペプチドまたは FLRG ポリペプチドの少なくとも一部を有する融合タンパク質と、例えば、ポリペプチドの単離、検出、安定化、または多量体化を容易とするドメインなど、1つまたは複数の融合ドメインとを含む。適切な融合ドメインについては、ActRII ポリペプチドに関して、上記で詳細に論じられている。一部の実施形態では、本開示のアンタゴニスト作用因子は、Fc ドメインに融合させたフォリスタチンポリペプチドのアクチビン結合性部分を含む融合タンパク質である。別の実施形態では、本開示のアンタゴニスト作用因子は、Fc ドメインに融合させた FLRG ポリペプチドのアクチビン結合性部分を含む融合タンパク質である。

【0288】

本明細書に開示される任意のフォリスタチンポリペプチドを、本開示の1つまたは複数のさらなる ActRII アンタゴニスト剤と組み合わせて、所望の効果を達成することができる。例えば、フォリスタチンポリペプチドを、i) 1つもしくは複数のさらなるフォリスタチンポリペプチド、ii) 1つもしくは複数の ActRII ポリペプチドおよび／もしくは ALK4: ActRIIB ヘテロ多量体、iii) 1つもしくは複数の ActRII アンタゴニスト抗体、iv) 1つもしくは複数の小分子 ActRII アンタゴニスト、v) 1つもしくは複数の ActRII アンタゴニストポリヌクレオチド、ならびに／または vi) 1つもしくは複数の FLRG ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0289】

同様に、本明細書に開示される任意の FLRG ポリペプチドを、本開示の1つまたは複数のさらなる ActRII アンタゴニスト剤と組み合わせて、任意選択で、免疫療法剤（例えば、PD1-PDL1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）とさらに組み合わせて、所望の効果を達成することができる。例えば、FLRG ポリペプチドを、i) 1つもしくは複数のさらなる FLRG ポリペプチド、ii) 1つもしくは複数の ActRII ポリペプチドおよび／もしくは ALK4: ActRIIB ヘテロ多量体、iii) 1つもしくは複数の ActRII アンタゴニスト抗体、iv) 1つもしくは複数の小分子 ActRII アンタゴニスト、v) 1つもしくは複数の ActRII アンタゴニストポリヌクレオチド、ならびに／または vi) 1つもしくは複数のフォリスタチンポリペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0290】

10

20

30

40

50

8. スクリーニングアッセイ

ある特定の態様では、本開示は、A c t R I I アンタゴニストである化合物（薬剤）を同定するための、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチド、A c t R I I A / B 抗体、および／または A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体の使用に関する。このスクリーニングにより同定される化合物を試験して、がんおよび／または腫瘍増殖を調節するその能力を評価する、i n v i v o または i n v i t r o でがんおよび／または腫瘍増殖を調節するその能力を評価することができる。これらの化合物を、例えば、動物モデルにおいて試験することができる。

【0291】

T G F β スーパーファミリーリガンドシグナル伝達（例えば、S M A D シグナル伝達）を標的化することにより組織増殖を調節するための治療剤をスクリーニングするためのいくつかの手法が存在する。ある特定の実施形態では、化合物の高効率スクリーニングを実行して、選択された細胞系に対する T G F β スーパーファミリー受容体により媒介される効果を混乱させる薬剤を同定することができる。ある特定の実施形態では、アッセイは、T G F β スーパーファミリーリガンド（例えば、B M P 2、B M P 2 / 7、B M P 3、B M P 4、B M P 4 / 7、B M P 5、B M P 6、B M P 7、B M P 8 a、B M P 8 b、B M P 9、B M P 10、G D F 3、G D F 5、G D F 6 / B M P 13、G D F 7、G D F 8、G D F 9 b / B M P 15、G D F 11 / B M P 11、G D F 15 / M I C 1、T G F β 1、T G F β 2、T G F β 3、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン A B、アクチビン A C、n o d a l、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ニューロツリン、アルテミン、パーセフィン、M I S、および L e f t y）などの、結合パートナーへの、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチド、A c t R I I A / B 抗体および／または A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体の結合を特異的に阻害するか、または低下させる化合物をスクリーニングし、同定するために実行される。あるいは、このアッセイを使用して、T G F β スーパーファミリーリガンドなどの結合パートナーへの、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチド、A c t R I I A / B 抗体、および／または A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体の結合を増強する化合物を同定することができる。さらなる実施形態では、A c t R I I ポリペプチド、A L K 4 ポリペプチド、A c t R I I A / B 抗体、および／または A L K 4 : A c t R I I B ヘテロ多量体と相互作用するその能力によって、化合物を同定することができる。

【0292】

種々のアッセイ形式が十分であり、そして、本開示を考慮すれば、本明細書中に明示的に記載されない形式は、本明細書中に記載されていないにもかかわらず、当業者によって理解される。本明細書中に記載されるように、本発明の試験化合物（作用因子）は、任意の組み合わせ化学の方法によって作製され得る。あるいは、本主題の化合物は、インビボまたはインビトロで合成された天然に存在する生体分子であり得る。組織増殖の調節因子として作用するその能力について試験される化合物（作用因子）は、例えば、細菌、酵母、植物または他の生物によって生成されても（例えば、天然の生成物）、化学的に生成されても（例えば、ペプチド模倣物を含む低分子）、組換えにより生成されてもよい。本発明によって企図される試験化合物としては、非ペプチジル有機分子、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、糖、ホルモンおよび核酸分子が挙げられる。ある特定の実施形態では、試験作用因子は、約 2 0 0 0 ダルトン未満の分子量を持つ小さな有機分子である。

【0293】

本開示の試験化合物は、単一の別個の実体として提供され得るか、または、組み合わせ化学によって作製されたような、より複雑度の高いライブラリーにおいて提供され得る。これらのライブラリーは、例えば、アルコール、ハロゲン化アルキル、アミン、アミド、エステル、アルデヒド、エーテルおよび有機化合物の他の分類を含み得る。試験システムに対する試験化合物の提示は、特に、最初のスクリーニング段階において、単離された形態または化合物の混合物としてのいずれかであり得る。任意選択で、化合物は、任意選択で他の化合物で誘導体化され得、そして、化合物の単離を容易にする誘導体化基を有し得る

。誘導体化基の非限定的な例としては、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑色蛍光タンパク質、同位体、ポリヒスチジン、磁気ビーズ、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、光活性化クロスリンカー、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0294】

化合物および天然抽出物のライブラリーを試験する多くの薬物スクリーニングプログラムでは、所与の期間に調査される化合物の数を最大化するために高効率アッセイが望ましい。精製または半精製タンパク質を用いて誘導され得るものなどの無細胞系で実施されるアッセイは、試験化合物によって媒介される分子標的における変化の迅速な発達および比較的容易な検出を可能にするためにそれらを生成することができる点で、「一次」スクリーンとして好ましいことが多い。さらに、試験化合物の細胞傷害性またはバイオアベイラビリティの効果は、*in vitro*系では一般に無視することができ、アッセイはその代わりに、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体ならびにその結合パートナー（例えば、BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC、nodal、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、ニューロツリン、アルテミン、パーセフィン、MIS、およびLefty）の間の結合アフィニティの変化において明らかであり得るような分子標的に対する薬物の効果に主に焦点を当てたものである。

【0295】

単なる例示として、本開示の例示的なスクリーニングアッセイでは、関心のある化合物は、アッセイの意図に応じて適宜、通常TGF-βスーパーファミリーリガンドに結合し得る単離および精製されたALK4:ActRIIBヘテロ多量体と接触させられる。その後、化合物とALK4:ActRIIBヘテロ多量体との混合物は、適当なTGF-βスーパーファミリーリガンド（例えば、BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、アクチビンAB、アクチビンAC、nodal、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、ニューロツリン、アルテミン、パーセフィン、MIS、およびLefty）を含む組成物に加えられる。ヘテロ多量体-スーパーファミリーリガンド複合体の検出および定量は、ALK4:ActRIIBヘテロ多量体とその結合タンパク質との間の複合体の形成の阻害（または助長）における化合物の効力を決定するための手段を提供する。化合物の効力は、種々の濃度の試験化合物を用いて得られたデータから用量応答曲線を生成することによって評価され得る。さらに、比較のためのベースラインを提供するためのコントロールアッセイもまた行われ得る。例えば、コントロールアッセイでは、単離および精製されたTGF-βスーパーファミリーリガンドは、ALK4:ActRIIBヘテロ多量体を含む組成物に加えられ、そして、ヘテロ多量体リガンド複合体の形成は、試験化合物の非存在下で定量される。一般に、反応物が混合され得る順序は変化し得、そして、同時に混合され得ることが理解される。さらに、適切な無細胞アッセイ系を与えるように、精製したタンパク質の代わりに、細胞の抽出物および溶解物が使用され得る。

【0296】

ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体の、別のタンパク質への結合を、様々な技術によって検出することができる。例えば、複合体の形成の調節を、例えば、イムノアッセイ、またはクロマトグラフィー検出により、放射標識（例えば、³²P、³⁵S、¹⁴

10

20

30

40

50

Cもしくは³H)された、蛍光標識(例えば、FITC)された、もしくは酵素標識されたActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/もしくはALK4:ActRIIBヘテロ多量体などの検出可能に標識されたタンパク質ならびに/または結合タンパク質を使用して定量することができる。

【0297】

ある特定の実施形態では、本開示は、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体と、結合タンパク質との相互作用の程度を、直接的または間接的に測定する際の、蛍光偏光アッセイおよび蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)アッセイの使用を企図する。さらに、光導波路(PCT公開WO96/26432および米国特許第5,677,196号)、表面プラズモン共鳴(SPR)、表面電荷センサー、および表面力センサーに基づくものなどの、他の検出様式は、本開示の多くの実施形態と適合する。

【0298】

さらに、本開示は、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体と、結合パートナーとの相互作用を破壊する、または強化する薬剤を同定するための、「2ハイブリッドアッセイ」としても公知の相互作用捕捉アッセイの使用を企図する。例えば、米国特許第5,283,317号;Zervosら(1993年)Cell 72巻:223~232頁;Maduraら(1993年)J Biol Chem 268巻:12046~12054頁;Bartelら(1993年)Biotechniques 14巻:920~924頁;およびIwabuchiら(1993年)Oncogene 8巻:1693~1696頁を参照されたい。特定の実施形態では、本開示は、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体と、結合タンパク質との相互作用を解離させる化合物(例えば、小分子またはペプチド)を同定するための逆2ハイブリッド系の使用を企図する[VidalおよびLegrain(1999年)Nucleic Acids Res 27巻:919~29頁;VidalおよびLegrain(1999年)Trends Biotechnol 17巻:374~81頁;ならびに米国特許第5,525,490号;同第5,955,280号;および同第5,965,368号]。

【0299】

ある特定の実施形態では、対象化合物は、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体と相互作用するその能力によって同定される。化合物と、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体との相互作用は、共有結合性または非共有結合性であってもよい。例えば、そのような相互作用を、光架橋、放射標識リガンド結合、およびアフィニティクロマトグラフィーを含む、*in vitro*での生化学的方法を使用して、タンパク質レベルで同定することができる[Jakoby WBら(1974年)Methods in Enzymology 46巻:1頁]。ある特定の場合、化合物は、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体に結合する化合物を検出するためのアッセイなどの、機構に基づくアッセイにおいてスクリーニングされ得る。これは、固相または液相結合事象を含んでもよい。あるいは、ActRIIポリペプチド、ALK4ポリペプチド、ActRIIA/B抗体、および/またはALK4:ActRIIBヘテロ多量体をコードする遺伝子を、レポーター系(例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または緑色蛍光タンパク質)と共に細胞中にトランスフェクトし、好ましくは、高効率スクリーニングにより、またはライブラリーの個々のメンバーを用いて、ライブラリーに対してスクリーニングすることができる。他の機構に基づく結合アッセイ;例えば、自由エネルギーの変化を検出する結合アッセイを使用してもよい。結合アッセイを、ウェル、ビーズもしくはチップに固定された、または固定された抗体により捕捉された、またはキャピラリー電気泳動により分解された標的を用いて実施することができる。結合した化合物を、通常は比色終点または蛍光もしくは表

10

20

30

40

50

面プラズモン共鳴を使用して検出することができる。

【0300】

9. 例示的な治療的使用

本明細書に記載されるように、出願人は、A c t R I I アンタゴニスト（阻害剤）が、単独で、または免疫療法剤と組み合わせて、例えば、がん患者における全身腫瘍組織量の減少および生存時間の増大を含む、がんの処置における驚くべき正の効果を有することを発見した。したがって、本開示は、部分的には、がんを処置するため、特に、がんの1つまたは複数の合併症を処置または防止するため（例えば、全身腫瘍組織量を減少させるため）に、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤（例えば、免疫療法剤）と組み合わせて、A c t R I I アンタゴニストを使用する方法を提供する。さらに、データは、A c t R I I アンタゴニスト療法の効能が、免疫系に依存することを示す。したがって、部分的には、本開示は、A c t R I I アンタゴニストを、単独で、または1つまたは複数の追加的な活性薬剤と組み合わせて、免疫療法剤として使用して、特に、様々ながん（例えば、免疫抑制および／または免疫疲弊と関連するがん）を処置することができるという発見に関する。他の公知の免疫腫瘍剤と同様、A c t R I I アンタゴニストが患者における免疫応答を強化する能力は、がんの分野の外ではるかに幅広い治療との関連を有し得る。例えば、免疫強化剤は、様々な感染性疾患、特に、免疫抑制および／または免疫疲弊を促進する病原因子を処置する際に有用であり得ることが提唱されている。また、そのような免疫強化剤は、ワクチン（例えば、感染性疾患およびがんワクチン）の免疫化効能を強化する際に有用であり得る。したがって、本開示は、単独で、または組み合わせて、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と共に使用して、免疫応答を増加させることを必要とする対象における免疫応答を増加させる、がんを処置する、感染性疾患を処置する、および／またはワクチン接種／免疫化効能を増加させることができる様々なA c t R I I アンタゴニストを提供する。

【0301】

本明細書に記載され、特許請求される方法およびA c t R I I アンタゴニストを使用して、悪性または前悪性状態を処置する、および本明細書に記載の障害を含むがこれらに限定されない、新生物または悪性状態への進行を防止することができる。そのような使用は、特に、過形成、化生、または最も特には、異形成からなる非新生物性細胞増殖が起こった場合に、新生物またはがんへの進行に先行することが知られる、または疑われる状態で示される。

【0302】

ある特定の態様では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤（例えば、P D 1－P D L 1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A／B 抗体）を使用して、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍を処置することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、がんまたは腫瘍細胞の増殖を阻害することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、がんまたは腫瘍の進行を阻害することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍の進行を阻害することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、がんまたは腫瘍の転移を阻害または防止することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍の転移を阻害または防止することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組

み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、がんまたは腫瘍細胞に対する免疫応答を増強することを必要とする患者におけるがんまたは腫瘍細胞に対する免疫応答を増強することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者における抗がん／腫瘍免疫応答を回避する免疫抑制と関連する、またはそれを用いるがんまたは腫瘍を処置することができる。

【0303】

一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤（例えば、P D 1－P D L 1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニスト（例えば、A c t R I I A／B 抗体）を使用して、がんまたは腫瘍を処置することを必要とする患者における抗がん／腫瘍T細胞活性を回避するT細胞疲弊と関連する、またはそれを用いるがんまたは腫瘍を処置することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、抗がん／腫瘍免疫応答を増加させることを必要とする患者における抗がん／腫瘍免疫応答を増加させることができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、T細胞活性を増加させることを必要とする患者におけるT細胞活性を増加させることができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、免疫抑制と関連する疾患または状態のリスクがある対象を処置することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、免疫抑制と関連する疾患または状態のリスクがある対象を処置することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、T細胞疲弊と関連する疾患もしくは状態のリスクがある、またはT細胞疲弊を生じるリスクがある対象を処置することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、T細胞疲弊を処置または防止することを必要とする対象におけるT細胞疲弊を処置または防止することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、がんまたは細胞増殖疾患もしくは障害の症状を防止する、処置する、または軽減することを必要とする対象における、がんまたは細胞増殖疾患もしくは障害の症状を防止する、処置する、または軽減することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、免疫療法に応答するがんまたは腫瘍を阻害する、処置する、または防止することができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、免疫監視を増加させることを必要とする対象における免疫監視を増加させることができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストおよび／または活性薬剤を使用して、がんまたは腫瘍細胞に対する免疫を増加させることを必要とする対象におけるがんまたは腫瘍細胞に対する免疫を増加させることができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法と組み合わせた、A c t R I I アンタ

10

20

30

40

50

ゴニストを使用して、受動免疫を能動免疫に変換させることを必要とする対象における標的（例えば、がん細胞または感染性因子）に対する受動免疫を能動免疫に変換させることができる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法と組み合わせた、A c t R I I アンタゴニストを使用して、内因性免疫応答を強化することを必要とする対象（例えば、がん患者または感染性疾患を有する患者）における内因性免疫応答を強化することができる。ある特定の実施形態では、処置のための好ましい対象は、免疫応答の増加を必要とする患者である。

【0304】

本明細書中で使用される場合、障害または状態を「予防する」治療薬は、統計的試料において、無処置の対照試料に対して、処置試料における障害もしくは状態の出現を低下させるか、あるいは、無処置の対照試料に対して、障害もしくは状態の1または複数の症状の発症を遅延させるか、または、重篤度を低下させるような化合物を指す。

【0305】

用語「処置する」は、本明細書中で使用される場合、一度確立された状態の改善もしくは除去を含む。いずれの場合にも、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される結果において認識され得る。

【0306】

一般に、本開示に記載される疾患または状態の処置または防止は、任意選択で、1つまたは複数の追加的な活性薬剤（例えば、P D 1 - P D L 1 アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせた、1つまたは複数のA c t R I I アンタゴニストを、有効量で投与することによって達成される。薬剤の有効量とは、所望の治療または予防結果を達成するのに必要な用量で、および期間にわたって有効な量を指す。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、ならびに個体における所望の応答を惹起する薬剤の能力などの因子に応じて変化し得る。予防有効量とは、所望の予防結果を達成するのに必要な用量で、および期間にわたって有効な量を指す。

【0307】

一般に、腫瘍とは、良性および悪性のがん、ならびに休止状態の腫瘍を指す。一般に、がんとは、一次悪性細胞または腫瘍（例えば、細胞が元の悪性腫瘍または腫瘍の部位以外の対象の体内の部位に移動していないもの）および二次悪性細胞または腫瘍（例えば、元の腫瘍の部位とは異なる二次的な部位への悪性細胞または腫瘍細胞の移動である転移から生じるもの）を指す。転移は、局所性または遠隔性であり得る。転移は、特定の症状のモニタリングに加えて、磁気共鳴イメージング（MRI）走査、コンピュータ断層撮影（CT）走査、血液および血小板計数、肝機能検査、胸部X線、骨走査の単独使用または組み合わせた使用、ならびにその組合せにより検出されることが最も多い。

【0308】

一般に、免疫応答とは、刺激原に対する、B細胞、T細胞（C D 4 もしくはC D 8）、調節性T細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、N K T細胞、N K細胞、好塩基球、好酸球、または好中球などの免疫系の細胞による応答を指す。一部の実施形態では、応答は、特定の抗原に特異的であり（「抗原特異的応答」）、その抗原特異的受容体を介する、C D 4 T細胞、C D 8 T細胞、またはB細胞による応答を指す。一部の実施形態では、免疫応答は、C D 4 + 応答またはC D 8 + 応答などのT細胞応答である。これらの細胞によるそのような応答は、例えば、細胞傷害、増殖、サイトカインもしくはケモカイン産生、輸送、または食作用を含んでもよく、応答を受けている免疫細胞の性質に依存し得る。免疫応答は、侵入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん性もしくは他の異常な細胞、または自己免疫もしくは病理的炎症の場合、正常細胞もしくは組織の選択的標的化、それへの結合、それに対する損傷、その破壊、および／またはその体内からの排除をもたらす得る。

【0309】

宿主免疫応答の免疫抑制は、持続感染および腫瘍免疫抑制におけるものなどの、様々な慢性免疫状態において役割を果たしている。免疫系に関して、本明細書で使用される場合、

10

20

30

40

50

「非応答性」または「機能的疲弊」は一般に、活性化受容体またはサイトカインによる刺激などの刺激に対する免疫細胞の不応性 (refractivity) を指す。非応答性は、例えば、免疫抑制剤への曝露、高用量もしくは一定用量の抗原への曝露のため、またはPD-1もしくはTIM-3などの阻害剤受容体の活性によって生じ得る。本明細書で使用される場合、用語「非応答性」は、活性化刺激に対する不応性を含む。そのような不応性は、一般に、抗原特異的であり、抗原への曝露が停止した後にも持続する。非応答性免疫細胞は、同じ型の対応する対照免疫細胞と比較して、細胞傷害活性、サイトカイン産生、増殖、輸送、食作用活性、またはそれらの任意の組合せの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはさらには100%の減少を有し得る。

10

【0310】

一般に、免疫療法とは、免疫応答を誘導すること、増強すること、抑制すること、またはそうでなければ改変することを含む方法による、疾患に罹患した、または疾患の再発に罹る、もしくは罹患するリスクがある対象の処置を指す。

【0311】

一般に、免疫応答の強化とは、対象における現存の免疫応答の有効性または効力の活性化または増大を指す。有効性および効力のこの活性化または増大は、例えば、内因性宿主免疫応答を抑制する機構に打ち勝つことにより、または内因性宿主免疫応答を活性化／増強する機構を刺激することにより達成され得る。

20

【0312】

任意選択で、本開示の1つまたは複数の追加的な活性薬剤（例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせた、ActRIIアンタゴニストを、膀胱、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、子宮頸部、膵臓、直腸、前立腺、胃、表皮のがん；リンパ球または骨髄系列の造血腫瘍；線維肉腫または横紋筋肉腫などの間葉起源の腫瘍；メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、腺癌および非小細胞肺癌などの他の腫瘍型を含むがこれらに限定されない、様々な形態のがんの処置において使用することができる。がんの例は、癌腫、リンパ腫、グリア芽腫、メラノーマ、肉腫、および白血病、骨髄腫、またはリンパ性悪性腫瘍を含むがこれらに限定されない。そのようながんのより特定の例は、以下に記載され、扁平上皮がん（例えば、扁平上皮細胞がん）、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、星状細胞腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮がんを含む肺がん、腹膜のがん、肝細胞がん、胃腸がんを含む胃がん (gastric cancer, stomach cancer)、膵がん、多形成グリア芽細胞腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、肝癌、肝細胞癌、神経内分泌腫瘍、甲状腺髄様がん、分化甲状腺癌、乳がん、卵巣がん、結腸がん、直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮癌、唾液腺癌、腎臓がんまたは腎がん、前立腺がん、外陰がん、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部がんを含む。

30

【0313】

がんまたは悪性腫瘍の他の例は、急性リンパ芽球性小児白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、成人（原発性）肝細胞がん、成人（原発性）肝臓がん、成人急性リンパ性白血病、成人急性骨髄性白血病、成人ホジキンリンパ腫、成人リンパ性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、成人原発性肝臓がん、成人軟部組織肉腫、AIDS関連リンパ腫、AIDS関連悪性腫瘍、肛門がん、星状細胞腫、胆管がん、骨肉腫、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、乳がん、腎盂および尿管のがん、中枢神経系（原発性）リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、子宮頸がん、小児（原発性）肝細胞がん、小児（原発性）肝臓がん、急性リンパ芽球性小児白血病、急性骨髄性小児白血病、小児脳幹グリオーマ、小児小脳星状細胞腫、小児大脳星状細胞腫、小児頭蓋外胚細胞腫瘍、小児ホジキン病、小児ホジキンリンパ腫、小児視床下部および視経路神経膠腫、リンパ芽球性小児白血病、小児髓芽腫、小児非ホジキンリンパ腫、小児松果体およびテント上原始神経外胚葉腫瘍、小児原発性肝臓がん、小児横紋筋肉腫、小児軟部組織肉腫、小児視経路および視床下部神経膠腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性

40

50

白血病、結腸がん、皮膚T細胞リンパ腫、膵内分泌腫瘍、子宮内膜がん、上衣腫、上皮がん、食道がん、ユーイング肉腫および関連腫瘍、膵外分泌腫瘍、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、女性乳がん、ゴーシェ病、胆嚢がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管腫瘍、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛性腫瘍、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、肝細胞がん、ホジキンリンパ腫、高ガンマグロブリン血症、下咽頭がん、大腸がん、眼内メラノーマ、膵島細胞癌、膵島細胞がん、カボジ肉腫、腎臓がん、喉頭がん、口唇および口腔がん、肝臓がん、肺がん、リンパ増殖性疾患、マクログロブリン血症、男性乳がん、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髄芽腫、メラノーマ、中皮腫、転移性原発不明扁平上皮頸部がん、転移性原発性扁平上皮頸部がん、転移性扁平上皮頸部がん、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／形質細胞新生物、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、骨髄白血病、骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔がん、上咽頭がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非メラノーマ皮膚がん、非小細胞肺がん、原発不明転移性扁平上皮頸部がん、口腔咽頭がん、骨／悪性線維性肉腫、骨肉腫／悪性線維性組織球腫、骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵がん、異常タンパク血症、副甲状腺がん、陰茎がん、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性肝臓がん、前立腺がん、直腸がん、腎細胞がん、腎盂および尿管がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、サルコイドーシス肉腫、セザリー症候群、皮膚がん、小細胞肺がん、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮頸部がん、胃がん、テント上原始神経外胚葉および松果体腫瘍、T細胞リンパ腫、精巣がん、胸腺腫、甲状腺がん、腎盂および尿管の移行上皮がん、移行腎盂および尿管がん、絨毛性腫瘍、尿管および腎盂細胞がん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、視経路および視床下部神経膠腫、外陰がん、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、ならびに上に列挙された臓器系に位置する、新生物を除く任意の他の過増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。

【0314】

異形成は、頻繁には、がんの前兆であり、主に上皮に見出される。それは、個々の細胞均一性および細胞の構造的な向きの喪失を含む、最も無秩序な形態の非新生物性細胞増殖である。異形成は、特徴的には、慢性的な刺激または炎症が存在する場所で生じる。一部の実施形態では、任意選択で、1つまたは複数の追加的な支持療法および／または活性薬剤と組み合わせた、ActRIIアンタゴニストを使用して、異形成障害を処置することができる。異形成障害は、無汗性外胚葉性形成異常、前後異形成、窒息性胸郭異形成、心房指異形成 (*atriodigital dysplasia*)、気管支肺異形成、脳異形成、子宮頸部異形成、軟骨外胚葉異形成、鎖骨頭蓋異形成、先天性外胚葉異形成、頭蓋骨幹異形成、頭蓋手根足根骨異形成、頭蓋骨幹端異形成、象牙質異形成、骨幹異形成、外胚葉異形成、エナメル質異形成、脳眼異形成、半肢骨端異形成 (*dysplasia epiphysialis hemimelia*)、多発性骨端異形成、点状骨端異形成 (*dysplasia epiphysialis punctata*)、上皮異形成、顔面指趾生殖器異形成、下顎の家族性線維性異形成、家族性白色癩性異形成、線維筋性異形成、線維性骨異形成、開花性骨異形成、遺伝性腎－網膜異形成、発汗性外胚葉異形成、発汗減少症性外胚葉異形成、リンパ球減少性胸腺異形成、乳腺異形成、下顎顔面異形成、骨幹端異形成 (*metaphysial dysplasia*)、モンディーニ型内耳異形成、単骨性線維性骨異形成、粘膜上皮異形成、多発性骨端異形成、眼耳脊椎異形成、眼歯指異形成、眼脊椎異形成、歯原性異形成、眼下顎四肢異形成、根尖性セメント質異形成、多発性線維性骨異形成、偽軟骨發育不全脊椎骨端異形成、網膜異形成、中隔視神経異形成、脊椎骨端異形成、および心室焼骨異形成を含むが、これらに限定されない。

【0315】

任意選択で、1つまたは複数の追加的な活性薬剤（例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせた、ActRIIアンタゴニストで処置され得るさらなる前新生物障害は、良性増殖異常障害（例えば、良性腫瘍、線維嚢胞性状態、組織肥大、腸ポリープまたはアデノーマ、および食道異形成）、白板症、角化症、ボーエン病、農夫皮膚、日光口唇炎、および日光性角化症を含むがこれらに限定され

10

20

30

40

50

ない。

【0316】

任意選択で、1つまたは複数の追加的な活性薬剤（例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と組み合わせた、ActRIIアンタゴニストで処置され得るさらなる過増殖性疾患、障害、および／または状態は、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病を含む））および慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）を含む）、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖疾患、ならびに線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫などの肉腫および癌腫、結腸癌、膵がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫（emangioblastoma）、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽腫、および網膜芽細胞腫などの肉腫および癌腫を含むがこれらに限定されない固形腫瘍などの悪性腫瘍および関連障害の進行および／または転移を含むがこれらに限定されない。

【0317】

ある特定の態様では、細胞傷害剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、免疫調節剤、抗生物質、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、ケモカイン、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素または他の活性薬剤などががん治療剤を、1つまたは複数のActRIIアンタゴニストと組み合わせて使用することができる。有用な薬物は、例えば、抗有糸分裂剤、抗キナーゼ剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、アルカロイド剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、およびその組合せから選択される薬学的特性を有し得る。

【0318】

本明細書で使用される場合、「と組み合わせた」、「共同投与」、「共同的に」とは、さらなる療法（例えば、第2、第3、第4など）が体内で依然として有効である（例えば、複数の化合物が患者において同時に有効であり、これらの化合物の相乗効果を含んでもよい）ような任意の形態の投与を指す。有効性は、血液、血清、または血漿中での薬剤の測定可能な濃度と相関しなくてもよい。例えば、異なる治療化合物を、同時に、または連続的に、異なるスケジュールで、同じ製剤中で、または別々の製剤中で投与することができる。かくして、そのような処置を受ける個体は、異なる療法の組み合わせた効果から利益を得ることができる。本開示の1つまたは複数のActRIIアンタゴニストを、1つまたは複数の他のさらなる薬剤および／または支持療法（例えば、PD1-PDL1アンタゴニストなどの免疫チェックポイント阻害剤）と同時に、その前に、またはその後に投与することができる。一般に、それぞれの治療剤は、その特定の薬剤について決定された用量および／または時間スケジュールで投与されるであろう。レジメンにおいて使用するための特定の組合せは、本開示のアンタゴニストと、療法および／または所望のもののとの適合性を考慮に入れる。

【0319】

有用な薬物の例は、フルオロウラシル、アフアチニブ、アブリジン、アザリビン、アナストロゾール、アントラサイクリン、アキシチニブ、アミノグルテチミド、アムサクリン、AVL-101、AVL-291、ベンダムスチン、ブレオマイシン、ブセレリン、ボルテゾミブ、ボスチニブ、ピカルタミド、プリオスタチン-1、ブスルファン、カペシタビン、カリケアマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、10-ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン（CDDP）、Cox-2阻害剤、イリノテカン（CPT-11）、SN-38、クラドリビン、カンプトテカン、クリゾチニブ、コルヒチン、シクロホスファミド、シタラビン、シプロテロン、

クロドロナート、ダカルバジン、ダサチニブ、ジエネストロール、ジナシクリブ、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエチルスチルベストロール、ドキシソルビシン、2-ピロリノドキシソルビシン (2P-D O X)、シアノーモルホリノドキシソルビシン、ドキシソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エルロチニブ、エストラムスチン、エピドフィロトキシシン、エルロチニブ、エンチノスタット、エストロゲン受容体結合剤、エトポシド (V P 1 6)、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フィンゴリモッド、フロクスウリジン (F U d R)、フルオキシメステロン、3', 5'-O-ジオレオイル-F u d R (F U d R-d O)、フルドロコルチゾン、フルダラビン、フルタミド、ゴセレリン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、フラボピリドール、フォスタマチニブ、ガネテスピブ、G D C-0 8 3 4、G S-1 1 0 1、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イブルチニブ、イダルビシン、レバミソール、イデラリシブ、イフォスファミド、イマチニブ、レトロゾール、アスパラギナーゼ、ロイプロリド、ラパチニブ、レノリダミド、ロイコボリン、イリノテカン、L F M-A 1 3、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、メゲストロール、メトトレキサート、ミトキサントロン、ニルタミド、ミトラマイシン、マイトマイシン、ノコダゾール、オクトレオチド、ミトタン、ナベルピン、ネラチニブ、ニロチニブ、ニトロソウレア、オラパリブ、プリコマイシン、プロカルバジン、パクリタキセル、オキサリプラチン、P C I-3 2 7 6 5、ペントスタチン、プリカマイシン、P S I-3 4 1、ラロキシフェン、セムスチン、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、S U 1 1 2 4 8、スニチニブ、タモキシフェン、ポルフィマー、テモゾロミド、メスナ、テマゾロミド (D T I C の水性形態)、トランス白金、サリドマイド、チオグアニン、ラルチトレキセド、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、バタラニブ、ビノレルビン、ビンブラスチン、リツキシマブ、パミドロナート、ピンクリスチン、ピンカアルカロイドおよび Z D 1 8 3 9 を含むがこれらに限定されない。

【0320】

有用な毒素は、リシン、アブリン、アルファ毒素、サポリン、リボヌクレアーゼ (R N a s e)、例えば、オンコナーゼ、D N a s e I、ブドウ球菌エントロトキシシン-A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス菌外毒素、およびシュードモナス菌内毒素を含んでもよい。

【0321】

有用なケモカインは、R A N T E S、M C A F、M I P 1-アルファ、M I P 1-ベータおよび I P-1 0 を含んでもよい。

【0322】

ある特定の実施形態では、アンギオスタチン、バキュロスタチン、カンスタチン、マスピン、抗 V E G F 抗体、抗 P L G F ペプチドおよび抗体、抗血管増殖因子抗体、抗 F l k-1 抗体、抗 F l t-1 抗体およびペプチド、抗 K r a s 抗体、抗 c M E T 抗体、抗 M I F (マクロファージ移動阻害因子) 抗体、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン-1 2、I P-1 0、G r o-ベータ、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、C M 1 0 1、マリマスタット、ポリ硫酸ペントサン、アンギオポエチン-2、インターフェロン-アルファ、ハービマイシン A、P N U 1 4 5 1 5 6 E、1 6 K プロラクチンフラグメント、リノミド (ロキニメックス)、サリドマイド、ペントキシフェリン、ゲニステイン、T N P-4 7 0、エンドスタチン、パクリタキセル、アックチン、アンギオスタチン、シドフォビル、ピンクリスチン、ブレオマイシン、A G M-1 4 7 0、血小板因子 4、A L K 1 ポリペプチド (例えば、ダランテルセプト) またはミノサイクリンなどの抗血管新生剤が、1 つまたは複数の A c t R I I アンタゴニストと組み合わせて有用であり得る。

【0323】

有用な免疫調節剤は、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、インターフェロン（ＩＦＮ）、エリスロポエチン、トロンボポエチンおよびその組合せから選択され得る。特に有用なものは、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）などのリンホトキシン、インターロイキン（ＩＬ）などの造血因子、顆粒球－コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）または顆粒球マクロファージ－コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）などのコロニー刺激因子、インターフェロン－アルファ、－ベータ、または－ラムダなどのインターフェロン、ならびに「Ｓ１因子」と命名されたものなどの幹細胞増殖因子である。サイトカインに含まれるものは、ヒト増殖ホルモン、Ｎ－メチオニルヒト増殖ホルモン、およびウシ増殖ホルモンなどの増殖ホルモン；副甲状腺ホルモン；サイロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、および黄体形成ホルモン（ＬＨ）などの糖タンパク質ホルモン；肝増殖因子；プロスタグランジン、線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン、ＯＢタンパク質；腫瘍壊死因子－アルファおよび－ベータ；ミューラー管阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（ＴＰＯ）；ＮＧＦ－ベータなどの神経成長因子；血小板増殖因子；ＴＧＦ－アルファおよびＴＧＦβなどのトランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ）；インスリン様増殖因子ⅠおよびⅡ；エリスロポエチン（ＥＰＯ）；骨誘導因子；インターフェロン－アルファ、－ベータ、および－ガンマなどのインターフェロン；マクロファージ－ＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ）などのコロニー刺激因子（ＣＳＦ）；ＩＬ－１、ＩＬ－１アルファ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２５などのインターロイキン（ＩＬ）、ＬＩＦ、ｋｉｔリガンドまたはＦＬＴ－３、アンギオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、腫瘍壊死因子およびＬＴである。

【 0 3 2 4 】

有用な放射性核種は、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}Pb 、および ^{227}Th を含むがこれらに限定されない。治療的放射性核種は、好ましくは、オージェ放射体については $20\sim 6,000\text{ keV}$ の範囲、好ましくは、 $60\sim 200\text{ keV}$ の範囲、ベータ放射体については $100\sim 2,500\text{ keV}$ 、およびアルファ放射体については $4,000\sim 6,000\text{ keV}$ の崩壊エネルギーを有する。有用なベータ粒子を放出する核種の最大崩壊エネルギーは、好ましくは $20\sim 5,000\text{ keV}$ 、より好ましくは $100\sim 4,000\text{ keV}$ 、最も好ましくは $500\sim 2,500\text{ keV}$ である。また、オージェ放出粒子と共に実質的に崩壊する放射性核種も好ましい。例えば、 $\text{Co-}58$ 、 $\text{Ga-}67$ 、 $\text{Br-}80\text{m}$ 、 $\text{Tc-}99\text{m}$ 、 $\text{Rh-}103\text{m}$ 、 $\text{Pt-}109$ 、 $\text{In-}111$ 、 $\text{Sb-}119$ 、 $\text{I-}125$ 、 $\text{Ho-}161$ 、 $\text{Os-}189\text{m}$ および $\text{Ir-}192$ である。有用なベータ粒子を放出する核種の崩壊エネルギーは、好ましくは $1,000\text{ keV}$ 未満、より好ましくは 100 keV 未満、最も好ましくは 70 keV 未満である。また、アルファ粒子の生成と共に実質的に崩壊する放射性核種も好ましい。そのような放射性核種は、 $\text{Dy-}152$ 、 $\text{At-}211$ 、 $\text{Bi-}212$ 、 $\text{Ra-}223$ 、 $\text{Rn-}219$ 、 $\text{Po-}215$ 、 $\text{Bi-}211$ 、 $\text{Ac-}225$ 、 $\text{Fr-}221$ 、 $\text{At-}217$ 、 $\text{Bi-}213$ 、 $\text{Th-}227$ および $\text{Fm-}255$ を含むがこれらに限定されない。有用なアルファ粒子を放出する放射性核種の崩壊エネルギーは、好ましくは $2,000\sim 10,000\text{ keV}$ 、より好ましくは $3,000\sim 8,000\text{ keV}$ 、最も好ましくは $4,000\sim 7,000\text{ keV}$ である。有用なさらなる潜在的な放射性同位体は、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}

A_u, 224Ac, 126I, 133I, 103Ru, 105Ru, 107Hg, 203

Hg、¹²¹mTe、¹²²mTe、¹²⁵mTe、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁷Tm、⁷⁷Br、¹¹³mIn、⁹⁵Ru、⁹⁷Ru、¹⁶⁸Tm、¹⁹⁷Pt、¹⁰⁹Pd、¹⁰⁵Rh、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Ho、¹⁹⁹Au、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵¹Cr、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、²⁰¹Tl、²²⁵Ac、⁷⁶Br、および¹⁶⁹Ybを含む。

【0325】

一部の実施形態では、ActRIIアンタゴニストは、少なくとも1つのアルキル化剤、ニトロソウレア、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、アントラサイクリン、コルチコステロイドホルモン、性ホルモン、および／または標的抗腫瘍化合物と組み合わせた使用のためのものである。

【0326】

標的抗腫瘍化合物は、標準的な化学療法薬ができるよりも特異的にがん細胞を攻撃するように設計された薬物である。これらの化合物の多くは、ある特定の遺伝子の変異を担持する細胞、またはこれらの遺伝子のコピーを過剰発現する細胞を攻撃する。一実施形態では、抗腫瘍化合物は、イマチニブ（Gleevec）、ゲフィチニブ（Iressa）、エルロチニブ（Tarceva）、リツキシマブ（Rituxan）、またはペバシズマブ（Avastin）であってもよい。

【0327】

アルキル化剤は、DNAに直接作用して、がん細胞が増殖するのを防止する。これらの薬剤は、細胞周期の任意の特定の期に特異的なものではない。一実施形態では、アルキル化剤を、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イフォスファミド、デカルバジン（DTIC）、メクロレタミン（窒素マスタード）、メルファラン、およびテモゾロミドから選択することができる。

【0328】

代謝拮抗剤は、DNAおよびRNA合成を阻害する薬物のクラスを構成する。これらの薬剤は、細胞周期のS期の間に作用し、白血病、乳房、卵巣、および消化管の腫瘍、ならびに他のがんを処置するために一般的に使用される。一実施形態では、代謝拮抗剤は、5-フルオロウラシル、カペシタビン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ゲムシタビン、シタラビン（ara-C）、フルダラビン、またはペメトレキセドであり得る。

【0329】

トポイソメラーゼ阻害剤は、DNA複製において重要であるトポイソメラーゼ酵素を阻害する薬物である。トポイソメラーゼI阻害剤の一部の例としては、トポテカンおよびイリノテカンが挙げられるが、トポイソメラーゼII阻害剤の一部の代表例としては、エトポシド（VP-16）およびテニポシドが挙げられる。

【0330】

アントラサイクリンも、DNA複製に関与する酵素を阻害する化学療法薬である。これらの薬剤は、細胞周期の全ての期において作用し、かくして、様々ながんの処置として広く使用されている。一実施形態では、本発明に関して使用されるアントラサイクリンは、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリマイシン）、エピルビシン、イダルビシン、またはミトキサントロンであり得る。

【0331】

腫瘍は、特に、腫瘍抗原に特異的であるT細胞中で、ある特定の免疫チェックポイント経路を同時選択することによって免疫監視を回避する（Pardoll、2012年、Nature Reviews Cancer 12巻：252～264頁）。がん療法のためのチェックポイント阻害剤抗体に関する研究は、がん処置に対して耐性であると以前は考えられていたがんを処置するのに成功している（例えば、OttおよびBhardwaj、2013年、Frontiers in Immunology 4巻：346頁；MenziesおよびLong、2013年、Ther Adv Med Oncol 5巻：278～85頁；Pardoll、2012年、Nature Reviews Cancer 12巻：252～64頁；MavilioおよびLugliを参照されたい）。大部分の抗がん剤とは対照的に、チェックポイント阻害剤は腫瘍細胞を直接標的化するのではなく、リンパ球受容体ま

10

20

30

40

50

たはそのリガンドを標的化して、免疫系の内因性抗腫瘍活性を増強する（Pardoll、2012年、Nature Reviews Cancer 12巻：252～264頁）。そのような阻害剤は主として、疾患を有する細胞、組織または病原体に対する免疫応答を調節することによって作用するため、それらを、そのような薬剤の抗腫瘍効果を増強するための対象となるActRIIアンタゴニスト、ADCおよび／またはインターフェロンなどの他の治療モダリティと組み合わせて使用することができる。

【0332】

抗PD1抗体は、メラノーマ、非小細胞肺癌、膀胱がん、前立腺がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、トリプルネガティブ乳がん、白血病、リンパ腫および腎細胞がんの処置のために使用されてきた（Topalianら、2012年、N Engl J Med 366巻：2443～54頁；Lipsonら、2013年、Clin Cancer Res 19巻：462～8頁；Bergerら、2008年、Clin Cancer Res 14巻：3044～51頁；Gildener-Leapmanら、2013年、Oral Oncol 49巻：1089～96頁；MenziesおよびLong、2013年、Ther Adv Med Oncol 5巻：278～85頁）。例示的な抗PD1抗体としては、ランプロリズマブ（MK-3475、MERCK）、ニボルマブ（BMS-936558、Bristol-Myers Squibb）、AMP-224（Merck）、およびピディリズマブ（CT-011、Curetech Ltd.）が挙げられる。抗PD1抗体は、例えば、ABCAM（AB137132）、Biolegend（EH12.2H7、RMP1-14）およびAffymetrix Ebioscience（J105、J116、MIH4）から市販されている。

【0333】

抗CTLA4抗体は、メラノーマ、前立腺がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌の処置のための臨床試験において使用されている（RobertおよびGhiringhelli、2009年、Oncologist 14巻：848～61頁；Ottら、2013年、Clin Cancer Res 19巻：5300頁；Weber、2007年、Oncologist 12巻：864～72頁；Wadaら、2013年、J Transl Med 11巻：89頁）。例示的な抗CTLA4抗体としては、イピリムマブ（Bristol-Myers Squibb）およびトレメリムマブ（Pfizer）が挙げられる。抗PD1抗体は、例えば、ABCAM（AB134090）、Sino Biological Inc.（11159-H03H、11159-H08H）、およびThermo Scientific Pierce（PA5-29572、PA5-23967、PA5-26465、MA1-12205、MA1-35914）から市販されている。イピリムマブは、転移性メラノーマの処置について最近FDA認可を受けた（Wadaら、2013年、J Transl Med 11巻：89頁）。

【0334】

CTLA4、PD1およびPD-L1に対するチェックポイント阻害剤が最も臨床的に進んでいるが、他の潜在的なチェックポイント抗原が公知であり、LAG3、B7-H3、B7-H4およびTIM3などの、対象となるActRIIアンタゴニストと組み合わせた治療的阻害剤の標的として使用することができる（Pardoll、2012年、Nature Reviews Cancer 12巻：252～264頁）。腫瘍および／または病原体に対する免疫応答を刺激するこれらの薬剤および他の公知の薬剤を、ActRIIaアンタゴニストと組み合わせて、単独で、またはがん療法の改善のために、インターフェロナーアルファなどのインターフェロン、および／または抗体-薬物コンジュゲートとさらに組み合わせて使用することができる。組み合わせて使用することができる他の公知の共刺激経路モジュレーターは、アガトリモッド、ベラタセプト、ブリナツモマブ、CD40リガンド、抗B7-1抗体、抗B7-2抗体、抗B7-H4抗体、AG4263、エリトラン、抗OX40抗体、ISF-154、およびSGN-70；B7-1、B7-2、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD48、LFA-3、CD30リガンド、CD40リガンド、熱安定抗原、B7h、OX40リガンド、LIGHT、CD70およびCD24を含むがこれらに限定されない。

【0335】

治療剤は、光活性剤または色素を含んでもよい。蛍光色素、および他の色原体などの蛍光組成物、または可視光線に対して感受性のポルフィリンなどの色素が、病変に好適な光を向けることによって病変を検出し、処置するために使用されている。療法において、これは、光線照射、光線療法、または光線力学的療法と呼ばれている。Joniら（編）、PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Libreria Proget to 1985年) ; van den Bergh、Chem. Britain (1986年)、22巻：430頁を参照されたい。さらに、モノクローナル抗体を、光線療法を達成するために、光活性化色素と結合させた。Mewら、J. Immunol. (1983年)、130巻：1473頁；同著者、Cancer Res. (1985年)、45巻：4380頁；Oseroffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986年)、83巻：8744頁；同著者、Photochem. Photobiol. (1987頁)、46巻：83頁；Hasanら、Prog. Clin. Biol. Res. (1989年)、288巻：471頁；Tatsutaら、Lasers Surg. Med. (1989年)、9巻：422頁；Pelegrinら、Cancer (1991年)、67巻：2529頁を参照されたい。

【0336】

他の有用な治療剤は、好ましくは、bcl-2またはp53などの、がん遺伝子およびがん遺伝子産物に対するオリゴヌクレオチド、特に、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでもよい。好ましい形態の治療的オリゴヌクレオチドは、siRNAである。当業者であれば、任意のsiRNAまたは干渉RNA種を、標的組織への送達のために抗体またはそのフラグメントに結合させることができることを認識できる。様々な標的に対する多くのsiRNA種が当該分野で公知であり、任意のそのような公知のsiRNAを、特許請求された方法および組成物において使用することができる。

【0337】

潜在的に有用な公知のsiRNA種としては、IKK-ガンマ（米国特許第7,022,828号）；VEGF、Flt-1およびFlk-1/KDR（米国特許第7,148,342号）；Bcl2およびEGFR（米国特許第7,541,453号）；CDC20（米国特許第7,550,572号）；トランスダクチン（ベータ）様3（米国特許第7,576,196号）；KRAS（米国特許第7,576,197号）；炭酸脱水酵素I型（米国特許第7,579,457号）；補体成分3（米国特許第7,582,746号）；インターロイキン-1受容体関連キナーゼ4（IRAK4）（米国特許第7,592,443号）；スルビピン（米国特許第7,608,7070号）；スーパーオキシドジスムターゼ1（米国特許第7,632,938号）；METプロトオンコジーン（米国特許第7,632,939号）；アミロイドベータ前駆体タンパク質（APP）（米国特許第7,635,771号）；IGF-1R（米国特許第7,638,621号）；ICAM1（米国特許第7,642,349号）；補体因子B（米国特許第7,696,344号）；p53（米国特許第7,781,575号）、およびアポリポタンパク質B（米国特許第7,795,421号）に特異的なものが挙げられ、それぞれの参照された特許の実施例のセクションは参照により本明細書に組み込まれる。

【0338】

さらなるsiRNA種は、特に、Sigma-Aldrich (St Louis、Mo.)、Invitrogen (Carlsbad、Calif.)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz、Calif.)、Ambion (Austin、Tex.)、Dharmacon (Thermo Scientific、Lafayette、Colo.)、Promega (Madison、Wis.)、Mirus Bio (Madison、Wis.) およびQiagen (Valencia、Calif.) などの公知の商業的供給源から入手可能である。siRNA種の他の公共的に入手可能な供給源としては、Stockholm Bioinformatics CentreのsiRNAdbデータベース、MIT/ICBP siRNAデータベース、Broad InstituteのRNAi Consortium shRNA Library、およびNCBIのProbeデータベースが挙げられる。例えば、NCBI Probeデータベース中に30,852のsiRNA種がある。当業者であれば、

任意の目的の遺伝子について、*siRNA*種が既に設計されているか、または公共的に利用可能なソフトウェアツールを使用して容易に設計することができることを認識できる。任意のそのような*siRNA*種を、対象となるDNL・TM・複合体を使用して送達することができる。

【0339】

ActRIIアンタゴニスト免疫療法は、ワクチン接種プロトコルと組み合わせた場合に、より有効であり得る。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験戦略が考案されている (Rosenberg, S., 2000年、Development of Cancer Vaccines、ASCO Educational Book Spring: 60~62頁; Logothetis, C., 2000年、ASCO Educational Book Spring: 300~302頁; Khayat, D. 2000年、ASCO Educational Book Spring: 414~428頁; Foon, K. 2000年、ASCO Educational Book Spring: 730~738頁を参照されたい; また、DeVita, V.ら (編)、1997年、Cancer: Principles and Practice of Oncology、第5版中のRestifo, N.およびSznol, M., Cancer Vaccines、第61章、3023~3043頁も参照されたい)。これらの戦略の1つでは、ワクチンは、自己または同種異系腫瘍細胞を使用して調製される。これらの細胞性ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質導入された場合、有効性が増加することが示されている (Dranoffら (1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90巻: 3539~43頁)。したがって、一部の実施形態では、1つまたは複数のActRIIアンタゴニストを、がん性細胞、精製された腫瘍抗原 (組換えタンパク質、ペプチド、および炭水化物分子を含む)、細胞、および免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子をトランスフェクトされた細胞などの、免疫原性薬剤と組み合わせることができる (Heら (2004年) J. Immunol. 173巻: 4919~28頁)。使用することができる腫瘍ワクチンの非限定例としては、gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1および/もしくはチロシナーゼのペプチドなどのメラノーマ抗原のペプチド、またはサイトカインGM-CSFを発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞が挙げられる。

【0340】

様々な腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンの研究は、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義をもたらした (Rosenberg, S. A (1999年) Immunity 10巻: 281~7頁)。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍中で、および腫瘍が生じた細胞中で発現される分化抗原、例えば、メラノサイト抗原gp100、MAGE抗原、およびTrp-2である。より重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主に見出される腫瘍特異的T細胞の標的であると示すことができる。PDL1遮断剤を、腫瘍中で発現される組換えタンパク質および/またはペプチドの収集物と一緒に使用して、これらのタンパク質に対する免疫応答を生成させることができる。これらのタンパク質は通常、自己抗原として免疫系によって見られ、したがって、それらに対して寛容である。腫瘍抗原はまた、染色体のテロメアの合成にとって必要であり、85%を超えるヒトがんにおいて、および限られた数の体細胞組織においてのみ発現される、タンパク質テロメラーゼを含んでもよい (Kim, Nら (1994年) Science 266巻: 2011~2013頁)。これらの体細胞組織を、様々な手段によって免疫攻撃から保護することができる。タンパク質配列を変化させる、もしくは2つの非関連配列間の融合タンパク質 (例えば、Philadelphia染色体中の**ber-a bl**) を作出する体細胞変異、またはB細胞腫瘍に由来するイディオタイプのため、腫瘍抗原はまた、がん細胞中で発現される「新抗原」であってもよい。

【0341】

他の腫瘍ワクチンは、ヒトパピローマウイルス (HPV)、肝炎ウイルス (HBVおよびHCV) ならびにカポジ肉腫ヘルペスウイルス (KHSV) などのヒトがんに関連するウイルスに由来するタンパク質を含んでもよい。ActRIIアンタゴニスト療法と一緒に使用することができる別の形態の腫瘍特異的抗原は、腫瘍組織自体から単離される精製熱ショックタンパク質 (HSP) である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞に由

10

20

30

40

50

来するタンパク質のフラグメントを含有し、これらのH S Pは腫瘍免疫を惹起するための抗原提示細胞への送達において非常に有効である (Suot, RおよびSrivastava, P (1995年) Science 269巻: 1585~1588頁; Tamura, Y.ら (1997年) Science 278巻: 117~120頁)。

【0342】

樹状細胞 (DC) は、抗原特異的応答をプライミングするために使用することができる強力な抗原提示細胞である。DCをエクスピボで産生させ、それに、様々なタンパク質およびペプチド抗原ならびに腫瘍細胞抽出物をロードすることができる (Nestle, F.ら (1998年) Nature Medicine 4巻: 328~332頁)。同様に遺伝的手段によってDCを形質導入して、これらの腫瘍抗原を発現させることもできる。また、免疫化のために、DCを腫瘍細胞に直接的に融合させた (Kugler, A.ら (2000年) Nature Medicine 6巻: 332~336頁)。ワクチン接種の方法として、DCの免疫化を、ActRIIアンタゴニストと有効に組み合わせて、より強力な抗腫瘍応答を活性化することができる。

【0343】

本開示の他の方法は、特定の毒素または病原体に曝露された患者を処置するために使用される。したがって、本開示の別の態様は、対象における感染性疾患 (例えば、ウイルス、細菌または寄生虫感染) を処置または防止するための方法であって、感染性疾患を処置または防止することを必要とする対象に、治療有効量の1つまたは複数のActRIIアンタゴニストを投与することを含み、任意選択で、感染性疾患を処置するための1つもしくは複数の追加的な支持療法および/または活性薬剤を投与することをさらに含む、方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、例えば、感染性疾患に罹患した対象における内因性免疫応答を強化することによって、対象における感染性疾患を処置するための方法であって、対象に、治療有効量の1つまたは複数のActRIIアンタゴニストを投与することを含み、任意選択で、感染性疾患を処置するための1つもしくは複数の追加的な支持療法および/または活性薬剤を投与することをさらに含む、方法を提供する。

【0344】

感染性ウイルスの例は、レトロウイルス科; ピコルナウイルス科 (例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス); カリシウイルス科 (胃腸炎を引き起こす株など); トガウイルス科 (例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス); フラビウイルス科 (例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス); コロナウイルス科 (例えば、コロナウイルス); ラブドウイルス科 (例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス); フィロウイルス科 (例えば、エボラウイルス); パラミクソウイルス科 (例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス); オルトミクソウイルス科 (例えば、インフルエンザウイルス); ブンガウイルス科 (例えば、ハンタウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス); アリーナウイルス科 (出血熱ウイルス); レオウイルス科 (例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス); ビルナウイルス科; ヘパドナウイルス科 (B型肝炎ウイルス); パルボウイルス科 (パルボウイルス); パポバウイルス科 (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス); アデノウイルス科 (多くのアデノウイルス); ヘルペスウイルス科 (単純ヘルペスウイルス (HSV) 1およびHSV-2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス); ポックスウイルス科 (天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス); およびイリドウイルス科 (アフリカ豚コレラウイルスなど); ならびに未分類のウイルス (例えば、海綿状脳症の病原因子、デルタ肝炎の因子 (B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)、非A型非B型肝炎の因子 (クラス1=内部伝染; クラス2=非経口伝染 (すなわち、C型肝炎); ノーウォークおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス) を含むがこれらに限定されない。本明細書に記載のActRIIアンタゴニストおよび方法は、これらのウイルス因子による感染の処置における使用について企図される。したがって、一部の実施形態では、本開示は、例

例えば、AIDS、AIDS関連合併症、水痘、風邪、ウイルス性気管支炎、サイトメガロウイルス感染、コロラドダニ熱、デング熱、エボラ出血熱、流行性耳下腺炎、「手足口」病、肝炎、単純ヘルペス、带状疱疹、HPV、インフルエンザ（インフル）、ラッサ熱、麻疹、マールブルグ出血熱、感染性単核球症、おたふく風邪、ポリオウイルス感染症、進行性多巣性白質脳症、狂犬病、風疹、SARS、天然痘、ウイルス性脳炎、ウイルス性胃腸炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性肺炎、西ナイル熱、および黄熱病を含むウイルス感染を処置または防止するために、任意選択で、1つもしくは複数の支持療法および／または活性薬剤と組み合わせて、1つまたは複数のActRIIアンタゴニストを使用する方法を提供する。

【0345】

感染性細菌の例は、*Helicobacter pylori*s、*Borrelia burgdorferi*、*Legionella pneumophila*、*Mycobacteria* sp (*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii*、*M. goodii*など)、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Listeria monocytogenes*、*Streptococcus pyogenes* (A群*Streptococcus*)、*Streptococcus agalactiae* (B群*Streptococcus*)、*Streptococcus* (ピリダス群)、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus* (嫌気性種)、*Streptococcus pneumoniae*、病原性*Campylobacter* sp.、*Enterococcus* sp.、*Haemophilus influenzae*、*Bacillus anthracis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Corynebacterium* sp.、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasteurella multocida*、*Bacteroides* sp.、*Fusobacterium nucleatum*、*Streptobacillus moniliformis*、*Treponema pallidum*、*Treponema pertenue*、*Leptospira*、および*Actinomyces israelii*を含むがこれらに限定されない。本明細書に記載のActRII組成物および方法は、これらの細菌性因子による感染の処置における使用について企図される。したがって、一部の実施形態では、本開示は、例えば、炭疽、細菌性成人呼吸窮迫症候群、細菌性髄膜炎、ブルセラ症、カンピロバクター感染症、猫ひっかき病、気管支炎、コレラ、ジフテリア、発疹チフス、淋病、レジオネラ症、らい病（ハンセン病）、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、類鼻疽、MRSA感染、マイコバクテリア感染、髄膜炎、ノカルジア症、腎炎、糸球体腎炎、歯周病、ペルツシス（百日咳）、ペスト、肺炎球菌性肺炎、オウム病、Q熱、ロッキー山発疹熱（RMSF）、サルモネラ症、猩紅熱、細菌性赤痢、梅毒、敗血性ショック、出血性ショック、敗血症候群、破傷風、トラコーマ、結核、ツラレミア、腸チフスを含む細菌感染を処置または防止するために、任意選択で、1つもしくは複数の支持療法および／または活性薬剤と組み合わせて、1つまたは複数のActRIIアンタゴニストを使用する方法を提供する。

【0346】

感染性真菌の例は、*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Coccidioides immitis*、*Blastomyces dermatitidis*、および*Candida albicans*を含むがこれらに限定されない。本明細書に記載のActRIIアンタゴニストおよび方法は、これらの真菌因子による感染の処置における使用について企図される。したがって、一部の実施形態では、本開示は、例えば、アスペルギルス症；鵝口瘡、クリプトコッカス

10

20

30

40

50

症、ブラストミセス症、コクシジオイデス症、およびヒストプラスマ症を含む真菌感染を処置または防止するために、任意選択で、1つもしくは複数の支持療法および／または活性薬剤と組み合わせて、1つまたは複数のA c t R I Iアンタゴニストを使用する方法を提供する。

【0347】

感染性寄生虫の例は、*Entamoeba histolytica*、*Balantidium coli*、*Naegleria fowleri*、*Acanthamoeba* sp.、*Giardia lamblia*、*Cryptosporidium* sp.、*Pneumocystis carinii*、*Plasmodium vivax*、*Babesia microti*、*Trypanosoma brucei*、*Trypanosoma cruzi*、*Leishmania donovani*、*Toxoplasma gondii*、*Nippostrongylus brasiliensis*を含むがこれらに限定されない。本明細書に記載のA c t R I Iアンタゴニストおよび方法は、これらの因子による感染の処置における使用について企図される。したがって、一部の実施形態では、本開示は、例えば、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ症、回虫症、バベシア症、シャーガス病、肝吸虫症、クリプトスポリジウム症、神経囊虫症、裂頭条虫症、メジナ虫症、エキノコックス症、蟯虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、自由生息アメーバ感染、ランブル鞭毛虫症、顎口虫症、膜様条虫症、イソスポーラ症、カラアザール、レーシュマニア症、マラリア、メタゴニムス症、ハエウジ症、オンコセルカ症、シラミ寄生症、蟯虫感染、疥癬、住血吸虫症、条虫症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、旋毛虫病（*Trichinellosis*）、旋毛虫病（*Trichinosis*）、鞭虫症、およびトリパノソーマ症を含む真菌感染を処置または防止するために、任意選択で、1つもしくは複数の支持療法および／または活性薬剤と組み合わせて、1つまたは複数のA c t R I Iアンタゴニストを使用する方法を提供する。

【0348】

一部の実施形態では、本開示は、感染性疾患を処置することを必要とする患者に、有効量のA c t R I Iアンタゴニストを、単独で、または感染性疾患（病原体）を処置するための第2の治療剤、例えば、抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、または抗寄生虫薬と組み合わせて投与することによって、感染性疾患を処置する方法を提供する。

【0349】

一般に、抗生物質とは、細菌の増殖を阻害する、または細菌を殺傷する任意の化合物を指す。抗生物質の有用な非限定例としては、リンコサミド（クリンドマイシン）；クロラムフェニコール；テトラサイクリン（テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリンなど）；アミノグリコシド（ゲンタマイシン、トブラマイシン、ネチルマイシン、アミカシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ネオマイシンなど）；ベータラクタム（ペニシリン、セファロスポリン、イミペネム、アズトレオナムなど）；バンコマイシン；バシトラシン；マクロライド（エリスロマイシン）、アンホテリシン；スルホンアミド（スルファニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルフィソキサゾール、スルファシチン、スルファドキシム、マフェニド、p-アミノ安息香酸、トリメトプリム-スルファメトキサゾールなど）；メテナミン；ニトロフラントイン；フェナゾピリジン；トリメトプリム；リファンピシン；メトロニダゾール；セファゾリン；リンコマイシン；スペクチノマイシン；ムピロシン；キノロン（ナリジクス酸、シノキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ペルフロキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、フレロキサシン、レボフロキサシンなど）；ノボビオシン；ポリミキシン；グラミシジン；および抗緑膿菌剤（カルベニシリン、カルベニシリンインダニル、チカルシリン、アズロシリン、メズロシリン、ピペラシリンなど）またはその任意の塩もしくは改変体が挙げられる。Physician's Desk Reference、第59版（2005年）、Thomson P D R、Montvale N.J.；Gennaroら編、Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第20版（2000年）、Lippincott Williams and Wilkins、Baltim

ore Md.; Braunwaldら編、Harrison's Principles of Internal Medicine、第15版(2001年)、McGraw Hill、NY; Berkowら編、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy(1992年)、Merck Research Laboratories、Rahway N.J.も参照されたい。使用される抗生物質は、細菌感染の型に依存するであろう。

【0350】

一般に、抗真菌剤とは、真菌の増殖を阻害する、または真菌を殺傷する任意の化合物を指す。非限定例としては、イミダゾール(グリセオフルビン、ミコナゾール、テルビナフィン、フルコナゾール、ケトコナゾール、ボリコナゾール、およびイトラコニゾールなど); ポリエン(アンホテリシンBおよびナスタチンなど); フルシトシン; およびカンジジジンまたはその任意の塩もしくは改変体が挙げられる。Physician's Desk Reference、第59版(2005年)、Thomson P D R、Montvale N.J.; Gennaroら編、Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第20版(2000年)、Lippincott Williams and Wilkins、Baltimore Md.; Braunwaldら編、Harrison's Principles of Internal Medicine、第15版(2001年)、McGraw Hill、NY; Berkowら編、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy(1992年)、Merck Research Laboratories、Rahway N.J.も参照されたい。使用される抗真菌剤は、真菌感染の型に依存するであろう。

10

【0351】

抗ウイルス薬とは、ウイルスの作用を阻害する任意の化合物を指す。非限定例としては、インターフェロナルファ、ベータもしくはガンマ、ジダノシン、ラミブジン、ザナミビル、ロパニビル、ネルフィナビル、エファビレンズ、インジナビル、バラシクロビル、ジドブジン、アマンタジン、リマンチジン、リバビリン、ガンシクロビル、ホスカルネット、およびアシクロビルまたはその任意の塩もしくは改変体が挙げられる。Physician's Desk Reference、第59版(2005年)、Thomson P D R、Montvale N.J.; Gennaroら編、Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第20版(2000年)、Lippincott Williams and Wilkins、Baltimore Md.; Braunwaldら編、Harrison's Principles of Internal Medicine、第15版(2001年)、McGraw Hill、NY; Berkowら編、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy(1992年)、Merck Research Laboratories、Rahway N.J.も参照されたい。使用される抗ウイルス薬は、ウイルス感染の型に依存するであろう。

20

30

【0352】

抗寄生虫剤とは、寄生虫の増殖を阻害する、または寄生虫を殺傷する任意の化合物を指す。抗寄生虫剤の有用な非限定例としては、クロロキン、メフロキン、キニン、プリマキン、アトバクオン、スルファソキシム、およびピリメタミンまたはその任意の塩もしくは改変体が挙げられる。Physician's Desk Reference、第59版(2005年)、Thomson P D R、Montvale N.J.; Gennaroら編、Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第20版(2000年)、Lippincott Williams and Wilkins、Baltimore Md.; Braunwaldら編、Harrison's Principles of Internal Medicine、第15版(2001年)、McGraw Hill、NY; Berkowら編、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy(1992年)、Merck Research Laboratories、Rahway N.J.も参照されたい。使用される抗寄生虫剤は、寄生虫感染の型に依存するであろう。

40

【0353】

上記で論じられた腫瘍へのその適用と同様、本明細書に記載のActRIIアンタゴニストを、単独で、またはアジュバントとして、ワクチンと組み合わせて使用して、病原体、毒素、および自己抗原に対する免疫応答を刺激することができる。これらの手法を、サイトカイン処置(例えば、インターフェロン、GM-CSF、G-CSFまたはIL-2の投与)などの他の形態の免疫療法と組み合わせることができる。この治療手法が特に有用であり得る病原体の例としては、現在有効なワクチンがない病原体、または従来のワクチンが完全に有効ではない病原体が挙げられる。これらのものは、HIV、肝炎(A、B、

50

およびC)、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、レーシュマニア、*Staphylococcus aureus*、および*Pseudomonas Aeruginosa*を含むがこれらに限定されない。

【0354】

一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、乳がんを有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、多発性骨髄腫を有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、乳がんを有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、骨髄異形成症候群を有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、FSH分泌性下垂体部腫瘍を有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、前立腺がんを有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、正常で健康な患者と比較して、免疫活性が望ましくなく上昇した（例えば、T細胞活性が増加した）患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、自己免疫障害、または自己免疫関連障害を有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、T細胞活性の望ましくない上昇によって媒介される自己免疫障害、または自己免疫関連障害を有する患者には投与されない。例えば、一部の実施形態では、本開示のActRIIアンタゴニストは、急性播種性脳脊髄炎、急性壊死性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗GBM／抗TBM腎炎、抗リン脂質症候群（APS）、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性肝炎、自己免疫性脂質異常症、自己免疫性免疫不全、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性脾炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性蕁麻疹、軸索およびニューロン神経障害、バロー病、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、カッスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、慢性再発性多巣性骨髄炎、チャージ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、コクサッキー心筋炎、CREST病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性ニューロパシー、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性食道炎、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エバンス症候群、線維化性肺肺炎、巨細胞性動脈炎、巨細胞性心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管性肉芽腫症、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、IgA腎症、IgG4関連硬化症、免疫調節性リボタンパク質、封入体筋炎、間質性膀胱炎、若年性関節炎、若年性筋炎、川崎症候群、ランバート・イートン症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質結膜炎、線状IgA疾患（LAD）、ループス（SLE）、ライム病（慢性）、メニエール病、顕微鏡的多発性血管炎、混合性結合組織疾患（MCTD）、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、視神経脊髄炎（デビック病）、眼部瘢痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ、PANDAS（連鎖球菌と関連する小児自己免疫性神経精神疾患）、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パリー・ロンベルグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、扁平部炎（末梢ブドウ膜炎）、天疱瘡、静脈周囲脳炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、I型、II型およびIII型多腺性自己免疫症候群、リウマチ性多発筋痛、多発筋炎、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、壊疽性膿皮症、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発性軟骨炎、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン初稿群、精子および精巣の自己免疫、全身硬直症候群、スザック症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、トローザ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患（UCTD）、小水

10

20

30

40

50

疱疹性皮膚病、ウェゲナー肉芽腫症のうちの1つまたは複数を有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、組織または臓器移植を受けている患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、組織または臓器移植を受けた患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、移植片対宿主疾患を有する患者には投与されない。一部の実施形態では、本開示のA c t R I I アンタゴニストは、1つまたは複数の免疫抑制剤および／または療法で処置される患者には投与されない。

【0355】

一部の実施形態では、A c t R I I アンタゴニストを、単独で、またはがんを処置するための支持療法もしくは追加的な活性薬剤（例えば、P D 1－P D L 1 アンタゴニストなどの免疫療法剤）と組み合わせて使用して、がん患者の生存を改善する（死亡のリスクを低減する）ことができる。本明細書で使用される場合、がん患者の生存の改善とは、一定期間に、または一定期間を超えて、対象集団によって経験される致死的ながん関連事象の数を維持すること、または減少させることを指す。第1の群（処置群）が本発明の方法によって処置され、第2の群（プラセボ群）が、本発明の方法による処置の代替として、またはその代わりに、プラセボ（すなわち、偽薬）を使用することによって処置される、2群の対象の間で、一定期間を超える、またはその間の致死的ながん関連事象の発生率を比較することによって、がん患者の生存の改善を評価または測定することができる。処置群の致死的ながん関連事象の数が、プラセボ群の致死的ながん関連事象の数よりも少ない場合、がん患者の生存の改善があった、またはかつてあったとの決定が為される。あるいは、第1の期間に関する致死的ながん関連事象のベースライン数を決定した後、第2の、より後の期間での対象集団に関する致死的ながん関連事象の数を測定することにより、致死的心血管事象の発生率の減少を評価または決定することができる。第2の、より後の期間での対象集団に関する致死的ながん関連事象の数が、第1の期間での対象集団に関する致死的ながん関連事象の数と同じであるか、またはそれよりも少ない場合、前記対象集団に関するがん患者の生存の改善があったとの決定が為される。

【0356】

ある特定の実施形態では、本開示は、患者における1つまたは複数の血液パラメータを測定することによって、本開示の1つまたは複数のA c t R I I アンタゴニストで処置された、または処置される候補である患者を管理するための方法を提供する。血液パラメータを使用して、本開示のアンタゴニストで処置される候補である患者のための適切な用量を評価する、処置中の血液パラメータをモニタリングする、本開示の1つもしくは複数のアンタゴニストによる処置中に用量を調整すべきかどうかを評価する、および／または本開示の1つもしくは複数のアンタゴニストの適切な維持用量を評価することができる。1つまたは複数の血液パラメータが正常レベルから外れている場合、1つまたは複数のA c t R I I アンタゴニストの投与を減少させる、遅延させる、または終結させることができる。

【0357】

本明細書に提供される方法に従って測定され得る血液パラメータとしては、当該分野で認識される方法を使用した、例えば、赤血球レベル、血圧、鉄貯蔵、および赤血球レベルの増加と相関する体液中に認められる他の因子が挙げられる。そのようなパラメータを、患者由来血液試料を使用して決定することができる。赤血球レベル、ヘモグロビンレベル、および／またはヘマトクリットレベルの増加は、血圧の増加を引き起こし得る。

【0358】

一実施形態では、1つまたは複数の血液パラメータが、1つまたは複数のA c t R I I アンタゴニストで処置される候補である患者における正常範囲から外れているか、または正常高値にある場合、1つまたは複数のアンタゴニストの投与の開始を、血液パラメータが、自然に、または治療的介入によって、正常レベルまたは許容し得るレベルに戻るまで遅らせることができる。例えば、候補患者が高血圧または前高血圧である場合、その患者を、患者の血圧を低下させるための血圧低下剤で処置することができる。例えば、利尿剤、アドレナリン阻害剤（アルファ遮断剤およびベータ遮断剤を含む）、血管拡張剤、カルシ

ウムチャンネル遮断剤、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、またはアンギオテンシンⅡ受容体遮断剤を含む、個々の患者の状態にとって適切な任意の血圧低下剤を使用することができる。あるいは、食事および運動のレジメンを使用して、血圧を処置することができる。同様に、候補患者が正常より低い、または正常の低い側にある鉄貯蔵を有する場合、患者の鉄貯蔵が正常レベルまたは許容し得るレベルに戻るまで、患者を、食事および／または鉄補給剤の適切なレジメンで処置することができる。正常な赤血球レベルおよび／またはヘモグロビンレベルよりも高い患者については、そのレベルが正常レベルまたは許容し得るレベルに戻るまで、本開示の1つまたは複数のアンタゴニストの投与を遅らせることができる。

【0359】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の血液パラメータが、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニスト剤で処置される候補である患者における正常範囲から外れているか、または正常高値にある場合、投与の開始を遅らせなくてもよい。しかしながら、1つまたは複数のアンタゴニストの用量または投与頻度を、本開示の1つまたは複数のアンタゴニストの投与時に生じる血液パラメータの許容できない増加のリスクを低減させる量に設定することができる。あるいは、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストと、望ましくないレベルの血液パラメータに対処する治療剤とを組み合わせる治療レジメンを患者のために開発することができる。例えば、患者の血圧が上昇している場合、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストと、血圧低下剤との投与を含む治療レジメンを設計することができる。所望の鉄貯蔵より低い患者については、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストと、鉄補給剤とを含む治療レジメンを開発することができる。

【0360】

一実施形態では、1つまたは複数の血液パラメータのベースラインパラメータを、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストで処置される候補である患者について確立し、ベースライン値に基づいて、その患者に関する適切な投薬レジメンを確立することができる。あるいは、患者の病歴に基づく確立されたベースラインパラメータを使用して、患者に関する適切なアンタゴニスト投薬レジメンについて情報提供することができる。例えば、健康な患者が規定の正常範囲より上である確立された血圧読取り値を有する場合、本開示の1つまたは複数のアンタゴニストを用いる処置の前に、患者の血圧を、一般的な集団に関する正常と考えられる範囲に持つて行く必要はない。1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストを用いる処置の前の1つまたは複数の血液パラメータに関する患者のベースライン値を、本明細書に記載の1つまたは複数のアンタゴニストを用いる処置中の血液パラメータに対する任意の変化をモニタリングするために関連する比較値として使用することもできる。

【0361】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の血液パラメータは、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストで処置される患者において測定される。血液パラメータを使用して、処置中に患者をモニタリングし、本開示の1つもしくは複数のアンタゴニストの投薬または別の治療剤のさらなる投薬の調整または終結を可能にすることができる。例えば、1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストの投与が血圧、赤血球レベル、もしくはヘモグロビンレベルの増加、または鉄貯蔵の減少をもたらす場合、本開示の1つまたは複数のアンタゴニストの用量を、量または頻度において減少させて、1つまたは複数の血液パラメータに対する本開示の1つまたは複数のアンタゴニストの効果を低下させることができる。1つまたは複数のACEⅡアンタゴニストの投与が、患者にとって有害である1つまたは複数の血液パラメータの変化をもたらす場合、本明細書に記載の1つまたは複数のアンタゴニストの投薬を、一時的に、血液パラメータが許容し得るレベルに戻るまで、または永続的に終結させることができる。同様に、1つまたは複数の血液パラメータが、本明細書に記載の1つまたは複数のアンタゴニストの用量または投与頻度を減少させた後に許容し得る範囲内にならない場合、投薬を終結させることができる。本明細書に記載の1つまたは複数のアンタゴニストの投薬を減少させるか、または終結させる代わりに、ま

10

20

30

40

50

たはそれに加えて、例えば、血圧低下剤または鉄補給剤などの、血液パラメータの望ましくないレベルに対処するさらなる治療剤を患者に投与することができる。例えば、1つまたは複数のA c t R I Iアンタゴニストで処置される患者の血圧が上昇している場合、本開示の1つもしくは複数のアンタゴニストの投薬を、同じレベルで継続し、血圧低下剤を処置レジメンに加え、1つもしくは複数のアンタゴニスト（例えば、量および／もしくは頻度）および血圧低下剤の投与を処置レジメンに加えるか、または1つもしくは複数のアンタゴニストの投薬を終結し、患者を血圧低下剤で処置することができる。

【0362】

10. 医薬組成物

ある特定の態様では、本開示の、任意選択でP D 1－P D L 1アンタゴニストなどの1つまたは複数の追加的な活性薬剤と組み合わせたA c t R I Iアンタゴニストを、単独で、または医薬製剤の成分（治療組成物もしくは医薬組成物とも称される）として投与することができる。医薬製剤とは、その中に含有される活性成分（例えば、本開示の薬剤）の生物活性が有効であることを可能にするような形態にあり、製剤が投与される対象にとって許容されないほどに毒性的であるさらなる成分を含有しない調製物を指す。対象化合物を、ヒト医学または獣医学における使用のための任意の都合の良い方法での投与のために製剤化することができる。例えば、本開示の1つまたは複数の薬剤を、薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。薬学的に許容される担体とは、一般に、対象にとって非毒性的である、活性成分以外の、医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、緩衝剤、賦形剤、安定剤、および／または保存剤を含むがこれらに限定されない。一般に、本開示における使用のための医薬製剤は、発熱源を含まず、対象に投与される場合に生理的に許容される形態にある。任意選択で、上記の製剤中に含有されてもよい、本明細書に記載のもの以外の治療的に有用な薬剤を、本開示の方法において対象薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0363】

ある特定の実施形態では、組成物は、非経口投与される〔例えば、静脈内（I . V .）注射、動脈内注射、骨内注射、筋内注射、髄腔内注射、皮下注射、または皮内注射により〕。非経口投与に適する薬学的組成物は、本開示の1つまたは複数の作用因子を、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可能な溶液もしくは分散液へと再構成され得る無菌粉末と組み合わせて含み得る。注射可能な溶液または分散液は、抗酸化物質、緩衝剤、静菌剤、懸濁剤、増粘剤、または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を含有し得る。本開示の医薬製剤において利用され得る、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）、植物油（例えば、オリーブ油）、注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）、およびこれらの適切な混合物を含む。適正な流動性は、例えば、コーティング材料（例えば、レシチン）の使用によって、分散剤の場合には必要とされる粒子径の維持によって、および、界面活性剤の使用によって維持することができる。

【0364】

一部の実施形態では、例えば、局所投与、眼内（例えば、硝子体内）注射によるか、またはインプラントもしくはデバイスにより、化合物を眼に投与する。硝子体内注射を、例えば、扁平部を介して、縁に対して3 mm～4 mm後部に注射することができる。眼への投与のための医薬組成物を、例えば、点眼剤、点眼液、点眼懸濁剤、点眼エマルジョン、硝子体内注射剤、テノン嚢下注射剤、眼科用生分解性インプラント、および非生分解性眼科用挿入物またはデポーを含む、様々な方法で製剤化することができる。

【0365】

一部の実施形態では、本開示の治療法は、インプラントもしくはデバイスから薬学的組成物を全身投与または局所投与する工程を包含する。さらに、薬学的組成物は、カプセル化され得、または、標的組織部位（例えば、骨髄または筋肉）へと送達するための形態で注

10

20

30

40

50

射され得る。特定の実施形態では、本開示の組成物は、標的組織部位（例えば、骨髄または筋肉）に本開示の1つまたは複数の作用因子を送達し得、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、本開示の1つまたは複数の作用因子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。

【0366】

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のうちの1つまたは複数に基づいてもよい。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画定されたもの（例えば、骨または皮膚のコラーゲンが挙げられる）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が挙げられる）である。マトリクスは、上述のタイプの材料のいずれかの組み合わせ（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）を含み得る。バイオセラミクスは、組成物（例えば、カルシウム-アルミン酸-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のうちの1つまたは複数を変更するように加工され得る。

【0367】

ある特定の実施形態では、本開示の医薬組成物を、局所的に投与することができる。「局所適用」または「局所的」とは、医薬組成物と、例えば、皮膚、創傷部位、および粘膜を含む、体表面との接触を意味する。局所医薬組成物は、様々な適用形態を有してもよく、典型的には、組成物を局所的に投与する際に、組織の近くに、または組織と直接接触して配置されるように適合される、薬物含有層を含む。局所投与にとって好適な医薬組成物は、任意選択で、液体、ゲル、クリーム、ローション、軟膏、気泡、ペースト、パテ、半固体、または固体として同時に製剤化される、本開示のPD1-PDL1アンタゴニストなどの1つまたは複数の追加的な活性薬剤と組み合わせた、1つまたは複数のAcetREIアンタゴニストを含んでもよい。液体、ゲル、クリーム、ローション、軟膏、気泡、ペースト、またはパテ形態の組成物を、標的組織に組成物を拡散させる、噴霧する、塗布する、軽く叩く、またはローラーで延ばすことによって適用することができる。また、組成物を、滅菌包帯、経皮パッチ、膏薬、および包帯に含浸させることもできる。パテ、半固体または固体形態の組成物は、変形可能であってもよい。それらは弾性または非弾性（例えば、可撓性もしくは剛性）であってもよい。ある特定の態様では、組成物は、複合物の一部を形成し、同じか、または異なる組成を有する繊維、粒子、または多層を含んでもよい。

【0368】

液体形態の局所用組成物は、薬学的に許容される溶液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、および懸濁液を含み得る。有効成分に加えて、液体剤形は、当該分野において一般に使用される不活性の希釈剤であって、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および／もしくは乳化剤〔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、または1,3-ブチレングリコール、油（例えば、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油、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、ソルビタンの脂肪酸エステル、およびこれらの混合物〕を含む希釈剤を含有し得る。

【0369】

局所用のゲル、クリーム、ローション、軟膏、半固形または固形組成物は、多糖、合成ポリマーまたはタンパク質ベースのポリマーなどの1つまたは複数の増粘剤を含み得る。本発明の一実施形態では、本明細書のゲル化剤は、適切に非毒性であり、所望の粘性をもた

10

20

30

40

50

らすゲル化剤である。増粘剤として、ビニルピロリドン、メタクリルアミド、アクリルアミド、N-ビニルイミダゾール、カルボキシビニル、ビニルエステル、ビニルエーテル、シリコーン、ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール、ビニルアルコール、アクリル酸ナトリウム、アクリレート、マレイン酸、NN-ジメチルアクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド、アクリルアミド、アクリロイルモルホリン、Pluronic、コラーゲン、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリビニレン、ポリビニルシリケート、糖（例えば、スクロース、グルコース、グルコサミン、ガラクトース、トレハロース、マンノース、またはラクトース）で置換されたポリアクリレート、アシルアミドプロパンスルホン酸、テトラメトキシオルトシリケート、メチルトリメトキシオルトシリケート、テトラアルコキシオルトシリケート、トリアルコキシオルトシリケート、グリコール、プロピレングリコール、グリセリン、多糖、アルギネート、デキストラン、シクロデキストリン、セルロース、修飾セルロース、酸化セルロース、キトサン、キチン、グアーガム、カラギーナン、ヒアルロン酸、イヌリン、デンプン、修飾デンプン、アガロース、メチルセルロース、植物ガム、ヒアルロン（hyaluronans）、ハイドロゲル、ゼラチン、グリコサミノグリカン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ペクチン、低メトキシペクチン、架橋デキストラン、デンプン-アクリロニトリルグラフトコポリマー、ポリアクリル酸ナトリウムデンプン、ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ポリビニレン、ポリエチルビニルエーテル、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリアルカノエート、ポリ乳酸、ポリラクテート、ポリ（3-ヒドロキシブチレート）、スルホン化ハイドロゲル、AMPS（2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸）、SEM（スルホエチルメタクリレート）、SPM（スルホプロピルメタクリレート）、SPA（スルホプロピルアクリレート）、N,N-ジメチル-N-メタクリロキシエチル-N-（3-スルホプロピル）アンモニウムベタイン、メタクリル酸アミドプロピル-ジメチルアンモニウムスルホベタイン、SPI（イタコン酸-ビス（1-プロピルスルホン酸（sulfonizacid）-3）エステルニカリウム塩）、イタコン酸、AMBC（3-アクリルアミド-3-メチルブタン酸）、ベーターカルボキシエチルアクリレート（アクリル酸二量体）、およびマレイン酸無水物-メチルビニルエーテルポリマー、これらの誘導体、これらの塩、これらの酸、ならびにこれらの組合せによる、ポリマー、コポリマー、および単量体が挙げられ得る。ある特定の実施形態では、本開示の薬学的組成物は、例えば、カプセル、カシェ、丸剤、錠剤、ロゼンジ（スクロースおよびアカシアまたはトラガントなどの矯味矯臭基材を使用する）、散剤、顆粒剤、水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液、水中油もしくは油中水の液体エマルジョン、またはエリキシルもしくはシロップ、または香錠（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）、かつ／またはマウスウォッシュの形態で経口投与することもでき、各々が、所定量の、本開示の化合物と、任意選択で、1つまたは複数の他の活性成分とを含有する。本開示の化合物と、任意選択で、1つまたは複数の他の活性成分とはまた、ボールス、舐剤、またはペーストとしても投与することができる。

【0370】

経口投与のための固体投薬形態（例えば、カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤および顆粒剤）において、本開示の1または複数の化合物は、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、リン酸ニカルシウム、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ケイ酸）、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、スクロースおよびアカシア）、湿潤剤（例えば、グリセロール）、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、ケイ酸塩、および炭酸ナトリウム）、溶液抑制因子（solution retarding agent）（例えば、パラフィン）、吸収加速剤（例えば、四級アンモニウム化合物）、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）、

吸着剤（例えば、カオリンおよびベントナイトクレイ）、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）、着色剤およびこれらの混合物を含む）と共に混合され得る。カプセル、錠剤、および丸剤の場合、医薬製剤（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、例えば、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を含む、1つまたは複数の賦形剤を使用して、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。

【0371】

薬学的組成物の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、水または他の溶媒が挙げられる）、可溶化剤および／または乳化剤〔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（例えば、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、ソルビタンの脂肪酸エステル、およびこれらの混合物〕を含み得る。不活性な希釈剤に加え、経口用組成物はまた、例えば、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、保存剤およびこれらの組み合わせを含む佐剤を含み得る。

【0372】

懸濁液は、活性化化合物に加えて、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、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、トラガント、およびこれらの組み合わせを含む懸濁剤を含有し得る。

【0373】

微生物の作用および／または増殖の防止は、例えば、パラベン、クロロブタノール、およびソルビン酸フェノールを含む、種々の抗細菌剤および抗真菌剤を組み入れることにより確保することができる。

【0374】

ある特定の実施形態では、例えば、糖、または塩化ナトリウムを含む等張化剤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、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含む、吸収を遅延させる作用因子を組み入れることにより、もたらすことができる。

【0375】

投薬レジメンは、本開示の1つまたは複数の作用因子の作用を修飾する種々の要因を考慮して主治医によって決定されることが理解される。赤血球の形成を促進するACEIアンタゴニストの場合では、種々の要因として、患者の赤血球数、ヘモグロビンレベル、所望の標的赤血球数、患者の年齢、患者の性別、および患者の食餌、赤血球レベルの低下に寄与し得る任意の疾患の重症度、投与時間、ならびに他の臨床的要因が挙げられ得るがこれらに限定されない。他の公知の活性の作用因子の、最終組成物への添加もまた、投与量に影響を及ぼし得る。進行は、赤血球レベル、ヘモグロビンレベル、網状赤血球レベル、および造血プロセスの他の指標のうちの1つまたは複数の定期的な評価によりモニタリングすることができる。

【0376】

特定の実施形態では、本開示はまた、本開示の1つまたは複数の作用因子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のうち1つまたは複数の有する細胞または組織中に作用因子配列を導入することによってその治療作用を達成する。作用因子配列の送達は、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。本開示の1つまたは複数の作用因子配列の好ましい治療的送達は、標的化されたりポソームの使用である。

【0377】

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、RNAウイルス（例えば、レトロウイルス）が挙げられる。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り得る。単一の外来遺伝子が挿入され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、本開示の1つまたは複数の作用因子を含むレトロウイルスベクターの標的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。

【0378】

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。

【0379】

本開示の1つまたは複数の作用因子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、例えば、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。特定の実施形態において、本開示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 [Fraleyら（1981年）、Trends Biochem. Sci.、6巻：77頁]。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 [Manninoら（1988年）、Biotechniques、6巻：682頁、1988]。

【0380】

リポソームの組成は通常、リン脂質の組み合わせであり、ステロイド（例えば、コレステロール）を含み得る。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。また、他のリン脂質または他の脂質であって、例えば、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）、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を含むリン脂質または脂質も使用することができる。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。

【実施例】

【0381】

本発明は、ここで、一般的に記載されるが、単に特定の実施形態および本発明の実施形態を例示する目的のために含められ、本発明を限定することは意図されない以下の実施例を参照するとより容易に理解される。

【0382】

（実施例1）

ActRIIa-Fc 融合タンパク質

出願人は、間にリンカーを有する、ヒトまたはマウスFcドメインに融合されたヒトActRIIaの細胞外ドメインを有する可溶性ActRIIA融合タンパク質を構築した。この構築物は、それぞれ、ActRIIA-hFcおよびActRIIA-mFcと称される。

【0383】

ActRIIA-hFcは、CHO細胞系から精製されたものとして以下に示される（配列番号50）：

【化40】

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEI
VKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNP
VTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK

10

【0384】

ActRIIA-hFcおよびActRIIA-mFcタンパク質を、CHO細胞系中で発現させた。3つの異なるリーダー配列を考慮した：

20

(i) ミツバチメリチン (HBML) : MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号51)

(ii) 組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA) : MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (配列番号52)

(iii) ネイティブ : MGAAAKLAFAVFLISCSGA (配列番号53)。

【0385】

選択された形態は、TPAリーダーを使用し、以下のプロセッシングされていないアミノ酸配列を有する。

【化41】

30

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 54)

40

【0386】

このポリペプチドは、以下の核酸配列によってコードされる。

【化 4 2】

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGC
AGTCTTCGTTTCGCCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGT
CTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACC
GTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATT
TCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTA
TGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGC
TGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCA
CACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCA
CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCC AAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG

10

【化 4 3】

TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (配列番号 55)

20

30

【0387】

A c t R I I A - h F c と A c t R I I A - m F c は両方とも、組換え発現に顕著に適していた。図5に示されるように、タンパク質は、単一の、明確に規定されたピークのタンパク質として精製された。N末端配列決定により、-I L G R S E T Q E (配列番号56)の単一配列が示された。例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程によって、精製を達成することができた。ウイルス濾過および緩衝液交換によって精製を完了することができた。A c t R I I A - h F c タンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定された場合、98%を超える純度およびSDS PAGEによって決定された場合、95%を超える純度まで精製された。

40

【0388】

A c t R I I A - h F c および A c t R I I A - m F c は、リガンドに対する高いアフィニティを示した。GDF-11またはアクチビンAを、標準的なアミンカップリング手順を使用して、Biacore (商標) CM5チップ上に固定した。A c t R I I A - h F c および A c t R I I A - m F c タンパク質をシステム上にロードし、結合を測定した。

50

A c t R I I A - h F c は、 5×10^{-12} の解離定数 (K_D) でアクチビンに結合し、 9.96×10^{-9} の K_D で G D F 1 1 に結合した。図 6 を参照されたい。A c t R I I A - m F c も同様の挙動であった。

【0389】

A c t R I I A - h F c は、薬物動態試験において非常に安定であった。ラットに、 1 mg/kg 、 3 mg/kg 、または 10 mg/kg の A c t R I I A - h F c タンパク質を投与し、タンパク質の血漿レベルを、24、48、72、144 および 168 時間で測定した。別の試験において、ラットに、 1 mg/kg 、 10 mg/kg 、または 30 mg/kg で投与した。ラットでは、A c t R I I A - h F c は、11~14 日の血清半減期を有し、薬物の循環レベルは2週間後でも非常に高かった (1 mg/kg 、 10 mg/kg 、または 30 mg/kg の初期投与について、それぞれ、 $11 \mu\text{g/ml}$ 、 $110 \mu\text{g/ml}$ 、または $304 \mu\text{g/ml}$)。カニクイザルでは、血漿半減期は14日よりも実質的に大きく、薬物の循環レベルは、 1 mg/kg 、 10 mg/kg 、または 30 mg/kg の初期投与について、それぞれ、 $25 \mu\text{g/ml}$ 、 $304 \mu\text{g/ml}$ 、または $1440 \mu\text{g/ml}$ であった。

【0390】

(実施例2)

A c t R I I A - h F c タンパク質の特徴付け

A c t R I I A - h F c 融合タンパク質を、配列番号52の組織プラスミノーゲンリーダー配列を使用して、pAID4ベクター (SV40 ori/エンハンサー、CMVプロモーター) に由来する安定にトランスフェクトされたCHO-DUKX B11細胞中で発現させた。実施例1に上記したように精製されたタンパク質は、配列番号50の配列を有していた。Fc部分は、配列番号50に示されるような、ヒトIgG1 Fc配列である。タンパク質分析により、A c t R I I A - h F c 融合タンパク質がジスルフィド結合を含むホモ二量体として形成されることが示された。

【0391】

CHO細胞により発現される材料は、ヒト293細胞中で発現されるA c t R I I a - h F c 融合タンパク質について報告されたものよりも、アクチビンBリガンドに対する高いアフィニティを有する [del Reら (2004年) J Biol Chem. 279巻 (51号): 53126~53135頁を参照されたい]。さらに、TPAリーダー配列の使用は、他のリーダー配列よりも多い産生を提供し、ネイティブリーダーを用いて発現されたA c t R I I A - F c と違って、非常に純粋なN末端配列を提供した。ネイティブリーダー配列の使用は、それぞれ、異なるN末端配列を有する、2つの主要な種のA c t R I I A - F c をもたらした。

【0392】

(実施例3)

代替的なA c t R I I A - F c タンパク質

本明細書に記載の方法に従って使用され得る様々なA c t R I I A 変体は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2006/012627 (例えば、55~58頁を参照されたい) として公開された国際特許出願に記載されている。代替的な構築物は、C末端テール (A c t R I I A の細胞外ドメインの最後の15アミノ酸) の欠失を有し得る。そのような構築物の配列を以下に提示する (Fc部分に下線を付す) (配列番号57)。

10

20

30

40

50

【化 4 4】

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【 0 3 9 3 】

(実施例 4)

A c t R I I B - F c 融合タンパク質の生成

出願人は、間にリンカー（3 個のグリシンアミノ酸）を有する、ヒトまたはマウス F c ドメインに融合されたヒト A c t R I I B の細胞外ドメインを有する可溶性 A c t R I I B 融合タンパク質を構築した。この構築物は、それぞれ、A c t R I I B - h F c および A c t R I I B - m F c と称される。

【 0 3 9 4 】

A c t R I I B - h F c は、C H O 細胞系から精製されたものとして以下に示される（配列番号 5 8）。

20

【化 4 5】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

30

【 0 3 9 5 】

A c t R I I B - h F c および A c t R I I B - m F c タンパク質を、C H O 細胞系中で発現させた。3 つの異なるリーダー配列：(i) ミツバチメリチン (H B M L) 、(i i) 組織プラスミノゲンアクチベーター (T P A) 、および (i i i) ネイティブ：M G A A A K L A F A V F L I S C S S G A （配列番号 5 9）を考慮した。

【 0 3 9 6 】

選択された形態は、T P A リーダーを使用し、以下のプロセッシングされていないアミノ酸配列（配列番号 6 0）を有する。

40

【化 4 6】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPICKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【 0 3 9 7】

このポリペプチドは、以下の核酸配列によってコードされる（配列番号 6 1）。

【化 4 7】

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG
GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG

20

【化 4 8】

CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA
CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG
TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
AAATGA

30

40

50

【0398】

CHO細胞により産生される材料のN末端配列決定により、－GRGEAE（配列番号62）の主要な配列が示された。注目すべきことに、文献で報告された他の構築物は、－SGR...配列から始まる。

【0399】

例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程によって、精製を達成することができた。ウイルス濾過および緩衝液交換によって精製を完了することができた。

10

【0400】

ActRIIB－Fc融合タンパク質を、HEK293細胞およびCOS細胞中でも発現させた。全ての細胞系に由来する材料および合理的な培養条件は、*in vivo*で筋肉増強活性を有するタンパク質を提供したが、おそらく、細胞系の選択および／または培養条件に関して効力の変動が観察された。

【0401】

出願人は、ActRIIBの細胞外ドメイン中で一連の変異を生成し、細胞外ActRIIBと、Fcドメインとの可溶性融合タンパク質としてこれらの変異体タンパク質を産生した。バックグラウンドActRIIB－Fc融合体は、配列番号58の配列を有する。

【0402】

NおよびC末端切断を含む、様々な変異を、バックグラウンドActRIIB－Fcタンパク質中に導入した。本明細書に提示されるデータに基づいて、これらの構築物は、TPAリーダーと共に発現された場合、N末端セリンを欠くと予想される。PCR変異誘発により、ActRIIB細胞外ドメイン中で変異を生成した。PCR後、フラグメントを、Qiagenカラムを通して精製し、SfiIおよびAgeIで消化し、ゲル精製した。これらのフラグメントを、ライゲーション時に、ヒトIgG1との融合キメラを作出するように、発現ベクターpAID4（WO2006／012627を参照されたい）中にライゲーションした。E.coli DH5アルファ中への形質転換時に、コロニーを拾い、DNAを単離した。マウス構築物（mFc）については、マウスIgG2aを、ヒトIgG1に置換した。全ての変異体の配列を検証した。

20

30

【0403】

全ての変異体を、一過的トランスフェクションによってHEK293T細胞中で産生させた。まとめると、500mlのスピナー中で、HEK293T細胞を、250ml容量でFreestyle（Invitrogen）培地中、 6×10^5 細胞/mlに設定し、一晚増殖させた。次の日、これらの細胞を、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の最終DNA濃度で、DNA：PEI（1：1）複合体で処理した。4h後、250mlの培地を添加し、細胞を7日間増殖させた。細胞をスピンドウンすることによって馴化培地を集め、濃縮した。

【0404】

例えば、プロテインAカラムを含む様々な技術を使用して変異体を精製し、低pH（3.0）のグリシン緩衝液を用いて溶出させた。中和後、これらのものをPBSに対して透析した。

40

【0405】

また、変異体を、同様の方法によってCHO細胞中でも産生させた。変異体を、参照により本明細書に組み込まれるWO2008／097541およびWO2006／012627に記載の結合アッセイおよび／またはバイオアッセイにおいて試験した。一部の例では、精製タンパク質よりもむしろ馴化培地を用いてアッセイを実施した。ActRIIBのさらなる変化は、米国特許第7,842,663号に記載されている。

【0406】

出願人は、ネイティブActRIIBリーダーに置換されたTPAリーダー配列とN末端で融合され、最小リンカー（3個のグリシン残基）を介してヒトFcドメインとC末端で

50

融合された、N末端およびC末端切断（配列番号1のネイティブタンパク質の残基25～131）を有するヒトActRIIB細胞外ドメインを含む、ActRIIB（25～131）-hFc融合タンパク質を生成した（図7；配列番号123）。この融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、図8に示す（配列番号124はコード鎖であり、配列番号125は相補鎖である）。コドンを変更したところ、ActRIIB（25～131）-hFcタンパク質をコードする核酸改変体は、初期の形質転換体の発現レベルの実質的な改善を提供することがわかった（図9；配列番号126はコード鎖であり、配列番号127は相補鎖である）。

【0407】

成熟タンパク質は、以下のようなアミノ酸配列を有する（N末端配列決定により確認されたN末端）（配列番号63）。

【化49】

ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

【化50】

KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK

アミノ酸1～107は、ActRIIBに由来する。

【0408】

例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程を使用して、発現された分子を精製した。ウイルス濾過および緩衝液交換によって精製を完了することができた。

【0409】

ActRIIB（25～131）-hFcおよびその完全長対応物ActRIIB（20～134）-hFcに対するいくつかのリガンドのアフィニティを、Biacore（商標）機器を用いて*in vitro*で評価し、その結果を以下の表にまとめる。*k_{on}*および*k_{off}*の正確な決定を妨げる、複合体の非常に急速な会合および解離のため、安定状態のアフィニティ適合により、*K_d*値を得た。ActRIIB（25～131）-hFcは、高いアフィニティでアクチビンA、アクチビンB、およびGDF11に結合した。ActRIIB-hFc形態のリガンドアフィニティ：

【表2】

融合構築物	アクチビン A (e-11)	アクチビン B (e-11)	GDF11 (e-11)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1

10

20

30

40

50

【0410】

(実施例5)

GDFトラップの生成

出願人は、以下のようにGDFトラップを構築した。GDF11および／またはミオスタチンと比較してアクチビンA結合が大きく低下した（配列番号1の79位でのロイシンからアスパラギン酸への置換の結果として）、ActRIIBの改変された細胞外ドメイン（L79D置換を有する配列番号1のアミノ酸20～134）を有するポリペプチドを、間の最小リンカー（3個のグリシンアミノ酸）を用いてヒトまたはマウスFcドメインに融合した。この構築物は、それぞれ、ActRIIB（L79D 20～134）-hFcおよびActRIIB（L79D 20～134）-mFcと称される。79位にアスパラギン酸よりもむしろグルタミン酸を有する代替的な形態も、同様に実施した（L79E）。以下の、配列番号64に関して226位にバリンよりもむしろアラニンに有する代替的な形態も生成し、試験した全ての点において同等に実施した。79位のアスパラギン酸（配列番号1と比較、または配列番号64と比較した60位）を、以下に二重下線で示す。配列番号64と比較した226位のバリンも、以下に二重下線で示す。

10

【0411】

GDFトラップActRIIB（L79D 20～134）-hFcを、CHO細胞系から精製されたものとして以下に示す（配列番号64）。

【化51】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

20

【0412】

GDFトラップのActRIIB由来部分は、以下に記載のアミノ酸配列（配列番号65）を有し、その部分を、単量体として、または単量体、二量体、もしくはより高次の複合体としての非Fc融合タンパク質として使用することができた。

30

【化52】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APT (配列番号 65)

【0413】

GDFトラップタンパク質を、CHO細胞系中で発現させた。3つの異なるリーダー配列を考慮した：(i) ミツバチメリチン（HBML）、(ii) 組織プラスミノーゲンアクチベーター（TPA）、および(iii) ネイティブ。

40

【0414】

選択された形態は、TPAリーダー配列を使用し、以下のプロセッシングされていないアミノ酸配列を有する。

50

【化 5 3】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

【化 5 4】

LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 66)

10

【0 4 1 5】

このポリペプチドは、以下の核酸配列（配列番号 6 7）によってコードされる。

【化 5 5】

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG
GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA
CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG
TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA
CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
AAATGA

20

30

40

【0 4 1 6】

50

例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程により、精製を達成することができた。ウイルス濾過および緩衝液交換によって精製を完了することができた。精製スキームの一例では、細胞培養培地を、プロテインAカラム上を通過させ、150mM Tris/NaCl (pH 8.0) 中で洗浄した後、50mM Tris/NaCl (pH 8.0) 中で洗浄し、0.1Mグリシン、pH 3.0で溶出させる。低pHの溶出液を、ウイルスクリアランス工程として、室温で30分間保持する。次いで、溶出液を中和し、Q-セファロースイオン交換カラム上を通過させ、50mM Tris pH 8.0、50mM NaCl 中で洗浄し、50mM Tris pH 8.0中、150mM~300mMのNaCl濃度で溶出させる。次いで、溶出液を、50mM Tris pH 8.0、1.1M硫酸アンモニウムに変更し、フェニルセファロースカラム上に通過させ、洗浄し、50mM Tris pH 8.0中、150~300mMの硫酸アンモニウムで溶出させる。溶出液を透析し、使用のために濾過する。

【0417】

さらなるGDFトラップ（ミオスタチンまたはGDF11結合に対するアクチビンA結合の比が低減されるように改変されたActRIIB-Fc融合タンパク質）は、参照により本明細書に組み込まれるWO2008/097541およびWO2006/012627に記載されている。

【0418】

（実施例6）

GDF-11およびアクチビンにより媒介されるシグナル伝達のためのバイオアッセイ A-204レポーター遺伝子アッセイを使用して、GDF-11およびアクチビンAによるシグナル伝達に対するActRIIB-Fcタンパク質およびGDFトラップの効果を評価した。細胞系：ヒト横紋筋肉腫（筋肉に由来する）。レポーターベクター：pGL3 (CAGA)12 (Dennlerら、1998年、EMBO 17巻：3091~3100頁に記載されている)。CAGA12モチーフは、TGF-βベータTGFβ応答遺伝子（例えば、PAI-1遺伝子）中に存在するため、このベクターは、SMAD2および3を介する因子のシグナル伝達にとって一般的に有用である。

1日目：A-204細胞を48ウェルプレートに分割する。

2日目：A-204細胞に、10μgのpGL3 (CAGA)12またはpGL3 (CAGA)12 (10μg) + pRLCMV (1μg) およびFugeneをトランスフェクトする。

3日目：因子（培地+0.1%BSA中に希釈したもの）を添加する。細胞に添加する前に1h、阻害剤を因子と共に予備インキュベートする必要がある。6時間後、細胞をPBSですすぎ、溶解した。

【0419】

この後、ルシフェラーゼアッセイを行う。任意の阻害剤の非存在下では、アクチビンAは、レポーター遺伝子発現の10倍の刺激を示し、ED50は約2ng/mlであった。GDF-11：16倍刺激、ED50：約1.5ng/ml。

【0420】

ActRIIB (20-134) は、このアッセイにおいて、アクチビンA、GDF-8、およびGDF-11活性の強力な阻害剤である。下記に記載されている通り、ActRIIB改変体もこのアッセイで試験した。

【0421】

（実施例7）

ActRIIB-Fc改変体、細胞に基づく活性

ActRIIB-Fcタンパク質およびGDFトラップの活性を、上記のような細胞に基づくアッセイにおいて試験した。結果を、以下の表にまとめる。いくつかの改変体を、異

10

20

30

40

50

なるC末端切断型構築物中で試験した。上で論じられたように、5個または15個のアミノ酸の切断は、活性の低下を引き起こした。GDFトラップ（L79DおよびL79E改変体）は、GDF-11のほぼ野生型の阻害を保持しながら、アクチビンA阻害の実質的な喪失を示した。

GDF11およびアクチビンAへの可溶性ActRIIB-Fcの結合：

【表3-1】

ActRIIB-Fc 改変	ActRIIBの部分 (配列番号1のアミノ酸に対応する)	GDF11 阻害活性	アクチビン阻害活性
R64	20-134	+++ (約 10^{-8} M K_D)	+++ (約 10^{-8} M K_D)
A64	20-134	+ (約 10^{-6} M K_D)	+ (約 10^{-6} M K_D)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	+++++	+++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

10

- + 弱い活性(およそ 1×10^{-6} K_I)
 ++ 中程度の活性(およそ 1×10^{-7} K_I)
 +++ 良好な(野生型)活性(およそ 1×10^{-8} K_I)
 ++++ 野生型より高い活性

【0422】

(実施例8)

GDF-11およびアクチビンAの結合

ある特定のActRIIB-Fcタンパク質およびGDFトラップの、リガンドへの結合を、Biacore(商標)アッセイにおいて試験した。

【0423】

ActRIIB-Fc改変体または野生型タンパク質を、抗hFc抗体を使用してシステム上に捕捉した。リガンドを注入し、捕捉された受容体タンパク質上に流した。結果を、以下の表にまとめる。

IIB改変体のリガンド結合特異性：

【表4-1】

	GDF11		
タンパク質	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10

30

40

50

【表 4 - 2】

ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
	GDF8		
タンパク質	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
	アクチビン A		
タンパク質	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			低結合
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			低結合
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11

【表 4 - 3】

ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11
----------------------------------	--------	---------	----------

【 0 4 2 4 】

無細胞アッセイで得られたこれらのデータは、細胞に基づくアッセイデータを確認するものであり、A 2 4 N 改変体が A c t R I I B (2 0 - 1 3 4) - h F c 分子のものと同様

のリガンド結合活性を保持すること、および L 7 9 D または L 7 9 E 分子がミオスタチンおよび G D F 1 1 結合を保持するが、アクチビン A への結合の顕著な低下（定量不可）を示すことを示している。

【 0 4 2 5 】

他の改変体は、WO 2 0 0 6 / 0 1 2 6 2 7（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に報告されたように生成および試験された。例えば、デバイスにカップリングされたリガンドを使用し、カップリングされたリガンドに対して受容体を流す、59～60頁を参照されたい。注目すべきことに、K 7 4 Y、K 7 4 F、K 7 4 I（およびおそらく、K 7 4 L などの、K 7 4 での他の疎水性置換）、および D 8 0 I は、野生型 K 7 4 分子と比較した、アクチビン A（A c t A）結合の G D F 1 1 結合に対する比の低下を引き起こす。これらの改変体に関するデータの表を、以下に再現する。

G D F 1 1 およびアクチビン A への可溶性 A c t R I I B - F c 改変体の結合（B i a c o r e（商標）アッセイ）

【表 5 - 1】

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15tail	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* 観察された結合なし
 -- WTの1/5未満の結合
 - WTの約1/2の結合
 + WT
 ++ 2倍未満増加した結合
 +++ 約5倍増加した結合
 ++++ 約10倍増加した結合
 +++++ 約40倍増加した結合
 【 0 4 2 6 】

10

20

30

40

50

(実施例 9)

ActRIIB細胞外ドメインが切断されたGDFトラップの生成

ActRIIB (L79D 20-134)-hFcと称されるGDFトラップを、ロイシンからアスパラギン酸への置換（配列番号1中の残基79での）を含有するActRIIB細胞外ドメイン（配列番号1中の残基20～134）へのTPAリーダーのN末端融合およびヒトFcドメインと、最小リンカー（3個のグリシン残基）とのC末端融合によって生成した（図10；配列番号128）。この融合タンパク質に対応するヌクレオチド配列は、図11に示される（配列番号129、センス鎖；および配列番号130、アンチセンス鎖）。

【0427】

ActRIIB (L79D 25-131)-hFcと称される、ActRIIB細胞外ドメインが切断されたGDFトラップを、ロイシンからアスパラギン酸への置換（配列番号1中の残基79での）を含有する切断された細胞外ドメイン（配列番号1中の残基25～131）へのTPAリーダーのN末端融合およびヒトFcドメインと、リンカー（3個のグリシン残基）とのC末端融合によって生成した（図12；配列番号131）。細胞精製型のActRIIB (L79D 25-131)-hFcの配列は、図13（配列番号132）中に提示され、リーダー、リンカーまたはFcドメインを含まない成熟細胞外ドメインは、図14（配列番号133）に提示される。この融合タンパク質をコードする1つのヌクレオチド配列を、その相補配列（配列番号135）と共に図15（配列番号134）に示し、全く同じ融合タンパク質をコードする代替的なヌクレオチド配列を、その相補配列（配列番号137）と共に図16（配列番号136）に示す。

【0428】

(実施例 10)

ActRIIB細胞外ドメインが二重切断されたGDFトラップによる選択的リガンド結合いくつかのリガンドに対するGDFトラップおよび他のActRIIB-hFcタンパク質のアフィニティを、Biacore（商標）機器を用いて*in vitro*で評価した。結果を、以下の表にまとめる。 k_{on} および k_{off} の正確な決定を妨げる、複合体の非常に急速な会合および解離のため、安定状態アフィニティ適合により、 K_d 値を得た。ActRIIB-hFc変体のリガンド選択性：

【表 6】

融合構築物	アクチビン A (K_d e-11)	アクチビン B (K_d e-11)	GDF11 (K_d e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350.0	78.8	12.3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290.0	62.1	7.4

【0429】

細胞外ドメインが切断されたGDFトラップ、ActRIIB (L79D 25-131)-hFcは、より長い変体、ActRIIB (L79D 20-134)-hFcによって示されるリガンド選択性と同等であるか、またはそれを上回るものであり、L79D置換を欠くActRIIB-hFc対応物と比較して、アクチビンA結合の顕著な喪失、アクチビンB結合の部分的欠失、およびGDF11結合のほぼ完全な保持を示した。切

断型単独（L79D置換を含まない）では、ここに示されたりガンド間で選択性を変化させなかった[A c t R I I B（L79 25-131）-h F cとA c t R I I B（L79 20-134）-h F cとを比較]ことに留意されたい。A c t R I I B（L79D 25-131）-h F cはまた、S m a d 2 / 3シグナル伝達リガンドG D F 8ならびにS m a d 1 / 5 / 8リガンドB M P 6およびB M P 1 0への強いものから中間の結合を保持する。

【0430】

（実施例11）

A c t R I I B 5に由来するG D Fトラップ

他者は、A c t R I I B膜貫通ドメインを含むエクソン4が異なるC末端配列によって置き換えられた、別の可溶性形態のA c t R I I B（A c t R I I B 5と命名されている）を報告した（例えば、W O 2 0 0 7 / 0 5 3 7 7 5を参照されたい）。

【0431】

そのリーダーを含まないネイティブなヒトA c t R I I B 5の配列は、以下の通りである。

【化56】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

【化57】

KGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGAHE (配列番号 68)

【0432】

ロイシンからアスパラギン酸への置換、または他の酸性の置換を、記載のようにネイティブな79位（下線）で実施して、以下の配列を有する改変体A c t R I I B 5（L79D）を構築することができる。

【化58】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGAHE (配列番号 69)

【0433】

この改変体を、T G G Gリンカー（一重下線）を用いてヒトF c（二重下線）に接続して、以下の配列を有するヒトA c t R I I B 5（L79D）-h F c融合タンパク質を生成することができる。

10

20

30

40

50

【化 5 9】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
 KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
 TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHETTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVTLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 70)

10

【0 4 3 4】

この構築物を、CHO細胞中で発現させることができる。

【0 4 3 5】

(実施例 1 2)

20

マウスにおけるActRIIA-FcおよびActRIIB-Fcの抗腫瘍活性

出願人は、同系マウス白血病モデルにおいてホモ二量体ActRIIA-Fc (配列番号 50のホモ二量体) およびActRIIB-Fc (配列番号 58のホモ二量体) 融合タンパク質の潜在的な抗腫瘍活性を調査した。7週齢のBALB/cマウスを、処置に無作為に割り当て (n=10匹/群)、腫瘍埋込みの2日前に開始して、週2回、ActRIIA-mFc (10mg/kg)、ActRIIB-mFc (10mg/kg)、またはビヒクル (リン酸緩衝生理食塩水、PBS、5mL/kg) で腹腔内処置した。0日目に、それぞれのマウスに、PBS (100μL) 中に懸濁した1×10⁶個のRL[♂]1 (RL雄1) 細胞を皮下接種した。RL雄1は、BALB/c起源のx線誘導性白血病であり (Sato Hら、1973年、J Exp Med 138巻: 593~606頁)、細胞は、MEXT、日本のナショナルバイオリソースプロジェクトを介してRIKEN BRC (バイオリソースセンター) 細胞バンクから得られたものであり、これらの試験における使用のためにサブクロニングされたものであった。マウスへの接種後、体重および腫瘍体積を週に2回測定した。カリパスを用いて得られた2次元測定値から、腫瘍体積を算出した: 腫瘍体積 (mm³) = (L×W×W) / 2 (式中、LおよびWは、それぞれ、腫瘍の長さおよび幅 (mm) である)。完全な腫瘍退縮および無腫瘍生存を両方とも、Teicher BA (編) Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval; Humana Press、1997年に従って定義した。地方のIACUC規則により、生存分析のために使用された終点は、2000mm³より大きい腫瘍体積、20%を超える体重減少、または後肢麻痺であった。異なる群の生存曲線を、GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して、中央生存により、ならびにログランク (Mantel-Cox) 検定により比較した。

30

40

【0 4 3 6】

以下の表に示されるように、ActRIIA-mFcおよびActRIIB-mFcは両方とも、抗腫瘍活性を示した。

50

【表 7】

被験物質	株	n	用量 (mg/kg)	経路	スケジュール	無腫瘍% (56 日目)	中央生存 (日)	ログランク 検定 (P 値)
ビヒクル	BALB/c	10	--	腹腔内	週 2 回	0	14.5	--
ActRIIA- mFc	BALB/c	10	10	腹腔内	週 2 回	20	21.5	0.008
ActRIIB- mFc	BALB/c	10	10	腹腔内	週 2 回	20	32.5	< 0.0001

10

【0437】

ActRIIA-mFc または ActRIIB-hFc を用いる処置は、ビヒクル処置されたマウスのうちの 0 匹と比較して、10 匹のマウスのうちの 2 匹 (20%) において 56 日目に無腫瘍状態をもたらした。ログランク検定における中央生存の増加および高い有意性 (表を参照されたい) もまた、ActRIIA-mFc および ActRIIB-mFc がそれぞれ、腫瘍担持マウスの生存を促進したことを示す。ActRIIB-mFc 処置されたマウスの 50% が、ビヒクル処置群における 0% と比較して、34 日目までに完全な腫瘍退縮を示したため、ActRIIB-mFc に対する初期応答は特にロバストであった。これらの結果は、ActRIIA-mFc および ActRIIB-mFc が、in vivo で抗腫瘍活性を有することを示す。さらに、これらのデータは、他の ActRII アンタゴニストが患者におけるがんおよび腫瘍の処置において有用であり得ることを示す。

20

【0438】

(実施例 13)

マウスにおける ActRIIA-Fc および ActRIIB-Fc の抗腫瘍活性は、T 細胞を必要とする

出願人は次に、ActRIIB-hFc が ActRIIB-mFc のものと同様の抗腫瘍活性を有するかどうか、および抗腫瘍活性が T 細胞媒介性免疫に依存するかどうかを、同じマウス白血病モデルにおいて調査した。7 週齢の BALB/c マウスを、処置に無作為に割り当て (n = 10 匹/群)、腫瘍埋込みの 2 日前に開始して、週 2 回、ActRIIB-mFc (10 mg/kg)、ActRIIB-hFc (10 mg/kg)、またはビヒクル (PBS、5 ml/kg) で腹腔内処置した。さらに、T 細胞免疫欠損を有する 7 週齢の NCr ノードマウスを、処置に無作為に割り当て (n = 10 匹/群)、腫瘍埋込みの 2 日前に開始して、週 2 回、ActRIIB-mFc (10 mg/kg)、ActRIIB-hFc (10 mg/kg)、またはビヒクル (PBS、5 ml/kg) で腹腔内処置した。最後に、以前の実験中に約 7 週間にわたって無腫瘍を保持した 4 匹のマウス (実施例 12; ActRIIA-mFc で処置された 2 匹のマウスおよび ActRIIB-mFc で処置された 2 匹のマウス) に、本実験において RL 雄 1 細胞を再チャレンジして、抗腫瘍免疫記憶について試験した。0 日目に、それぞれのマウスに、PBS (100 μL) 中に懸濁した 1×10^6 個の RL 雄 1 (RL 雄 1) 細胞を皮下接種した。マウスへの接種後、体重および腫瘍体積を週に 2 回測定した。地方の IACUC 規則により、生存分析のために使用された終点は、2000 mm³ より大きい腫瘍体積、20% を超える体重減少、または後肢麻痺であった。

30

40

【0439】

以下の表に示されるように、ActRIIB-mFc および ActRIIB-hFc の抗腫瘍効果は、マウス株に依存していた。

50

【表 8】

被験物質	株	n	用量 (mg/kg)	経路	スケジュール	無腫瘍(%) (56 日目)	中央生存(日)	ログランク 検定 (P 値)
ビヒクル	BALB/c	10	--	腹腔内	週 2 回	0	17	--
ActRIIB-mFc	BALB/c	10	10	腹腔内	週 2 回	10	36	0.002
ActRIIB-hFc	BALB/c	10	10	腹腔内	週 2 回	30	27.5	0.003
ビヒクル	NCr-ヌード	10	--	腹腔内	週 2 回	0	12	--
ActRIIB-mFc	NCr-ヌード	10	10	腹腔内	週 2 回	0	12	0.07
ActRIIB-hFc	NCr-ヌード	10	10	腹腔内	週 2 回	0	12	0.03
ActRIIA-mFc	BALB/c 再チャレンジ マウス	2	--	--	--	100	--	--
ActRIIB-mFc	BALB/c 再チャレンジ マウス	2	--	--	--	100	--	--

【0440】

以前の実験において観察されたように、ActRIIB-hFcとActRIIB-mFcは両方とも、免疫応答性BALB/cマウスにおいて抗腫瘍活性を示した。ActRIIB-mFcまたはActRIIB-hFcを用いる処置は、ビヒクル処置されたマウスの0%と比較して、56日目にそれぞれ10%または30%のマウスの無腫瘍状態をもたらした。ログランク検定における中央生存の増加および高い有意性（表を参照されたい）はまた、ActRIIB-mFcおよびActRIIB-hFcがそれぞれ、腫瘍担持マウスの生存を促進したことを示す。重要なことに、NCrヌードマウスにおけるActRIIB-mFcおよびActRIIB-hFcの抗腫瘍効果は、BALB/cマウスと比較して、存在しないか、または顕著に鈍った（表を参照されたい）が、それによって、ActRIIBリガンドのこれらの阻害剤に関する作用機構においてT細胞免疫を関与させる。さらに、以前の実験から持ち越された4匹全部の無腫瘍マウスが、RL雄1腫瘍細胞の反復接種にも拘わらず、本実験を通して検出可能な腫瘍増殖を示さなかった。これらの結果は、免疫細胞が、BALB/cバックグラウンド上でのActRIIA-mFcまたはActRIIB-mFcを用いる処置によって引き起こされるRL雄1腫瘍の退縮を媒介すること、および有効な抗腫瘍免疫応答が腫瘍抗原に対する免疫記憶を生成したことのさらなる証拠を提供する。まとめると、これらの結果は、*in vivo*でのActRIIB-hFcおよびActRIIB-mFcの抗腫瘍活性を確認し、ActRIIアンタゴニストに関してこの活性にT細胞免疫を強く関与させる。したがって、このデータは、ActRIIアンタゴニストを使用して、特に、がんを処置するための免疫腫瘍剤として、免疫活性を促進することができる。

【0441】

(実施例14)

ALK4：ActRIIBヘテロ二量体の生成

出願人は、それぞれ、リンカーが細胞外ドメインとFcドメインとの間に位置付けられたFcドメインに融合されたヒトActRIIBおよびヒトALK4の細胞外ドメインを含む可溶性ALK4-Fc：ActRIIB-Fc異種複合体を構築した。個々の構築物を、それぞれActRIIB-Fc融合ポリペプチドおよびALK4-Fc融合ポリペプチドと称し、各々の配列は以下に提供される。

【0442】

ALK4-Fc: ActRIIB-Fc 異種複合体の形成を促進するための方法は、ActRIIB-Fc または ALK4-Fc ホモ二量体の複合体とは反対に非対称異種複合体の形成を誘導するために Fc ドメインのアミノ酸配列に変更を導入する。Fc 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、本開示において記載される。

【0443】

1つのアプローチでは、それぞれ配列番号71および73および配列番号74および76のActRIIB-FcおよびALK4-Fcポリペプチド配列において、1つのFcドメインは、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、他方、他のFc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ことが示されている。ActRIIB-Fc 融合ポリペプチドおよびALK4-Fc 融合ポリペプチドは、それぞれ、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)リーダーを利用する。

【0444】

ActRIIB-Fc ポリペプチド配列(配列番号71)は以下に示される:

【化60】

```

1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQOPEN NYKTTTPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK ( 配列番号 71)

```

【0445】

リーダー(シグナル)配列およびリンカーに下線を付す。可能なホモ二量体の複合体のいずれかよりむしろALK4-Fc: ActRIIB-Fc ヘテロ二量体の形成を促進するために、2つのアミノ酸置換(酸性アミノ酸をリジンで置き換える)が、上の二重下線で示されるようにActRIIB融合タンパク質のFcドメインに導入され得る。配列番号71のアミノ酸配列は、任意選択で、C末端からリジン(K)が除去されて提供されてもよい。

【0446】

このActRIIB-Fc 融合タンパク質は以下の核酸配列(配列番号72)にコードされる:

10

20

30

40

50

【化 6 1】

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
 1101 TAAA (配列番号 72)

10

20

30

40

【 0 4 4 7】

成熟 A c t R I I B - F c 融合ポリペプチド（配列番号 73）は、以下の通りであり、任意選択で、C末端からリジン（K）が除去されて提供されてもよい。

【化 6 2】

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101 GGPEVTYEPPT PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF
 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

10

(配列番号 73)

【 0 4 4 8】

A L K 4 - F c 融合ポリペプチド (配列番号 7 4) の相補的形態は、以下の通りである :

【化 6 3】

20

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
 51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 301 DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351 SLSPG (配列番号 74)

30

【 0 4 4 9】

リーダー配列およびリンカーに下線を付す。上記配列番号 7 1 および 7 3 の A c t R I I B - F c 融合ポリペプチドでヘテロ二量体形成を誘導するために、2つのアミノ酸置換 (リジンをアスパラギン酸で置き換える) が、上の二重下線で示されるように A L K 4 - F c 融合ポリペプチドの F c ドメインに導入され得る。配列番号 7 4 のアミノ酸配列は、任意選択で、リジン (K) が C 末端に付加されて提供されてもよい。

40

【 0 4 5 0】

この A L K 4 - F c 融合タンパク質は以下の核酸 (配列番号 7 5) にコードされる :

【化 6 4】

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
 151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAAGTCACA
 401 CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
 451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
 501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
 701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT
 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
 901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
 951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
 1051 TCCCTGTCTC CGGGT (配列番号 75)

10

20

30

40

【 0 4 5 1】

成熟 A L K 4 - F c 融合タンパク質配列（配列番号 7 6）は、以下の通りであり、任意選択で、リジン（K）が C 末端に付加されて提供されてもよい。

【化 6 5】

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTP PVLDSDGSFF LYSDLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP G (配列番号 76)

10

【0 4 5 2】

それぞれ、配列番号 7 3 および配列番号 7 6 の A c t R I I B - F c および A L K 4 - F c タンパク質を、CHO 細胞系、から共発現させ、精製して、A L K 4 - F c : A c t R I I B - F c を含む異種複合体が得られ得る。

【0 4 5 3】

非対称 F c 融合タンパク質を使用するヘテロ多量体複合体の形成を促進する別のアプローチでは、F c ドメインは、それぞれ、配列番号 7 7 および 7 8 および配列番号 7 9 および 8 0 の A c t R I I B - F c および A L K 4 - F c ポリペプチド配列に示されるように相補的な疎水性相互作用および追加の分子内ジスルフィド結合を導入するように変更されている。A c t R I I B - F c 融合ポリペプチドおよび A L K 4 - F c 融合ポリペプチドは、それぞれ、組織プラスミノゲン活性化因子 (T P A) リーダーを利用する。

20

【0 4 5 4】

A c t R I I B - F c ポリペプチド配列 (配列番号 7 7) は以下に示される：

【化 6 6】

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQs
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (配列番号 77)

30

40

【0 4 5 5】

リーダー (シグナル) 配列およびリンカーに下線を付す。可能なホモ二量体の複合体のいずれかよりむしろ A L K 4 - F c : A c t R I I B - F c ヘテロ二量体の形成を促進するために、2つのアミノ酸置換 (セリンをシステインで置き換え、スレオニンをトリプトファンで置き換える) が、上の二重下線で示されるように融合タンパク質の F c ドメインに

50

導入され得る。配列番号 77 のアミノ酸配列は、任意選択で、C 末端からリジン（K）が除去されて提供されてもよい。

【0456】

成熟 A c t R I I B - F c 融合ポリペプチドは、以下の通りである：

【化 6 7】

```

1   GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
51  IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

```

10

(配列番号 78)

20

【0457】

ALK4-F c 融合ポリペプチド（配列番号 79）の相補的形態は、以下の通りであり、任意選択で、C 末端からリジン（K）が除去されて提供されてもよい。

【化 6 8】

```

1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51  GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKENWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
301 KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK      ( 配列番号 79 )

```

30

40

【0458】

リーダー配列およびリンカーに下線を付す。上記配列番号 77 および 78 の A c t R I I B - F c 融合ポリペプチドでヘテロ二量体形成を誘導するために、4つのアミノ酸置換が、上の二重下線で示されるように ALK4 融合ポリペプチドの F c ドメインに導入され得る。配列番号 79 のアミノ酸配列は、任意選択で、C 末端からリジン（K）が除去されて提供されてもよい。

【0459】

成熟 ALK4-F c 融合タンパク質配列は、以下の通りであり、任意選択で、C 末端からリジン（K）が除去されて提供されてもよい。

50

【化 6 9】

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
 251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK (配列番号 80)

10

【0 4 6 0】

それぞれ、配列番号 78 および配列番号 80 の A c t R I I B - F c および A L K 4 - F c タンパク質を、CHO 細胞系から同時発現させ、精製して、A L K 4 - F c : A c t R I I B - F c を含む異種複合体を生じさせることができる。

【0 4 6 1】

様々な A L K 4 - F c : A c t R I I B - F c 複合体の精製を、例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程によって達成することができた。精製を、ウイルス濾過および緩衝液交換によって完了することができた。

20

【0 4 6 2】

非対称性 F c 融合タンパク質を使用するヘテロ多量体複合体の形成を促進するための別の手法では、F c ドメインを変化させて、それぞれ、配列番号 139 ~ 142 および配列番号 143 ~ 146 の A c t R I I B - F c および A L K 4 - F c ポリペプチド配列中に示されるように、正味の分子電荷に基づく精製を容易にするために、2つの F c ドメイン間に相補的疎水性相互作用、さらなる分子間ジスルフィド結合、および静電的差異を導入する。A c t R I I B - F c 融合ポリペプチドおよび A L K 4 - F c 融合ポリペプチドはそれぞれ、組織プラスミノゲンアクチベーター (T P A) リーダーを使用する。

30

【0 4 6 3】

A c t R I I B - F c ポリペプチド配列 (配列番号 139) を以下に示す。

【化 7 0】

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT ENQVSLWCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQD SLSLSPG (配列番号 139)

40

【0 4 6 4】

50

リーダー配列およびリンカーに下線を付す。可能なホモ二量体複合体のいずれかよりも A L K 4 - F c : A c t R I I B - F c ヘテロ二量体の形成を促進するために、2 個のアミノ酸置換（セリンをシステインで、およびスレオニンをトリプトファンで置き換える）を、上で二重下線によって示されるように融合タンパク質の F c ドメイン中に導入することができる。A L K 4 - F c : A c t R I I B - F c ヘテロ二量体の精製を容易にするために、2 個のアミノ酸置換（リジンを酸性アミノ酸で置き換える）も、上で二重下線によって示されるように融合タンパク質の F c ドメイン中に導入することができる。配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列は、任意選択で、C 末端にリジンを付加して提供され得る。

【0465】

この A c t R I I B - F c 融合タンパク質は、以下の核酸（配列番号 1 4 0）によってコードされる。

【化71】

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT

```

【化72】

```

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGGA GGAGATGACC GAGAACCAGG
851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGGAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101 T          ( 配列番号 140 )

```

【0466】

成熟 A c t R I I B - F c 融合ポリペプチドは、以下の通りであり（配列番号 1 4 1）、

任意選択で、C末端にリジンを付加して提供され得る。

【化73】

```

1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
51  IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
251 REEMTENQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQDSL SLS PG
( 配列番号 141 )

```

10

【0467】

このActRIIB-Fc融合ポリペプチドは、以下の核酸（配列番号142）によってコードされる。

【化74】

```

1  GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACTG
51  GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG CTCTGGCACC
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACCGGTGG
351 TGGAACCTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC
451 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
551 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC

```

20

30

【化75】

```

601 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGA CTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATGC
751 CGGGAGGAGA TGACCGAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG
801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
851 AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
901 TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
1001 AGGACAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGT ( 配列番号 142 )

```

40

50

【0468】

相補形態のALK4-Fc融合ポリペプチド（配列番号143）は、以下の通りであり、任意選択で、C末端からリジンを除去して提供され得る。

【化76】

```
1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTIVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQOPENNY
301 KTTTPVLDSR GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK ( 配列番号 143)
```

10

【0469】

リーダー配列およびリンカーに下線を付す。上の配列番号139および配列番号141のActRIIB-Fc融合ポリペプチドとのヘテロ二量体形成を導くために、4個のアミノ酸置換（チロシンをシステインで、スレオニンをセリンで、ロイシンをアラニンで、およびチロシンをバリンで置き換える）を、上に二重下線によって示されたようにALK4融合ポリペプチドのFcドメイン中に導入することができる。ALK4-Fc: ActRIIB-Fcヘテロ二量体の精製を容易にするために、2個のアミノ酸置換（アスパラギンをアルギニンで、およびアスパラギン酸をアルギニンで置き換える）を、上に二重下線で示されたようにALK4-Fc融合ポリペプチドのFcドメイン中に導入することもできる。配列番号143のアミノ酸配列は、任意選択で、C末端からリジンを除去して提供され得る。

20

【0470】

このALK4-Fc融合ポリペプチドは、以下の核酸（配列番号144）によってコードされる。

30

【化77】

```
1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
```

40

50

【化 7 8】

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
 151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCCGTGGA GACCGGTGGT GGAAGTCACA
 401 CATGCCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
 451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
 501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
 701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA
 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
 901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGCG GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG
 951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
 1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (配列番号 144)

10

20

30

【0 4 7 1】

成熟 A L K 4 - F c 融合ポリペプチド配列は以下の通りであり（配列番号 1 4 5）、任意選択で、C 末端からリジンを除去して提供され得る。

【化 7 9】

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIENLDGME HHVRTCIPKV
 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
 251 SCAVKGFYPS DIAVEWESRG QPENNYKTTP PVLDSRGSFF LVSKLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (配列番号 145)

40

【0 4 7 2】

この A L K 4 - F c 融合ポリペプチドは、以下の核酸（配列番号 1 4 6）によってコードされる。

50

【化 8 0】

1 TCCGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA CCAGCTGCCT

【化 8 1】

51 CCAGGCCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG GTTTCATT
 101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT CCCCAAAGTG
 151 GAGCTGGTCC CTGCCGGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT CGGAGGACCT
 201 GCGCAACACC CACTGCTGCT ACACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA
 251 GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGGC
 301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC
 351 TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCCAAGG
 401 ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
 451 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT
 501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA
 551 CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT
 601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT
 651 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT
 701 GCACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
 751 TCCTGCGCCG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
 801 GAGCCGCGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG
 851 ACTCCCGCGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC
 901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
 951 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTA

(配列番号 146)

【0473】

それぞれ、配列番号141および配列番号145のA c t R I I B - F cおよびA L K 4 - F cタンパク質を、CHO細胞系から同時発現させ、精製して、A L K 4 - F c : A c t R I I B - F cを含む異種複合体を生じさせることができる。

【0474】

様々なA L K 4 - F c : A c t R I I B - F c複合体の精製を、例えば、任意の順序で、以下のもの：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、エピトープに基づくアフィニティクロマトグラフィー（例えば、A L K 4またはA c t R I I B上のエピトープに対する抗体または機能的に等価なリガンドを用いる）、および多様なクロマトグラフィー（例えば、静電的リガンドと疎水性リガンドの両方を含む樹脂を用いる）のうちの3つまたはそれよりも多くを含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程によって達成することができた。精製を、ウイルス濾過および緩衝液交換によって完了することができた。

【0475】

実施例15. A c t R I I B - F cホモ二量体およびA L K 4 - F cホモ二量体と比較したA L K 4 - F c : A c t R I I B - F cヘテロ二量体のリガンド結合プロファイル

Biacore（商標）ベースの結合アッセイを使用して、上記で記載したALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体複合体のリガンド結合選択性を、ActRIIB-Fcホモ二量体複合体およびALK4-Fcホモ二量体複合体のリガンド結合選択性と比較した。ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体、ActRIIB-Fcホモ二量体、およびALK4-Fcホモ二量体を、抗Fc抗体を使用するシステムに独立に捕捉させた。リガンドを注入し、捕捉された受容体タンパク質上を流動させた。結果を、下記の表にまとめ、この表では、有効なリガンドトラップを最もよく示すリガンドのオフ速度（ k_d ）を、グレーの影で表示する。

【表 9】

ActRIIB-Fcホモ二量体およびALK4-Fcホモ二量体と比較した ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体のリガンド結合プロファイル									
リガンド	ActRIIB-Fc ホモ二量体			ALK4-Fc ホモ二量体			ALK4-Fc:ActRIIB-Fc ヘテロ二量体		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
アクチビン A	1.2×10^7	2.3×10^{-4}	19	5.8×10^5	1.2×10^{-2}	20000	1.3×10^7	1.5×10^{-4}	12
アクチビン B	5.1×10^6	1.0×10^{-4}	20	結合なし			7.1×10^6	4.0×10^{-5}	6
BMP6	3.2×10^7	6.8×10^{-3}	190	---			2.0×10^6	5.5×10^{-3}	2700
BMP9	1.4×10^7	1.1×10^{-3}	77	---			一過的*		3400
BMP10	2.3×10^7	2.6×10^{-4}	11	---			5.6×10^7	4.1×10^{-3}	74
GDF3	1.4×10^6	2.2×10^{-3}	1500	---			3.4×10^6	1.7×10^{-2}	4900
GDF8	8.3×10^5	2.3×10^{-4}	280	1.3×10^5	1.9×10^{-3}	15000 [†]	3.9×10^5	2.1×10^{-4}	550
GDF11	5.0×10^7	1.1×10^{-4}	2	5.0×10^6	4.8×10^{-3}	270 [†]	3.8×10^7	1.1×10^{-4}	3
* 相互作用の一過的性質のため中間的である † 非常に低いシグナル --- 試験せず									

【0476】

これらの比較結合データは、ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体が、ActRIIB-Fcホモ二量体またはALK4-Fcホモ二量体と比べて結合プロファイル／結合選択性の変更を有することを実証する。、ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体は、ホモ二量体と比較してアクチビンBへの結合の増強を提示し、ActRIIB-Fcホモ二量体について観察されるようなアクチビンA、GDF8、およびGDF11への強い結合を保持し、BMP9、BMP10、およびGDF3への結合の実質的な低減を呈示する。特に、BMP9は、ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体に対して低度のアフィニティを提示するか、または観察可能なアフィニティを提示しないが、このリガンドは、ActRIIB-Fcホモ二量体には強く結合する。ActRIIB-Fcホモ二量体と同様に、ヘテロ二量体は、BMP6への中レベルの結合を保持する。図19を参照。

【0477】

加えて、A-204レポーター遺伝子アッセイを使用して、ALK4-Fc:ActRIIB-Fcヘテロ二量体およびActRIIB-Fc:ActRIIB-Fcホモ二量体の、アクチビンA、アクチビンB、GDF11、GDF8、BMP10、およびBMP9

によるシグナル伝達に対する効果を評価した。細胞系：ヒト横紋筋肉腫（筋肉に由来する）である。レポーターベクター：pGL3 (CAGA) 12である（Dennlerら、1998年、EMBO、17巻：3091～3100頁において記載されている通り）。CAGA12モチーフは、TGF-β応答性遺伝子（PAI-1遺伝子）内に存在するので、このベクターは、Smad2および3を介してシグナル伝達する因子のために一般に使用される。例示的なA-204レポーター遺伝子アッセイを、下記に概括する。

1日目：A-204細胞を、48ウェルプレートに分注する。

2日目：A-204細胞に、10ugのpGL3 (CAGA) 12またはpGL3 (CAGA) 12 (10ug) + pRLCMV (1ug) およびFugeneをトランスフェクトする。

3日目：因子（培地+0.1%のBSAに希釈した）を添加する。阻害剤は、細胞に添加する前に約1時間にわたり因子と共にプレインキュベートする必要がある。約6時間後、細胞をPBSですすぎ、次いで、溶解させる。

【0478】

上記の工程の後、出願人は、ルシフェラーゼアッセイを実施した。

【0479】

このアッセイでは、ALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体およびActRIIB-Fc：ActRIIB-Fcホモ二量体のいずれも、アクチビンA、アクチビンB、GDF11、およびGDF8の強力な阻害剤であることが決定された。特に、図19に例示される比較ホモ二量体／ヘテロ二量体IC50データにおいて見ることができるように、ALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体は、ActRIIB-Fc：ActRIIB-Fcホモ二量体と同様にアクチビンA、アクチビンB、GDF8、およびGDF11シグナル伝達経路を阻害する。しかし、BMP9およびBMP10シグナル伝達経路のALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体による阻害は、ActRIIB-Fc：ActRIIB-Fcホモ二量体と比較して著明に低減した。このデータは、アクチビンA、アクチビンB、GDF8、およびGDF11に対しては、ALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体およびActRIIB-Fc：ActRIIB-Fcホモ二量体のいずれもが、強い結合を提示するが、BMP10およびBMP9は、ActRIIB-Fc：ActRIIB-Fcホモ二量体と比較してALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体に対して著明に低減されたアフィニティを有することを観察した上記で論じた結合データと符合する。

【0480】

したがって、まとめると、これらのデータは、ALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体が、ActRIIB-Fcホモ二量体と比較してアクチビンA、アクチビンB、GDF8、およびGDF11のより選択的なアンタゴニストであることを実証する。したがって、このような選択的アンタゴニズムが有利な特定の適用では、ALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体が、ActRIIB-Fcホモ二量体より有用である。例として、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAC、GDF8、およびGDF11のうちの1つまたは複数に対するアンタゴニズムは保持するが、BMP9、BMP10、GDF3、およびBMP6のうちの1つまたは複数に対するアンタゴニズムは最小化することが所望される治療適用が挙げられる。

【0481】

（実施例16）

マウスにおけるALK4-Fc：ActRIIB-Fcヘテロ二量体の抗腫瘍活性

出願人は、ホモ二量体ALK4-FcまたはActRIIB-Fc（上記参照）と比較して、リガンド結合プロファイルの変化を示す、ヘテロ二量体融合タンパク質ALK4-hFc：ActRIIB-hFcの潜在的な抗腫瘍活性を調査した。8週齢のBALB/cマウスを、処置に無作為に割り当て（n=10匹／群）、腫瘍埋込みの2日前に開始して、週に2回、ALK4-hFc：ActRIIB-hFc（5mg/kg）またはビヒクル（PBS、5ml/kg）で腹腔内処置した。0日目に、それぞれのマウスに、PBS

10

20

30

40

50

(100 μ L) 中に懸濁した 1×10^6 個の R L δ 1 (R L 雄 1) 細胞を皮下接種した。マウスへの接種後、体重および腫瘍体積を週に 2 回測定した。I A C U C 規則により、生存分析のために使用された終点は、2000 mm³ より大きい腫瘍体積、20% を超える体重減少、または後肢麻痺であった。

【0482】

試験の結果を、以下の表に示す。

【表 10】

被験物質	株	n	用量 (mg/kg)	経路	スケジュール	無腫瘍 (%) (41 日目)	中央 生存 (日)	ログランク 検定 (<i>P</i> 値)
ビヒクル	BALB/c	10	--	腹腔内	週 2 回	0	17	--
ALK4-hFc: ActRIIB-hFc	BALB/c	10	5	腹腔内	週 2 回	40	31	0.004

【0483】

ALK4-hFc : ActRIIB-hFc ヘテロ二量体を用いる処置は、ビヒクル処置されたマウスの 0 匹と比較して、41 日目に 10 匹のマウスのうちの 4 匹 (40%) において、無腫瘍状態をもたらした。ログランク検定における中央生存の増加および高い有意性 (表を参照されたい) はまた、ALK4-hFc : ActRIIB-hFc が、腫瘍担持マウスの生存を促進したことを示す。これらの結果は、ヘテロ二量体 ALK4-hFc : ActRIIB-hFc 融合タンパク質複合体が *in vivo* で抗腫瘍活性を有することを示している。

【0484】

まとめると、前記結果は、ホモ二量体 ActRIIA-Fc、ホモ二量体 ActRIIB-Fc、および異種 ALK4-Fc : ActRIIB-Fc 融合タンパク質複合体は、がんのげっ歯類モデルにおいて抗腫瘍活性を有することを示す。そのような活性は、少なくとも部分的には、T 細胞免疫の変化によって媒介されると考えられる。かくして、このデータは、ActRIIA アンタゴニストが、特に、がんを処置するための免疫腫瘍剤として、免疫活性を増加させることを必要とする患者における免疫活性を増加させるのに有用であり得ることを示す。

【0485】

(実施例 17)

マウス腫瘍モデルにおける、単独での、および PD1-PDL1 アンタゴニストと組み合わせた ActRIIA/B 抗体の抗腫瘍活性

出願人は、同系マウス白血病モデルにおける ActRIIA/B モノクローナル抗体の潜在的な抗腫瘍活性を調査した。7 週齢の BALB/c マウスを処置群に割り当て ($n = 10$ 匹/群)、ActRIIA/B 抗体 (10 mg/kg)、抗 PD1 抗体 (3 mg/kg)、ActRIIA/B 抗体と抗 PD1 抗体との組合せ (それぞれ、10 mg/kg と 3 mg/kg)、またはビヒクルのみ (PBS、5 ml/kg; 対照マウス) で腹腔内処置した。腫瘍埋込みの 2 日前に開始して、マウスを ActRIIA/B 抗体で処置し、その後、週に 2 回のペースで処置した。マウスを、腫瘍埋込み後、3、6、および 9 日目に抗 PD1 抗体で処置した。0 日目に、それぞれのマウスに、PBS (100 μ L) 中に懸濁した 1×10^6 個の R L δ 1 (R L δ 1) 細胞を皮下接種した。R L δ 1 は、BALB/c 起源の x 線誘導性白血病であり (Sato H ら、1973 年、J Exp Med 138 巻: 593~606 頁)、細胞は、MEX T、日本のナショナルバイオリソースプロジェクトを介して R I K E N B R C (バイオリソースセンター) 細胞バンクから得られたものであり、これらの試験における使用のためにサブクローニングされたものであった。マウスへの接種後、体重および腫瘍体積を週に 2 回測定した。カリパスを用いて得られた 2 次元測

定値から、腫瘍体積を算出した：腫瘍体積（ mm^3 ）＝（ $L \times W \times W$ ）／2（式中、 L および W は、それぞれ、腫瘍の長さおよび幅（ mm ）である）。地方のIACUC規則により、生存分析のために使用された終点は、 2000 mm^3 より大きい腫瘍体積、20%を超える体重減少、または後肢麻痺であった。

【0486】

以下の表に示されるように、組合せ療法は、いずれかの単剤療法よりも、がんの処置に対する驚くべき高い効果を有していた。

【表11】

被験物質	株	n	用量 (mg/kg)	経路	スケジュール	無腫瘍 (%) (34日目)	ログランク 検定 (P 値)
ビヒクル	BALB/c	10	--	腹腔内	週2回	0	--
ActRIIA/B mAb	BALB/c	10	10	腹腔内	週2回	20	0.06
PD1 mAb	BALB/c	10	3	腹腔内	3、6、9 日目	20	0.16
ActRIIA/B mAb + PD1 mAb	BALB/c	10	10; 3	腹腔内	週2回; 3、6、9 日目	60	0.0002

【0487】

それぞれの単剤療法は、がん処置に対する中程度の効果を示し、マウスの20%が34日目に無腫瘍であった（それに対して、ビヒクル群の全マウスが20日目までに最大腫瘍サイズに達した）。対照的に、ActRIIB/A mAbとPD-1 mAbとの組合せによる処置は、抗腫瘍活性の驚くべき有意な増加をもたらした。特に、組合せ療法は、34日目に60%のマウスに無腫瘍をもたらしたが、これは、その別々の効果の合計よりも高い。この型の相乗作用は一般に、個々の薬剤が異なる細胞機構を介して作用していることの証拠であると考えられる。腫瘍負荷に対する効果の増大はまた、組合せ療法を受けているマウスにおける生存時間の増大とも相関していた。34日目までに、ActRIIA/B mAbまたはPD1 mAbのいずれかを受けているマウスのわずか20%が生存していた。対照的に、ActRIIA/B mAbとPD1 mAbとの組合せ療法を受けているマウスの60%が、試験の34日目に依然として生存していた。

【0488】

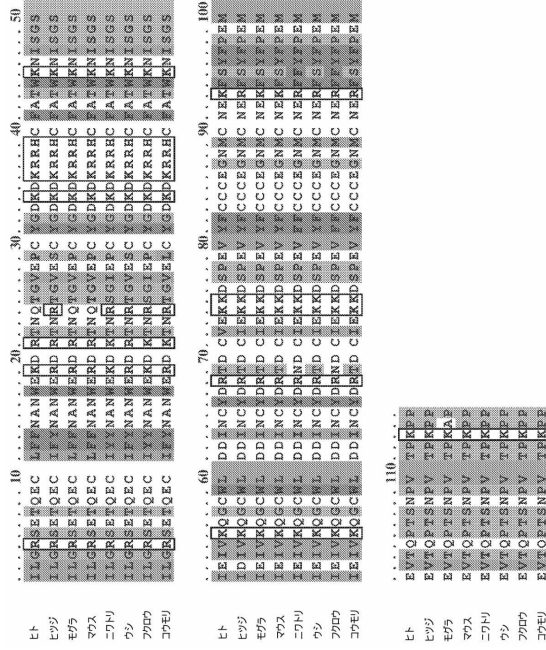
したがって、このデータは、ActRIIまたはPD1-PDL1シグナル伝達経路のいずれかの阻害が、がんの処置において有用であり得るが、両方の経路の阻害を使用して、抗腫瘍活性の増加が望ましいそのような実験または臨床状況において抗腫瘍活性を相乗的に増大させることができることを示している。例えば、補完的であるが、明確ではない機構により作用して、ActRIIアンタゴニストとの同時処置により、より低用量のPD1-PDL1アンタゴニストについて抗腫瘍効果を得ることができ、それによって、より高レベルのPD1-PDL1アンタゴニストと関連する潜在的な有害副作用または他の問題を回避することができる。かくして、このデータは、がんおよび腫瘍を処置するために、ActRIIアンタゴニストを単独で使用するだけでなく、特に、他の免疫療法剤と組み合わせて使用することができることを示している。

【0489】

参照による組み込み

本明細書に記載の全ての刊行物および特許は、あたかもそれぞれ個々の刊行物または特許が具体的かつ個別的に参照により組み込まれると示されたかのように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図 3】



【図 4】

FIGURE 3

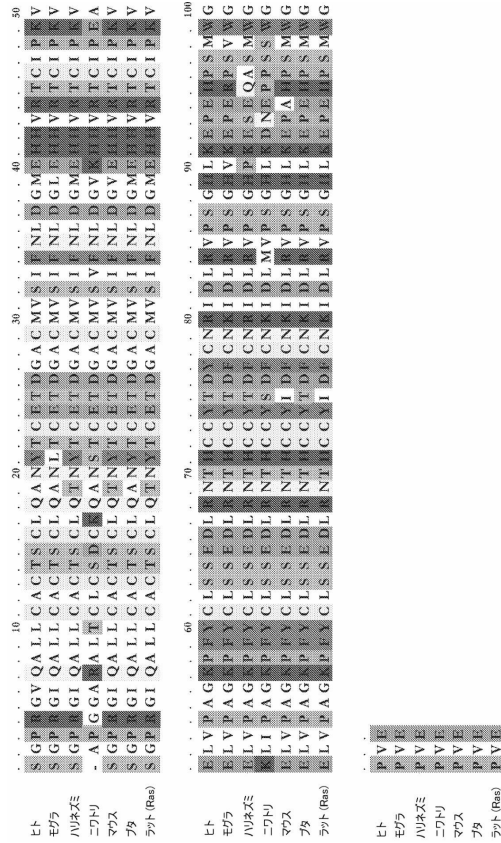


FIGURE 4

【図 5】

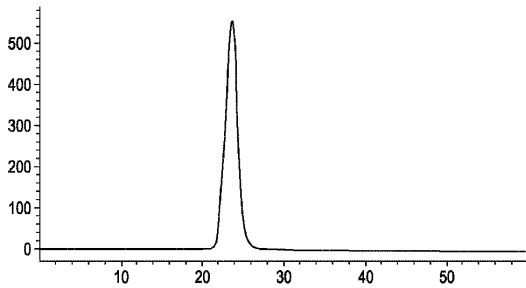


FIGURE 5

【図 6】

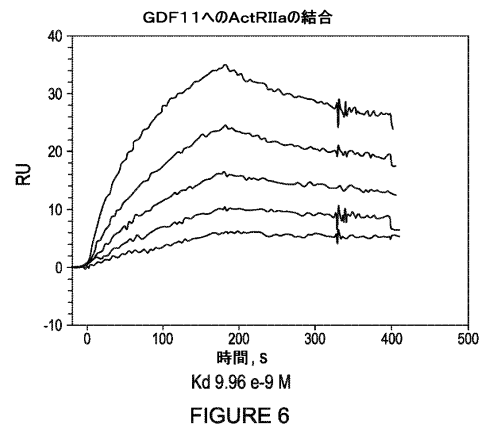
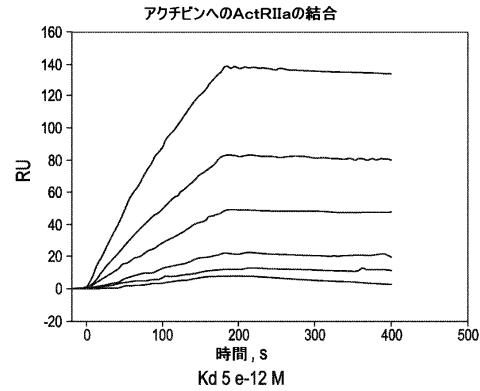


FIGURE 6

【図 7】

1	MDAMKRLCC VLLCGAVFV SFGAA	TREC IYYNANWELE RTNQSLERC
51	EGEQKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL	DDFNCYDRQE CVATEENFQV
101	YFCCEGNFC NERFTHLPEA GPEVTIYEP	PTGGGTHTCP PCAPPELLGG
151	PSVFLFPPKP KDTLMISRT	P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
201	KTKPREQYN STYRVSVLT	V L H Q D W I N G K E Y K C K V S N K A L E A P I E K T I S
251	KAKQPREPQ VYTLPSREE	M T K N Q V S L I C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
301	ENNYKTTPPV LDSGSEFFLY	S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
351	QKSLSPGK (配列番号 123)	

FIGURE 7

【図 8 A】

1	ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
	TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA	CACGACGACG ACACACCTCG
	A E T R E C I Y Y	
51	AGTCTTCGTT TCGCCCGCGG CCGCTGAGAC	ACGGAGATGC ATCTACTACA
	TCAGAAGCAA AGCGGGCGCG GCGACTCTG	TGCCCTCAGG TAGATGATGT
	N A N W E L E R T N Q S G L E R C	
101	ACGCCAATCG GGAGCTGGAG CGACCAACCC	AGAGCCGCGT GGAGCGCTGC
	TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG	TCTCGCCGGA CCTCGCGACG
	E G E Q D K R L H C Y A S W R N S	
151	GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACCTG	TACGCTCTCT GGCGCAACAG
	CTCCGCTCG TCTGTTCGCG CACACTGACG	ATGCGGAGGA CCGGTTGTCT
	S G T I E L V K K G C W L D D F	
201	CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG	CTGCTGGCTA GATGACTTCA
	GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC	SACGACCGAT CTACTGAAGT
	N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V	
251	ACTGCTACGA TAGGACAGAG TGTGTGGCCA	CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
	TGACGATGCT ATCGTCTCTC ACACACCGGT	GACTCTCTTT GGGGTTCCAC
	Y F C C C E G N F C N E R F T H L	
301	TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CACTTCTGCT	AACGAGCGCT TCACTCAATT
	ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAGACG	TGCTCGCGA AGTGAATAA
	P E A G G P E V T Y E P P P T	
351	GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA	CGAGCCACCC CCGACAGGTG
	CGGTCTCCGA CCCCCTGGGC TTCAGTGAT	GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC
401	GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCGAG	CACCTGAATC CCGGGGGGA
	CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC	GTGGACTTGA GGACCCCTCT
451	CGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAACCC	AAGGACACCC TCATGATCTC
	GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG	TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
501	CGGACCCCT GAGGTACAT CCGTGGTGGT	GGACGTGAGC CACGAAGACC
	GGCCTGGGGA CTCAGTGTA CGCACCAACA	CCTGCACCTG GTGCTTCTGG
551	CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGAGC	GCGTGGAGGT GCATATGCCC
	GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC	CGCACCTCCA CGTATTACGG
601	AAGACAAAGC CGGGGAGGA GCAGTACAA	AGCAGTACC GTGTGGTCAG
	TTCTGTTTCG GCGCCCTCT CACTGATTTG	TGCTGCTGCG CACACAGCTC
651	CGTCTCTCAC GTCTGCAAC AGGACTGGCT	GAATGGCAAG GAGTACAACT
	GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCTTGACCGA	CTTACCGTTC CTCATGTTCA
701	GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCGACGCC	CGATCGAGAA AACCATCTCC
	CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG	GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
751	AAAGCCAAAG GGCAGCCCGG AGAACACAG	GTGTACACC TGCCCCATC
	TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG	CACATGTGGG ACGGGGGTAG

FIGURE 8A

【図 8 B】

801	CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTACG	CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
	GGCCCTCTCT TACTGGTTCT TGGTCCAGTC	GGACTGGACG GACCAGTTTC
851	GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
	CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA	CCCTCTCGTT ACCGCTCGGC
901	GAGAACAAC	ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG
	ACGGCTCCTT CTCTTGTGTA TGTTCGTGGT	CGGAGGGGAC GACCTGAGGC
	TGCCGAGGAA	
951	CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
	GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT	CTCGTCCACC GTCGTCCCTT
1001	ACGTCTTCTC ATGCTCCGCG ATGCATGAGG	CTCTGCACAA CCACTACAGC
	TGCAGAAAG TACGAGGCAC TACGTACTCC	GAGACGTGTT GGTGATGTG
1051	CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGGTAAA	TGA (配列番号 124)
	GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT	ACT (配列番号 125)

FIGURE 8B

【図 9 A】

1	ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
	TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA	CACGACGACG ACACACCTCG
	A E T R E C I Y Y	
51	AGTCTTCGTT TCGCCCGCGG CCGCTGAGAC	ACGGAGATGC ATCTACTACA
	TCAGAAGCAA AGCGGGCGCG GCGACTCTG	TGCCCTCAGG TAGATGATGT
	N A N W E L E R T N Q S G L E R C	
101	ATGCCAATCG GGAGCTGGAG CGACCAACCC	AGAGCCGCGT GGAGCGCTGC
	TACGATTAC CCTTGAGCTT GCGTGGTTGG	TCTCGCCGGA GCTTGCACA
	E G E Q D K R L H C Y A S W R N S	
151	GAGGGGAGC AGGATAAACG CCGTCACTGC	TATGCTCTGT GAGCAACTGC
	CTCCCGCTTG TCTGTTCGCG GAGGTAAGG	ATACGGAGGA CCGGTTGTCT
	S G T I E L V K K G C W L D D F	
201	CTCTGGCACC ATGACTCTCG TGAAGAAGGG	GTGCTGGCTA GAGCAATTCA
	GAGGCCCTGC TACTTGAACC AGTCTCTTCC	CACGACCGAC CTGCTAAGT
	N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V	
251	ATGTGATAGA CCGGAGGAA TGTGTGGCCA	CGAAGAGAA TCCGAGGTG
	TAACAATACT GCGGTCCTT ACACACGCT	GGCTTCTCTT AGGCTCCAG
	Y F C C C E G N F C N E R F T H L	
301	TATTTCTGCT GTTGGAGGG GAATTTCTGT	AATGAACGGT TTACCAAGCT
	ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA	TTACTTGCCA AATGGGTGA
	P E A G G P E V T Y E P P P T	
351	CGCGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA	TGAACCGCCG CCGACGGTG
	GGGCTTGGG CCGCCCGGGC TCCACTGAT	ACTTGGGGGG GGGTGGCCAC
401	GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCGAG	CACCTGAATC CCGGGGGGA
	CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC	GTGGACTTGA GGACCCCTCT
451	CGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAACCC	AAGGACACCC TCATGATCTC
	GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG	TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
501	CGGACCCCT GAGGTACAT CCGTGGTGGT	GGACGTGAGC CACGAAGACC
	GGCCTGGGGA CTCAGTGTA CGCACCAACA	CCTGCACCTG GTGCTTCTGG
551	CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGAGC	GCGTGGAGGT GCATATGCCC
	GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC	CGCACCTCCA CGTATTACGG
601	AAGACAAAGC CGGGGAGGA GCAGTACAA	AGCAGTACC GTGTGGTCAG
	TTCTGTTTCG GCGCCCTCT CACTGATTTG	TGCTGCTGCG CACACAGCTC
651	CGTCTCTCAC GTCTGCAAC AGGACTGGCT	GAATGGCAAG GAGTACAACT
	GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCTTGACCGA	CTTACCGTTC CTCATGTTCA
701	GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCGACGCC	CGATCGAGAA AACCATCTCC
	CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG	GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
751	AAAGCCAAAG GGCAGCCCGG AGAACACAG	GTGTACACC TGCCCCATC
	TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG	CACATGTGGG ACGGGGGTAG

FIGURE 9A

10

20

30

40

50

【図 9 B】

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC AACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTGA TGTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGGCAGGAA

951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (配列番号 126)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (配列番号 127)

【図 10】

1 MDAMKRGLOC VLLLCGAVFV SPGAS~~SG~~RGEA ETRECIYYNA NWELERTNOS

51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCW~~DD~~DFNC YDROECVATE

101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC

151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

251 APIEKTISKA KGQPREPOVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV

301 EWESNGQPEN NYKTTTPFVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSMH

351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (配列番号 128)

10

FIGURE 10

20

FIGURE 9B

【図 11 A】

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG SCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
TCAGAAACAA AGCGGGGCGC GGAGACCCGC ACCCTCCGA CTCGTGCCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCTGGAGC GGTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
CCGGACCTCG CGACGCTTCC SCTCGTCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
GAGGACCGCG TTGTGAGAGC CTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCGCCACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
CCTACTACT GAAGTTGAGC ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 CGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCGGGAAGTC ACGTACGAGC
CGCAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCG GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451 CCAGCACCTG AACTCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAAA
GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTC ACATGCGTGG
TGGGTTCCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
CTGCCGACCC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCTCGTCA

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTCG CACCAGGACT
GTGTCTGTGC ATGGCACACC AGTCGACGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTGTA

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCACAA AGCCCTCCCA
CGACTTACC TTTCTCATG TTCACGTTC AGAGGTTSTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
CGGGGGTAGC TCTTTTGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

FIGURE 11A

【図 11 B】

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
CGGGGGTAGC TCTTTTGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

801 ACAGGTCTAC ACCCTGCCCC CATCCCCGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
AGTCGGACTG GACGGACCCG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGAGAAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
CTCACCTCT CTGTACCCGT CGGCCCTTGG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGACGAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTATGCAT
TGTCTCTGTC CACCGTCGTC CCCTTGACGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
CTCCGAGACG TGTGTGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGGCC

1101 TAAATGA (配列番号 129)
ATTTACT (配列番号 130)

30

FIGURE 11B

40

50

【図 12】

1 MDAMKRGGLCC VLLICGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (配列番号 131)

FIGURE 12

【図 13】

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWD DDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WINGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQFENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 132)

FIGURE 13

【図 14】

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWD DDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (配列番号 133)

FIGURE 14

【図 15 A】

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTTGGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGAGC ACACACCTCG
E T R E C I Y Y
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGAGTGTC ATCTACTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGACTCTG TGCCCTCAGC TAGATGATGT
N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAACCTG GGAGCTGGAG CGACCAACCC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGA CCTCGCGAGC
E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCTCCT GGCGCAACAG
CTTCCGCTCG TCCTGTTCCG CGACGTGAGC ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC
S G T I E L V K K G C W D D D F
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCCTG CTAATGAGT
N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
TGACGATGCT ATCCGTCTCT ACACACCGGT GACTCTCTCT GGGGTCAC
Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACCTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA
P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCACCC CCGACAGGTG
CGGCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC
401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCGC CACCTGAACCT CTGGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT
451 CGTCACTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG
501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGAGTGAGC CACGAAGACC
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGACACCA CTTGACTCG GTGCTTCTGG
551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGACCTTCA CGTATTACGG

FIGURE 15A

【図 15 B】

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCAGGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCGACCTGCG CTGGTCAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC AACAAGACC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTGTTGA TGTCTGGTG CGAGGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (配列番号 134)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (配列番号 135)

FIGURE 15B

【図 16 A】

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGAGC ACACACCTCG

E T R E C I Y Y

51 AGCTCTGGTT TCGGCCGGCG CGCGCGAAGC CCGCAATGC ATTATATACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCGCG GCGGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C

101 ATGCTAATG GGAATCGAA CGACCAACC AATCCGCTT CCAACGCTGT
TACGATTAAC CTTGAGCTT GCTGCTTGG TTAGGCCCA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S

151 GAGGGGAC AGGAATAAC CCGCAATGC TATGCTGCTT GAGCAACTC
CTCCCTCTG TCTATTTCG GGAGTAACG ATACCGACA CTTCTGTAG

S G T I E L V K K G C W D D D F

201 CTCGGGACG ATGGAATCG TGAAGAAAG GTGCTGGGAC GAGCAATTC
GAGGCCCTG TAACCTGACC AGTCTTCTC CAGGACCTG CTGTAAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V

251 ATGCTAATG CCGCCAGGAA TGTGTGCGA CCGAGAGAA TCCCGAGGT
TAACAATACT GCGGCTCTT ACACAGCGCT GCTTCTCTT AGGCTCCAG

Y F C C C E G N F C N E R F T H L

301 TATTTCTCTT GTTGGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGT TTACCACTT
ATAAGACAA CAACCTCCC CTTAAGACA TTACTTGCA AATGGGTGA

P E A G G P E V T Y E P P T

351 CCCGAAAGC GGGGGCCG AGTGAACGA TGAACCCCG CCAACGGTG
GGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCACTGAT ACTTGGGGG GGTGGGAC

401 GTGGAATCA CACATGCCA CCGTGGCCG CACCTGAAT CTTGGGGGA
CACCTTGAT GTGTACGGT GGCAGGGCT GTGGAATCA GGACCCCC

451 CGTCAGTCT TCCTCTCCG CCAAAACC AAGGACACC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAAGG GGGTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GGTGGTGGT GGCTGTAGC CAGGAAGACC
GGCTGGGA CTCCAGTGA CCGACACCA CTGCACTCG GTGCTTCTG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTG TACGTGGAG GGTGGAGGT GCATAATGC
GACTCCAGT CAAGTTGACC ATGACCTCG CCGACCTCA CATTATACG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCAGGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCTTC CTCATGTTCA

FIGURE 16A

【図 16 B】

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCGACCTGCG CTGGTCAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC AACAAGACC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTGTTGA TGTCTGGTG CGAGGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (配列番号 136)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (配列番号 137)

FIGURE 16B

【図 17】

GAAAC CCGGATGT ATTTATACA ATGCAATG GGAATCGA CGACCAAC

ATTCGGCT GGAACGTG GAGGGGAC AGGAATAAC CCGCAATGC TATGCTCTCT

GGGCAACTC CTCGGGACG ATGGAATCG TGAAGAAAG GTGCTGGGAC GAGCAATTC

ATGCTAATG CCGCCAGGAA TGTGTGCGA CCGAGAGAA TCCCGAGGT TATTTCTCTT

GTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGT TTACCACTT CCGCAATGC GCGGGCCCG

AGGTACCTA TGAACCCCG CCAAC (配列番号 138)

FIGURE 17

10

20

30

40

50

【図 18】

IgG1 -----THTCPCECPAPELLGGPSVFLFPPKPKGLTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53
 IgG4 ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKGLTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 57
 IgG2 -----YECPECPAPPVAG-PSVFLFPPKPKGLTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 51
 IgG3 BPKCCDTFFPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKGLTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 60

IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGHEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
 IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGHEYKCKVSNKALPAPIEKT 117
 IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGHEYKCKVSNKALPAPIEKT 111
 IgG3 KNYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGHEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTINQVSVLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 173
 IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTINQVSVLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 177
 IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTINQVSVLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 171
 IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTINQVSVLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 180

IgG1 FVLLSLGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
 IgG4 FVLLSLGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 229
 IgG2 FVLLSLGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
 IgG3 FVLLSLGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 232

FIGURE 18

【図 20】

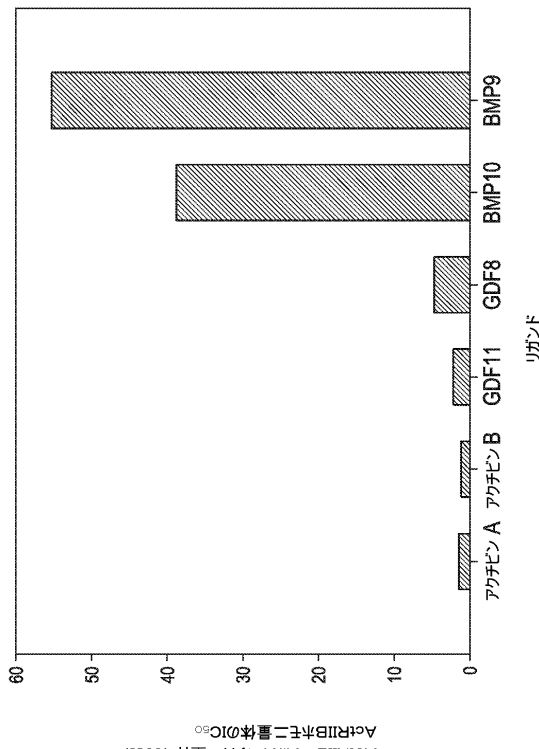


FIGURE 20

【図 19】

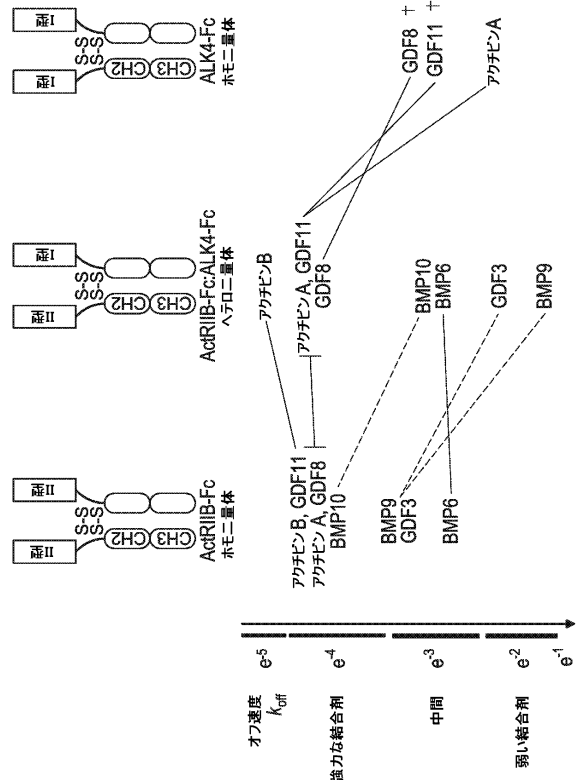


FIGURE 19

【図 21】

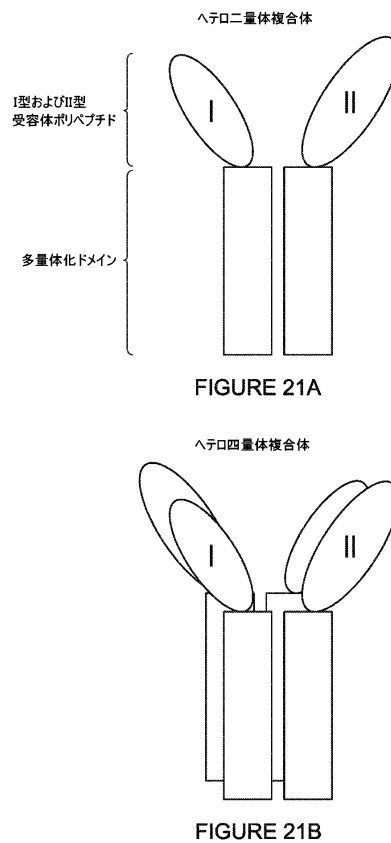


FIGURE 21A

FIGURE 21B

10

20

30

40

50

【図 2 2】

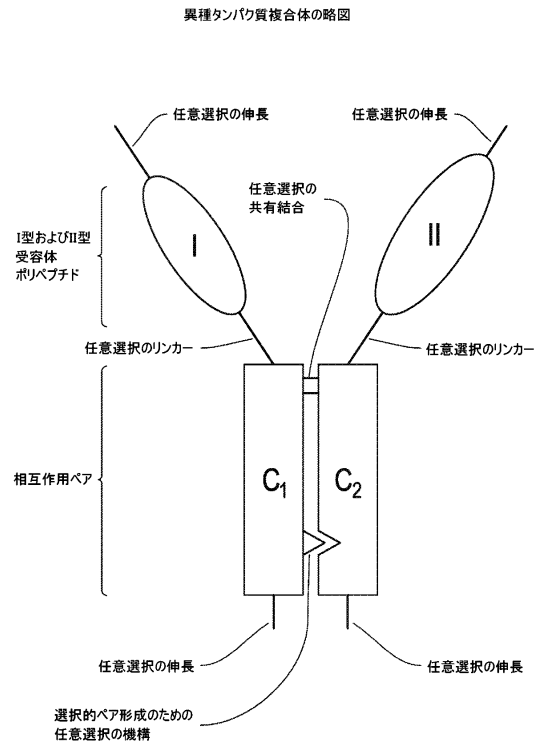


FIGURE 22

【図 2 3 A】

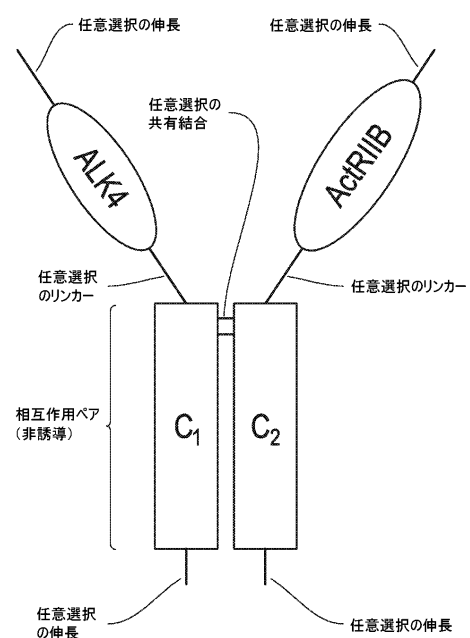


FIGURE 23A

【図 2 3 B】

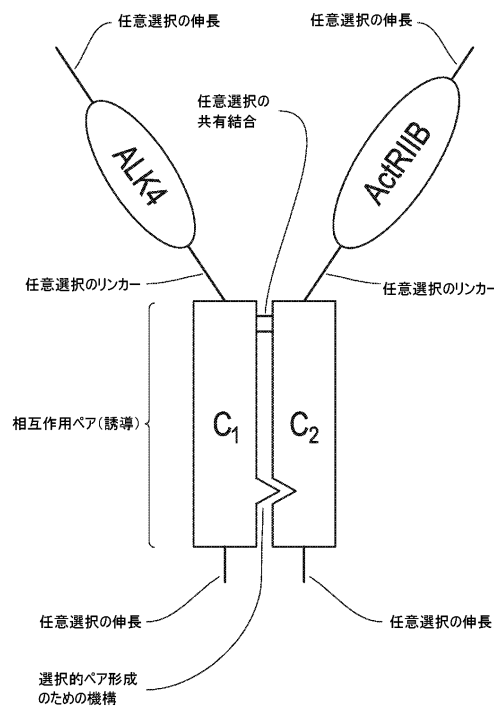


FIGURE 23B

【図 2 3 C】

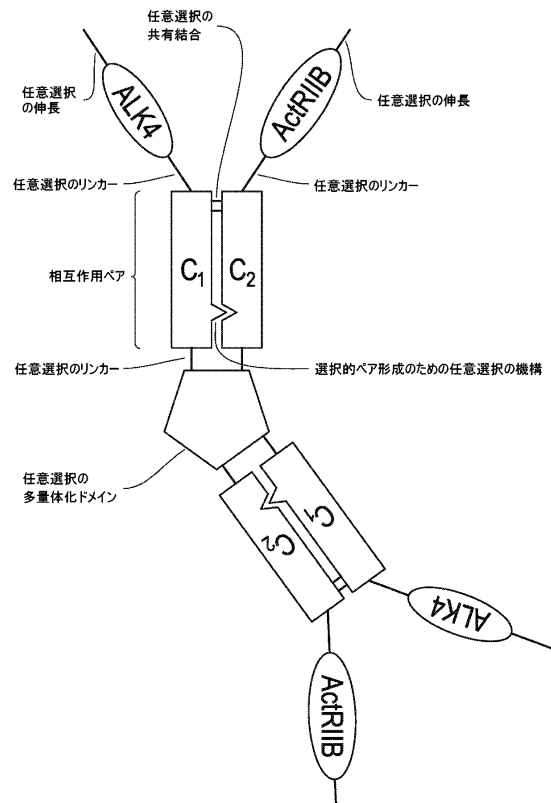


FIGURE 23C

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54
C 0 7 K	14/555 (2006.01)	C 0 7 K	14/555
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/21
		C 0 7 K	19/00

D

(72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02482, ウェルスレイ, ハイ レッジ アベニュー 15
 ピアーソル, ロバート スコット
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01864, ノース リーディング, ウィンターベリー レ
 ーン 8

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献

特表2010-518006 (JP, A)
 国際公開第2014/172448 (WO, A2)
 特表2015-525230 (JP, A)
 特表2013-504589 (JP, A)
 国際公開第2012/027065 (WO, A2)
 国際公開第2016/090035 (WO, A2)
 米国特許出願公開第2014/0072558 (US, A1)
 欧州特許出願公開第2594280 (EP, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38/00-38/58
 A 6 1 K 39/00-39/44
 A 6 1 P 35/00-35/04
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)