

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-519291

(P2020-519291A)

(43) 公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 5/12 (2006.01)	C 12 N 5/12	4 B 06 4
C 07 K 14/47 (2006.01)	C 07 K 14/47 Z N A	4 B 06 5
C 12 N 15/12 (2006.01)	C 12 N 15/12	4 C 07 6
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00	4 C 08 4
C 07 K 16/00 (2006.01)	C 07 K 16/00	4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-562409 (P2019-562409)	(71) 出願人	507159304 シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2421 レキシントン シャイアー ウ エイ 300
(86) (22) 出願日	平成30年5月11日 (2018.5.11)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	令和2年1月7日 (2020.1.7)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/032332	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 国際公開番号	W02018/209242	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 国際公開日	平成30年11月15日 (2018.11.15)		
(31) 優先権主張番号	62/505,642		
(32) 優先日	平成29年5月12日 (2017.5.12)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/618,376		
(32) 優先日	平成30年1月17日 (2018.1.17)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組み換えフォリスタチン-FC融合タンパク質およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療における使用

## (57) 【要約】

本発明は、とりわけ筋ジストロフィー、特に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の治療のための方法および組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明による方法は、DMDの少なくとも1つの症状または特徴の強度、重症度、もしくは頻度が低減するように、あるいはその開始が遅延するように、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量を、DMDに罹患している、またはDMDに感受性がある個人に投与することを含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸の配列を含む組み換えフォリスタチンポリペプチドであって、前記組み換えフォリスタチンタンパク質が、ヘパリン結合配列 (H B S) を有し、かつ前記 H B S 内の 1 つ以上のアミノ酸が、置換されたアミノ酸と比較してより少ない正電荷を有するアミノ酸で置換されている、組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 2】**

前記 H B S 内の前記 1 つ以上のアミノ酸が、中性電荷を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。 10

**【請求項 3】**

前記 H B S 内の前記 1 つ以上のアミノ酸が、負電荷を有するアミノ酸で置換されている、請求項 1 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 4】**

前記 1 つ以上が少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 5】**

前記 1 つ以上が 3 個のアミノ酸を含む、請求項 4 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。 20

**【請求項 6】**

前記組み換えポリペプチドが、自然発生のフォリスタチンと比較して減少したヘパリン結合親和性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 7】**

前記 H B S 中の前記アミノ酸置換の数を増加させることが、ヘパリン結合親和性を漸進的に減少させる、請求項 6 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 8】**

前記 H B S 内の前記アミノ酸置換の数が 2 個のアミノ酸である、請求項 7 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。 30

**【請求項 9】**

前記 H B S 内の前記アミノ酸置換の数が 3 個のアミノ酸である、請求項 8 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 10】**

前記アミノ酸置換が、前記 H B S ドメインのアミノ酸残基 81 ~ 84 によって特定される B B X B モチーフ内で行われる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 11】**

前記アミノ酸置換が、前記 H B S ドメインのアミノ酸残基 75 ~ 78 によって特定される B B X B モチーフ内で行われる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。 40

**【請求項 12】**

前記最初の 2 つの塩基性アミノ酸残基が、負電荷を有するかまたは中性のアミノ酸残基で置換されている、請求項 10 または 11 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 13】**

前記最初の 2 つの塩基性アミノ酸残基が、負電荷を有するアミノ酸残基で置換されている、請求項 12 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

**【請求項 14】**

前記組み換えフォリスタチンタンパク質が B M P - 9 または B M P - 10 と結合しない 50

、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 15】

前記組み換えフォリスタチンタンパク質が、配列番号 12 ~ 40 または配列番号 101 ~ 106 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80 % 同一である配列を有する、請求項 1 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 16】

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸の配列を含み、

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 の 66 ~ 88 位に対応する前記アミノ酸が、配列番号 42 ~ 67 または配列番号 111 ~ 116 のうちのいずれか 1 つと同一である  
10  
、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 の 66 ~ 88 位に対応するアミノ酸の配列が、配列番号 58 ~ 67 または配列番号 111 ~ 113 のうちのいずれか 1 つと同一である、請求項 16 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 18】

前記組み換えフォリスタチンポリペプチドが高グリコシル化変異体である、請求項 17 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸の配列を含み、  
20

C 66 S、C 66 A、G 74 N、K 75 E、K 75 N、K 76 A、K 76 D、K 76 S  
、K 76 E、C 77 S、C 77 T、R 78 E、R 78 N、N 80 T、K 81 A、K 81 D  
、K 82 A、K 82 D、K 81 E、K 82 T、K 82 E、K 84 E、P 85 T、R 86 N  
、V 88 E、および V 88 T またはそれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸変異のうちのいずれか 1 つを含む、組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 20】

前記アミノ酸の配列が、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 16 または 19 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 21】

前記アミノ酸の配列が、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 95 % 同一である、請求項 16 または 19 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。  
30

【請求項 22】

前記アミノ酸の配列が、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 98 % 同一である、請求項 16 または 19 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 23】

前記アミノ酸の配列が、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と 100 % 同一である、請求項 16 または 19 に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチド。

【請求項 24】

配列番号 12、配列番号 17 ~ 30、および配列番号 32 ~ 40 からなる群から選択されるアミノ酸の配列を含む、組み換えフォリスタチンポリペプチド。  
40

【請求項 25】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のフォリスタチンポリペプチドおよび IgG Fc ドメインを含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

【請求項 26】

フォリスタチンポリペプチドおよびヒト IgG Fc ドメインを含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質であって、

前記組み換えフォリスタチンポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸の配列を含み、

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 の 66 ~ 88 位に対応する前記アミノ酸が  
50

、配列番号 4 1、4 2、4 3、または 5 8 と同一である、組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 27】**

前記組み換えフォリスタチンポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸の配列を含む、請求項 26 に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 28】**

前記組み換えフォリスタチンポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸の配列を含む、請求項 26 に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

10

**【請求項 29】**

前記組み換えフォリスタチンポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸の配列を含む、請求項 26 に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 30】**

前記組み換えフォリスタチンポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 5 と 100 % 同一であるアミノ酸の配列を含む、請求項 26 に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

20

**【請求項 31】**

フォリスタチンポリペプチドおよび Ig G Fc ドメインを含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質であって、

前記フォリスタチンポリペプチドが、配列番号 12、配列番号 13、および配列番号 15 ~ 配列番号 40 からなる群のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸の配列を含む、組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

30

**【請求項 32】**

前記 Ig G Fc ドメインがアミノ酸置換を含む、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質であって、

前記アミノ酸置換が、E U ナンバリングに従い、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、H 4 3 3 K、N 4 3 4 F およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

30

**【請求項 33】**

前記 Ig G Fc ドメインが配列番号 6 のアミノ酸の配列を含む、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質であって、

前記アミノ酸の配列が、E U ナンバリングに従い、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、H 4 3 3 K、N 4 3 4 F およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む、組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

40

**【請求項 34】**

前記 Ig G Fc ドメインが、配列番号 7 ~ 配列番号 11 からなる群から選択されるアミノ酸の配列を含む、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 35】**

前記 Ig G Fc ドメインがヒト Ig G Fc ドメインである、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 36】**

前記 Ig G Fc ドメインが Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、または Ig G 4 Fc ドメインである、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 37】**

配列番号 73 ~ 配列番号 100、配列番号 117、または配列番号 118 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸の配列を含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

50

**【請求項 3 8】**

前記タンパク質が、1～100 pMの親和性解離定数( $K_D$ )でミオスタチンに結合する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 3 9】**

前記タンパク質が、1～100 pMの親和性解離定数( $K_D$ )でアクチビンAに結合する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 4 0】**

前記タンパク質が、0.2 nM～25 nMの範囲の骨形態形成タンパク質-9(BMP-9)および/または骨形態形成タンパク質-10(BMP-10)に結合しない、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。 10

**【請求項 4 1】**

前記タンパク質が、0.1～25 nM超の親和性解離定数( $K_D$ )でヘパリンに結合する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 4 2】**

前記タンパク質が、25～400 nMの親和性解離定数( $K_D$ )でFcRn受容体に結合する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 4 3】**

タンパク質が0.1～10 nMのIC<sub>50</sub>でミオスタチンを阻害する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。 20

**【請求項 4 4】**

タンパク質が0.1～10 nMのIC<sub>50</sub>でアクチビンAを阻害する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質。

**【請求項 4 5】**

前記組み換えフォリスタチントンパク質融合タンパク質が、野生型フォリスタチンと比較して増加した半減期を有する、請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチントンパク質融合タンパク質。

**【請求項 4 6】**

請求項25～45のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。 30

**【請求項 4 7】**

請求項1～24のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

**【請求項 4 8】**

請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

**【請求項 4 9】**

請求項47または48に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

**【請求項 5 0】**

請求項47もしくは48に記載のポリヌクレオチド、または請求項30に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。 40

**【請求項 5 1】**

請求項50に記載の宿主細胞を培養することを含む、ミオスタチンに特異的に結合する組み換えフォリスタチン融合タンパク質を作製する方法。

**【請求項 5 2】**

請求項1～17のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチンポリペプチドまたは請求項25～37のいずれか1項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質を產生するハイブリドーマ細胞。

**【請求項 5 3】**

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)を治療する方法であって、

10

20

30

40

50

D M D の少なくとも 1 つの症状もしくは特徴の強度、重症度、または頻度が低減するか、またはそれらの開始を遅延させるように、請求項 2 5 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質または請求項 3 8 に記載の医薬組成物の有効量を、D M D に罹患しているか、または D M D に感受性がある対象者に投与することを含む、方法。

【請求項 5 4】

前記方法が、1 つ以上の追加的治療薬を対象者に投与することをさらに含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 1 つ以上の追加的治療薬が、抗 F 1 t - 1 抗体またはその断片、エダサロネキセント、パムレブルマブ、プレドニゾン、デフラザコート、R N A 調節治療薬、エクソンスキッピング治療薬、および遺伝子治療からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量が非経口的に投与される、請求項 5 3 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記非経口的投与が、静脈内、皮内、髄腔内、吸入、経皮（局所的）、眼内、筋肉内、皮下、経粘膜投与、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

20

【請求項 5 8】

前記非経口的投与が静脈内投与である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、静脈内投与で約 1 m g / k g ~ 5 0 m g / k g である、請求項 5 3 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、静脈内投与で約 8 m g / k g ~ 1 5 m g / k g である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 8 m g / k g である、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 1 0 m g / k g である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 5 0 m g / k g である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記静脈内投与が月に 1 回行われる、請求項 5 8 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記非経口的投与が皮下投与である、請求項 5 7 に記載の方法。

40

【請求項 6 6】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で約 2 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k g である、請求項 5 3 ~ 5 8 、または請求項 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で約 3 m g / k g ~ 3 0 m g / k g である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で約 2 m g / k

50

g ~ 5 m g / k g である、請求項 6 7 に記載の方法。

**【請求項 6 9】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 2 m g / k g である、請求項 6 8 に記載の方法。

**【請求項 7 0】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 3 m g / k g である、請求項 6 9 に記載の方法。

**【請求項 7 1】**

組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 3 0 m g / k g である、請求項 7 0 に記載の方法。 10

**【請求項 7 2】**

前記皮下投与が週に 1 回行われる、請求項 6 6 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7 3】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の投与が、用量に比例している、請求項 5 7 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

**【請求項 7 4】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の投与が、用量直線的である、請求項 5 7 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7 5】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質が、表 1 から選択される 1 つ以上の骨格筋に送達される、請求項 5 3 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

**【請求項 7 6】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記投与が、対照に対して筋肉量の増加をもたらす、請求項 5 3 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7 7】**

前記筋肉が、表 1 から選択される 1 つ以上の骨格筋である、請求項 7 6 に記載の方法。

**【請求項 7 8】**

前記筋肉が、横隔膜、三頭筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、腓腹筋、長指伸筋、腹直筋、四頭筋、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 7 に記載の方法。 30

**【請求項 7 9】**

前記筋肉が腓腹筋である、請求項 7 8 に記載の方法。

**【請求項 8 0】**

前記筋肉量の増加が、対照に対して少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 % または 5 0 0 % の増加である、請求項 7 6 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8 1】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記投与により、筋肉再生、筋力の増加、柔軟性の増加、可動域の増加、スタミナの増加、易疲労性の低減、血流の増加、認知の改善、肺機能の改善、炎症の抑制、筋線維症の低減、筋壊死の低減、および / または体重の増加がもたらされる、請求項 5 3 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

**【請求項 8 2】**

D M D の前記少なくとも 1 つの症状または特徴が、筋消耗、筋力低下、筋脆弱性、筋壊死、筋線維症、関節拘縮、骨格変形、心筋症、嚥下障害、腸・膀胱機能障害、筋虚血、認知機能障害、行動機能障害、社会化障害、脊柱側弯、および呼吸機能障害からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8 3】**

対象者内のミオスタチンおよび / またはアクチビンを阻害する方法であって、

請求項 2 5 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量を含む組成物を対象者に投与することを含む、方法。

**【請求項 8 4】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、静脈内投与で約 1 m g / k g ~ 5 0 m g / k g である、請求項 8 3 に記載の方法。

**【請求項 8 5】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、静脈内投与で約 8 m g / k g ~ 1 5 m g / k g である、請求項 8 4 に記載の方法。

**【請求項 8 6】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 8 m g / k g である、請求項 8 5 に記載の方法。

**【請求項 8 7】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 1 0 m g / k g である、請求項 8 6 に記載の方法。 10

**【請求項 8 8】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 5 0 m g / k g である、請求項 8 7 に記載の方法。

**【請求項 8 9】**

前記静脈内投与が月に 1 回行われる、請求項 8 4 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9 0】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で約 2 m g / k g ~ 1 0 0 m g / k g である、請求項 8 3 に記載の方法。

**【請求項 9 1】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で約 3 m g / k g ~ 3 0 m g / k g である、請求項 9 0 に記載の方法。 20

**【請求項 9 2】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で約 2 m g / k g ~ 5 m g / k g である、請求項 9 0 に記載の方法。

**【請求項 9 3】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 2 m g / k g である、請求項 9 2 に記載の方法。

**【請求項 9 4】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が少なくとも約 3 m g / k g である、請求項 9 3 に記載の方法。 30

**【請求項 9 5】**

前記組み換えフォリスタチン融合タンパク質の前記有効量が、皮下投与で少なくとも約 3 0 m g / k g である、請求項 9 1 に記載の方法。

**【請求項 9 6】**

前記皮下投与が週に 1 回行われる、請求項 9 0 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 8 年 1 月 1 7 日出願の米国特許仮出願第 6 2 / 6 1 8 , 3 7 6 号および 2 0 1 7 年 5 月 1 2 日出願の米国仮出願第 6 2 / 5 0 5 , 6 4 2 号の優先権および利益を主張するものであり、そのそれぞれの内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。 40

**【背景技術】**

**【0 0 0 2】**

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) は X 染色体連鎖劣性障害であり、これは、3 6 0 0 人に 1 人の男性が出生時に罹患していると推定され、世界中で 5 0 , 0 0 0 人が罹患していると推定される。本障害は進行性の筋消耗を特徴とし、罹患している小児は 1 3 歳に達するまでに車椅子が必要となる。罹患者は通常 3 歳で症状を呈し、そのような患

者の生存期間中央値は 25 ~ 30 歳である。横隔膜の衰弱および心筋症に起因する呼吸不全が一般的な死亡原因である。

#### 【0003】

DMD は、ジストロフィン遺伝子の突然変異によって引き起こされる。ジストロフィン遺伝子は X 染色体上に位置し、タンパク質ジストロフィンをコード化する。ジストロフィンタンパク質は、筋纖維の収縮機構（アクチン - ミオシン複合体）を、ジストログリカン複合体を通して周囲の細胞外基質に連結する責任を有する。ジストロフィン遺伝子の変異は、ジストロフィンタンパク質の改変または欠如のいずれかおよび異常な筋線維膜機能をもたらす。男性と女性との両方がジストロフィン遺伝子に変異を持つ可能性があるが、女性は DMD に罹患することは稀である。

10

#### 【0004】

DMD の 1 つの特徴は、罹患組織の虚血である。虚血は、組織または器官への血液供給の制限または減少であり、細胞代謝に必要な酸素および栄養素の不足を引き起こす。虚血は、一般的に血管の狭窄または閉塞によって引き起こされ、その結果、組織または器官の損傷または機能不全がもたらされる。虚血の治療は、罹患組織または器官への血流の増加へと方向付けられる。

#### 【0005】

現在、DMD の治療法はない。遺伝子治療およびコルチコステロイド投与を含むいくつかの治療手段が調査されたが、DMD 患者に対する代替治療法の必要性が依然として存在する。

20

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明は、とりわけ、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質の投与に基づく DMD の治療のための改善された方法および組成物を提供する。本発明は、とりわけ、フォリスタチンポリペプチドにおけるある特定のアミノ酸修飾が、高い親和性を有するミオスタチンおよびアクチビン A を特異的に標的とし、かつ非標的 BMP またはヘパリンに意義のある親和性で結合しない改善されたフォリスタチンタンパク質をもたらすという予想外の観察を包含する。ミオスタチンおよびアクチビン A による Smad 2 / 3 経路の活性化が、筋原性タンパク質発現の阻害につながり、結果として筋芽細胞は筋肉へと分化しないと考えられる。したがって、ミオスタチンおよびアクチビンは、筋肉再生の刺激のために実行可能な標的である。しかしながら、フォリスタチン（「FS」）を含むミオスタチンおよびアクチビン拮抗薬は、ある特定の構造的類似性に起因して骨形成タンパク質（BMP）に結合することができる。BMP、特に BMP-9 および BMP-10 は、身体全体を通じた組織構造を編成する中心的な形態形成シグナルである。こうした BMP の阻害は、望ましくない病的状態につながる場合がある。フォリスタチンはまた、3 つの FS ドメインのうち最初において、塩基性ヘパリン結合配列（HBS）を通して細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンにも結合する。ヘパリン結合の不活性化、低減、または調節が、フォリスタチンの in vivo 曝露および / または半減期を増加し得ると考えられる。それゆえに、本発明は、半減期がより長く、かつ DMD の効果的な治療に対してより強力な改善されたフォリスタチンを提供する。

30

#### 【0007】

一態様では、本発明は、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、または配列番号 5 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸の配列を含み、組み換えフォリスタチンタンパク質が、ヘパリン結合ドメイン（HBS）を有し、かつ HBS 内の 1 つ以上のアミノ酸が、置換されたアミノ酸と比較して正電荷がより少ないアミノ酸で置換された、組み換えフォリスタチンポリペプチドを提供する。一実施形態では、HBS 内の 1 つ以上のアミノ酸は、中性電荷を有するアミノ酸で置換される。一実施形態では、HBS 内の 1 つ以上のアミノ酸は、陰電荷を有するアミノ酸で置換される。一実施形態では、1 つ以上は、少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、または 10 個のアミノ酸を含む。一実

40

50

施形態では、1つ以上は、少なくとも3個のアミノ酸を含む。一実施形態では、組み換えポリペプチドは、自然発生のフォリスタチンと比較して減少したヘパリン結合親和性を有する。一実施形態では、HBS内のアミノ酸置換の数を増加させることは、ヘパリン結合親和性を漸進的に減少させる。一実施形態では、HBS内のアミノ酸置換の数は2アミノ酸である。一実施形態では、HBS内のアミノ酸置換の数は3アミノ酸である。一実施形態では、アミノ酸置換は、HBSドメインのアミノ酸残基81～84によって特定されるBBXBモチーフ内で作製される。一実施形態では、アミノ酸置換は、HBSドメインのアミノ酸残基75～78によって特定されるBBXBモチーフ内で作製される。一実施形態では、最初の2つの塩基性アミノ酸残基は、陰性に荷電した、または中性のアミノ酸残基で置換される。一実施形態では、最初の2つの塩基性アミノ酸残基は、陰性に荷電したアミノ酸残基で置換される。

10

#### 【0008】

一実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質はBMP-9またはBMP-10に結合しない。一実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質は、配列番号12～40または配列番号101～106のうちのいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を有する。

20

#### 【0009】

一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも80%同一であるアミノ酸の配列を含む、組み換えフォリスタチントンパク質を提供し、配列番号2、配列番号4、または配列番号5の66～88の位置に対応するアミノ酸は、配列番号42～67または配列番号111～116のいずれか1つと同一である。いくつかの実施形態では、配列番号2、配列番号4、または配列番号5の位置66～88に対応するアミノ酸は、配列番号58～67または配列番号111～113のうちのいずれか1つと同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質は、高グリコシル化変異体である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と100%同一である。

30

#### 【0010】

一態様では、本発明は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも80%同一であるアミノ酸の配列を含み、かつC66S、C66A、G74N、K75E、K75N、K76A、K76D、K76S、K76E、C77S、C77T、R78E、R78N、N80T、K81A、K81D、K82A、K82D、K81E、K82T、K82E、K84E、P85T、R86N、V88E、およびV88Tまたはそれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸変異のうちのいずれか一つを含む、組み換えフォリスタチントンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも98%同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質のアミノ酸の配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と100%同一である。

40

#### 【0011】

一態様では、本発明は、配列番号12、配列番号17～30、および配列番号32～40からなる群から選択されるアミノ酸の配列を含む組み換えフォリスタチントンパク質

50

を提供する。

【0012】

一態様では、本発明は、組み換えフォリスタチンポリペプチドおよびIgG Fcドメインを含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質を提供する。

【0013】

一態様では、本発明は、フォリスタチンポリペプチドおよびヒトIgG Fcドメインを含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質を提供し、組み換えフォリスタチンポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも80%同一であるアミノ酸の配列を含み、かつ配列番号2、配列番号4、または配列番号5の66～88の位置に対応するアミノ酸は、配列番号41、42、43または58と同一である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも90%同一であるアミノ酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも95%同一であるアミノ酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と少なくとも98%同一であるアミノ酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号5と100%同一であるアミノ酸の配列を含む。

10

【0014】

一態様では、本発明は、フォリスタチンポリペプチドおよびIgG Fcドメインを含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質を提供し、前記フォリスタチンポリペプチドは、配列番号12、配列番号13、および配列番号15～配列番号40からなる群のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸の配列を含む。

20

【0015】

いくつかの実施形態では、IgG Fcドメインは1つのアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、E U ナンバーリングに従い、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、H 4 3 3 K、N 4 3 4 F、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0016】

いくつかの実施形態では、IgG Fcドメインは配列番号6のアミノ酸の配列を含み、アミノ酸の配列は、E U ナンバーリングに従い、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、H 4 3 3 K、N 4 3 4 F、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸置換を含む。

30

【0017】

いくつかの実施形態では、IgG Fcドメインは、配列番号7～配列番号11からなる群から選択されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、IgG Fcドメインは、ヒトIgG Fcドメインである。いくつかの実施形態では、IgG Fcドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fcドメインである。

【0018】

一態様では、本発明は、配列番号73～配列番号100のうちのいずれか1つのアミノ酸の配列を含む組み換えフォリスタチン融合タンパク質を提供する。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、1～100 pMの親和性解離定数( $K_D$ )でミオスタチンに結合する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、1～100 pMの親和性解離定数( $K_D$ )でアクチビンAに結合する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、0.2 nM～25 nMの範囲の骨形態形成タンパク質-9(BMP-9)および/または骨形態形成タンパク質-10(BMP-10)に結合しない。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、0.1～200 nMの親和性解離定数( $K_D$ )でヘパリンに結合する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、25～400 nMの親和性解離定数( $K_D$ )でFc受容体に結合する。

【0020】

50

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、0.1～10nMのIC<sub>50</sub>でミオスタチンを阻害する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、0.1～10nMのIC<sub>50</sub>でアクチビンを阻害する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチントンパク質融合タンパク質は、野生型フォリスタチンと比較して半減期の増加を有する。

#### 【0021】

一態様では、本発明は、組み換えフォリスタチン融合タンパク質および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0022】

一態様では、本発明は、組み換えフォリスタチンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0023】

一態様では、本発明は、組み換えフォリスタチン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む。

#### 【0024】

一態様では、本発明は、宿主細胞を培養することによってミオスタチンおよびアクチビンAに特異的に結合する組み換えフォリスタチン融合タンパク質を作製する方法を提供する。

#### 【0025】

一態様では、本発明は、組み換えフォリスタチンポリペプチドまたは組み換えフォリスタチン融合タンパク質を産生するハイブリドーマ細胞を提供する。

#### 【0026】

一態様では、本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)を治療する方法を提供し、方法は、DMDの少なくとも1つの症状または特徴の強度、重症度、もしくは頻度が低減するように、またはその開始が遅延するように、組み換えフォリスタチン融合タンパク質または組み換えフォリスタチン融合タンパク質を含む医薬組成物の有効量を、DMDに罹患している、またはDMDに感受性がある対象者に投与することを含む。

#### 【0027】

いくつかの実施形態では、方法は、対象者に1つ以上の追加的な治療薬を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加的な治療薬は、抗F1t-1抗体またはその断片、エダサロネキセント、パムレブルマブプレドニゾン、デフラザコート、RNA調節治療薬、エクソシンスキッピング治療薬、および遺伝子治療からなる群から選択される。

#### 【0028】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量を非経口的に投与する。いくつかの実施形態では、非経口的投与は、静脈内、皮内、髄腔内、吸入、経皮(局所的)、眼内、筋肉内、皮下、経粘膜投与、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、非経口的投与は静脈内投与である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、静脈内投与で約1mg/kg～50mg/kgである。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、静脈内投与で約8mg/kg～15mg/kgである。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約8mg/kgである。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約10mg/kgである。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約50mg/kgである。いくつかの実施形態では、静脈内投与は月に1回行われる。いくつかの実施形態では、非経口投与は皮下投与である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、皮下投与で約2mg/kg～100mg/kgである。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、皮下投与で約 3 mg / kg ~ 30 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、皮下投与で約 2 mg / kg ~ 5 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 2 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 3 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 30 mg / kg である。いくつかの実施形態では、皮下投与は、週に 1 回、週に 2 回、または週に 3 回行われる。いくつかの実施形態では、皮下投与は、週に 1 回行われる。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の投与は、用量に比例している。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の投与は、用量直線的である。

10

#### 【0029】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、表 1 から選択される 1 つ以上の骨格筋に送達される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の投与は、対照に対して筋肉量の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、筋肉は、表 1 から選択される 1 つ以上の骨格筋である。いくつかの実施形態では、筋肉は、横隔膜、三頭筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、腓腹筋、長指伸筋、腹直筋、四頭筋、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、筋肉は腓腹筋である。いくつかの実施形態では、筋肉量の増加は、対照に対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、150 %、200 %、または 500 % の増加である。

20

#### 【0030】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の投与は、筋肉再生、筋力の増加、柔軟性の増加、可動域の増加、スタミナの増加、易疲労性の低減、血流の増加、認知の改善、肺機能の改善、炎症の抑制、筋線維症の低減、筋壊死の低減、および / または体重の増加をもたらす。

30

#### 【0031】

いくつかの実施形態では、DMD の少なくとも 1 つの症状または特徴は、筋消耗、筋力低下、筋脆弱性、筋壊死、筋線維症、関節拘縮、骨格変形、心筋症、嚥下障害、腸・膀胱機能障害、筋虚血、認知機能障害、行動機能障害、社会化障害、脊柱側弯、および呼吸機能障害からなる群から選択される。

40

#### 【0032】

一態様では、本発明は、対象者内のミオスタチンおよび / またはアクチビンを阻害する方法を提供し、方法は対象者の筋肉に、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量を含む組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、静脈内投与で約 1 mg / kg ~ 50 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、静脈内投与で約 8 mg / kg ~ 15 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 8 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 10 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 50 mg / kg である。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、月に 1 回行われる。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、皮下投与で約 2 mg / kg ~ 100 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、皮下投与で約 3 mg / kg ~ 30 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、皮下投与で約 2 mg / kg ~ 5 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 2 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の有効量は、少なくとも約 3 mg / kg である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン融合タンパク質の

50

有効量は、皮下投与で少なくとも約 30 mg / kg である。いくつかの実施形態では、皮下投与は、週に 1 回、週に 2 回、または週に 3 回行われる。いくつかの実施形態では、皮下投与は、週に 1 回行われる。

#### 【0033】

図面は、例示の目的のためのみのものであり、限定を目的としない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0034】

【図 1】図 1 は FS 315 のタンパク質ドメイン構造を示す概略図である。FS 315 は N 末端ドメイン (ND)、高い相同性を有する 3 つの連続的 FS ドメイン (FSD1、FSD2、および FSD3)、および強酸性 C 末端尾部 (AD) から成る。ヘパリン結合部位 (HBS) は FSD1 内に位置し、かつ 2 つの保存された塩基性ヘパリン結合コアモチーフが太字で示されている。3 つの内因性 N - 結合型グリコシル化部位の定置は実線の三角形で示されている。10

【図 2】図 2 は、組み換えフォリスタチン構築物の in vivo 細胞ベースの機能的アッセイの結果を示す一連のグラフを示す。A 204 横紋筋肉腫細胞における SMAD2 / 3 ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して、ミオスタチンおよびアクチビン A に対する阻害が調査された。図 2 のパネル A は、代表的な FS 315 - hFc バリアントに対するミオスタチンおよびアクチビン A の IC50 曲線を示す。単一、二重、および三重突然変異は機能的活性には影響を与えたかったが、HBS de175 - 86 バリアントは効力が大幅に低減していた。図 2 のパネル B は、代表的な FS 315 - hFc 高グリコシル化 (hyperglycosylation) バリアントに対するミオスタチンおよびアクチビン A の IC50 曲線を示す。3 つの高グリコシル化バリアント、K75N / C77T / K82T、C66A / K75N / C77T、および C66S / K75N / C77T は、効力の中等度の低減を有した。20

【図 3 A】図 3 A は、例示的な組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質または比較基準タンパク質である FS 315 WT - hFc を投与された CD - 1 マウスにおける血清 PK プロファイルを図示する例示的な結果を示す。

【図 3 B】図 3 B は、例示的な組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質または比較基準タンパク質である FS 315 WT - hFc を投与された CD - 1 マウスにおける血清 PK プロファイルを図示する例示的な結果を示す。30

【図 4 A】図 4 A は、組み換えフォリスタチン構築物のヘパリン結合親和性が PK 特性と関することを実証するグラフである。図 4 A に示すデータは、マウス (n = 3) に対する各ヘパリン結合バリアントの 1 mg / kg の単一の静脈内投与から得られた。図 4 A は、FS 315 - Fc バリアントの 1 mg / kg の単一の静脈内投与後の血漿中濃度対時間を示す。PK プロファイルは、ヘパリン結合親和性の減少が PK 挙動の漸進的な改善と関することを示す。

【図 4 B】図 4 B は、組み換えフォリスタチン構築物のヘパリン結合親和性が PK 特性と関することを実証するグラフである。図 4 B に示すデータは、マウス (n = 3) に対する各ヘパリン結合バリアントの 1 mg / kg の単一の静脈内投与から得られた。図 4 B は、FS 315 - hFc バリアントのヘパリン結合親和性、およびそれらの血清クリアランスとの相関関係を示す。ヘパリン結合親和性の減少は、in vivo クリアランスの減少をもたらす。40

【図 5 A】図 5 A は、高グリコシル化 FS バリアントならびに結果としてもたらされる分子量および P I のシフトに関するゲルおよびグラフをそれぞれ示す。図 5 A は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離された、低減した FS 315 - hFc 高グリコシル化バリアントのクマシープルー染色ゲルを示す。矢印は、高グリコシル化に起因する MW の明確なシフトを示すバリアントを示す。

【図 5 B】図 5 B は、高グリコシル化 FS バリアントならびに結果としてもたらされる分子量および P I のシフトに関するゲルおよびグラフをそれぞれ示す。図 5 B は、2 つの代表的なバリアントに対する cIEF プロファイルを示すグラフを示す。高グリコシル化変異50

体 K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T は、非高グリコシル化バリアント K 8 2 T と比較して明確な酸性シフトを示す。

【図 6】図 6 は、F S 3 1 5 - h F c 高グリコシル化バリアントに対するプロファイルを示すグラフである。マウスに、静脈内投与 (n = 3 / 群) によって 1 mg / kg のタンパク質の単回投与を行った。高グリコシル化バリアント K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T および C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T は、非高グリコシル化バリアント K 8 2 T、ならびに野生型よりも p P K プロファイルの著しい改善を有した。

【図 7】図 7 は、野生型マウスの握力と比較した、P B S 溶媒、10 mg / kg の F S 3 1 5 K (76, 81, 82) E - m F c、または 3 mg / kg の A c t R I I B - m F c で治療された m d × マウスの前肢の握力を示すグラフである。前肢の握力は投与から 11 週間後に測定した。データは、溶媒単独で治療されたマウスの握力と比較して、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) E - m F c で治療された m d × マウスの前肢の握力が有意に増加したことを見た。

【図 8 A】図 8 A は、F S 3 1 5 - h F c ヘパリン結合バリアントに対するヘパリン結合領域内の配列を示す。野生型、コア H B S 置換バリアント H B S、コア H B S 欠失バリアント d e l 7 5 - 8 6、および 2 つの塩基性 B B X B モチーフにおいて点突然変異を有する一連のバリアントに対するヘパリン結合領域における残基 7 3 ~ 8 8 の配列を表にリストする。

【図 8 B】図 8 B は、F S 3 1 5 - h F c 高グリコシル化バリアントに対するヘパリン結合領域内の配列を示す。1つまたは 2 つのコンセンサス N - グリコシル化部位 (N X T / S) を作り出す高グリコシル化バリアントの残基 6 6 ~ 8 8 の配列を表にリストする。コアヘパリン結合配列は斜体で示されている。突然変異した残基は太字で示され、また作り出された新しい N - グリコシル化部位は下線付きで示されている。

【図 9 - 1】図 9 - 1 のパネル A ~ D は、4 週間の C 5 7 B L / 6 マウス研究からの体重、筋肉重量、血清薬物濃度、および形態計測分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 9 - 1 のパネル A は、F S - E E E - m F c の投与からの体重を示すグラフである。図 9 - 1 のパネル B は、F S - E E E - m F c の投与からの筋肉重量を示すグラフである。図 9 - 1 のパネル C は、投与直前に採取した血清試料からの F S - E E E - m F c 濃度を示すグラフである。図 9 - 1 のパネル D は、F S - E E E - h F c の投与から 28 日目における体重変化を示すグラフである。

【図 9 - 2】図 9 - 2 のパネル E は、4 週間の C 5 7 B L / 6 マウス研究からの体重、筋肉重量、血清薬物濃度、および形態計測分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 9 - 2 のパネル E は、F S - E E E - h F c の投与からの筋肉重量を示すグラフである。

【図 9 - 3】図 9 - 3 のパネル F ~ G は、4 週間の C 5 7 B L / 6 マウス研究からの体重、筋肉重量、血清薬物濃度、および形態計測分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 9 - 3 のパネル F は、四頭筋の Oregon Green (登録商標) 488 W G A 染色による四頭筋形態計測分析を示す一連の顕微鏡写真である。図 9 - 3 のパネル G は、筋線維直径のヒストグラムを示すグラフである。\* 溶媒投与群と比較して p < 0.05。

【図 10 - 1】図 10 - 1 のパネル A ~ D は、m d × 四頭筋の免疫組織化学染色および q P C R 分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 10 - 1 のパネル A は、溶媒対照からの不均質壞死区域を示すマウス Ig G 陽性染色の代表的な画像を示し、図 10 - 1 のパネル B は、すべての用量群のスライド画像解析全体を示すグラフである。図 10 - 1 のパネル C は、溶媒対照からのマクロファージ浸潤に対する C D 6 8 陽性染色の代表的な画像を示し、図 10 - 1 のパネル D は、全体スライド画像解析を示すグラフである。

【図 10 - 2】図 10 のパネル E ~ G は、m d × 四頭筋の免疫組織化学染色および q P C R 分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 10 - 2 のパネル E は、線維症のコラーゲン I 陽性染色を示す一連の顕微鏡写真である：(左) 溶媒対照、および(右) 30 mg / kg F S - E E E - m F c。図 10 - 2 のパネル F は、コラーゲン I の全体画

10

20

30

40

50

像解析を示すグラフである。図 10 - 2 のパネル G は、線維症および炎症マーカーの qPCR を示すグラフである。

【図 11 - 1】図 11 - 1 のパネル A ~ E は、12 週間の運動をしなかった md × 研究からの体重、筋肉重量、筋繊維サイズ、握力、および血清バイオマーカーを示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 11 - 1 のパネル A は、体重を示すグラフである。図 11 - 1 のパネル B は、筋肉重量を示すグラフである。図 11 - 1 のパネル C は、四頭筋の大脛直筋区域を示すグラフである。図 11 - 1 のパネル D は、四頭筋の Oregon Green (登録商標) 488 WGA 染色を示す、溶媒群からの例の顕微鏡写真である。図 11 - 1 のパネル E は、筋線維直径サイズ分布の四頭筋形態計測分析ヒストグラムを示すグラフである。

【図 11 - 2】図 11 - 2 のパネル F ~ G は、12 週間の運動をしなかった md × 研究からの体重、筋肉重量、筋繊維サイズ、握力、および血清バイオマーカーを示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 11 - 2 のパネル F は、前肢の握力を示すグラフである：(左) 絶対値および(右) 体重に対して正規化。図 11 - 2 のパネル (G) は、血清バイオマーカー(左) クレアチニンキナーゼ、(中央) 骨格トロポニン 1、(右) 心筋トロポニン 1 を示すグラフである。\* = p < 0.05 md × 溶媒投与群と比較。

【図 12 - 1】図 12 - 1 のパネル A ~ C は、md × 横隔膜の免疫組織化学染色および qPCR 分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 12 - 1 のパネル A は、CD 68 陽性染色の画像解析を示すグラフである。図 12 - 1 のパネル B は、コラーゲン I 陽性染色の画像解析を示すグラフである。図 12 - 1 のパネル C は、コラーゲン I 染色された横隔膜の代表的な拡大画像を示す顕微鏡写真である：(左) 溶媒対照および(右) 30 mg / kg の FS - EEE - mFc。

【図 12 - 2】図 12 - 2 のパネル D は、md × 横隔膜の免疫組織化学染色および qPCR 分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 12 - 2 のパネル D は、qPCR 炎症および線維症マーカーを示すグラフである。\* = p < 0.05 md × 溶媒投与群と比較。

【図 13 - 1】図 13 - 1 のパネル A ~ C は、12 週間の運動をした md × 試験からの、体重、組織重量、機能的測定値、行動測定値、および 1 血清分析を示す一連のグラフである。図 13 - 1 のパネル (A) は体重を表し、(B) は筋肉重量を示し、(C) は臓器重量を示す。

【図 13 - 2】図 13 - 2 のパネル D ~ F は、12 週間の運動をした md × 試験からの、体重、組織重量、機能的測定値、行動測定値、および 1 血清分析を示す一連のグラフである。図 13 - 2 のパネル D は、前肢の握力(上) および体重に対して正規化された値(下) を示す。図 13 - 2 のパネル E は、EDL 筋肉(上) および断面積に対して正規化された(下) ex vivo 力を示す。図 13 - 2 のパネル F は、強制トレッドミル距離(上) および体重に対して正規化された値(下) を示す。

【図 13 - 3】図 13 - 3 のパネル G ~ H は、12 週間の運動をした md × 試験からの、体重、組織重量、機能的測定値、行動測定値、および 1 血清分析を示す一連のグラフである。図 13 - 3 のパネル (G) は、56 日目にサンプリングされた血清クレアチニンキナーゼ測定値を示し、(H) は血清薬物濃度を示す。\* = p < 0.05 記載のように md × 溶媒投与群と比較。

【図 14 - 1】図 14 - 1 のパネル A ~ C は、12 週間の運動をした md × 研究からの四頭筋組織分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 14 - 1 のパネル A ~ C は、(上) 溶媒対照および(中央) 30 mg / kg FS - EEE - mFc からの代表的な画像、ならびに(下) パネル (A) 壊死に対するマウス IgG 陽性染色、パネル (B) マクロファージ浸潤に対する CD 68 陽性染色、およびパネル (C) 線維症に対するコラーゲン I 陽性染色に関する全体スライド画像解析である。

【図 14 - 2】図 14 - 2 のパネル D は、12 週間の運動をした md × 研究からの四頭筋組織分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図 14 - 2 のパネル D は、炎症および線維症マーカーの qPCR を示す。\* = p < 0.05 md × 溶媒投与群と比較。

10

20

30

40

50

【図15-1】図15-1のパネルA～Cは、12週間の運動をしたm d ×試験からの横隔膜組織分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。パネルA～Cは、(上)溶媒対照および(中央)30mg/kg F S - E E E - m F cからの代表的な画像、ならびに(下)パネル(A)壊死に対するマウスIgG陽性染色、パネル(B)マクロファージ浸潤に対するCD68陽性染色、およびパネル(C)線維症に対するコラーゲンI陽性染色に関する全体スライド画像解析を示す。

【図15-2】図15-2のパネルDは、12週間の運動をしたm d ×試験からの横隔膜組織分析を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。パネル(D)は、炎症および線維症マーカーのqPCRを示す。 $* = p < 0.05$  m d ×溶媒投与群と比較。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0035】

###### 定義

本発明がより容易に理解されるように、最初にいくつかの用語を以下に定義する。以下の用語およびその他の用語に対するさらなる定義は、本明細書全体を通して説明される。

##### 【0036】

親和性：当技術分野で公知のように、「親和性」は、特定のリガンドがそのパートナーと結合する堅固さの尺度である。いくつかの実施形態では、リガンドまたはパートナーは、組み換えフォリスタチンポリペプチドである。いくつかの実施形態では、リガンドまたはパートナーは、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質である。親和性は、異なる方法で測定することができる。いくつかの実施形態では、親和性は、定量的アッセイによって測定される。いくつかのこうした実施形態では、結合パートナー濃度は、生理学的条件を模倣するために、リガンド濃度を超えるように固定されてもよい。代替的または追加的に、いくつかの実施形態では、結合パートナー濃度および/またはリガンド濃度は変化し得る。いくつかのこうした実施形態では、親和性は、同等の条件(例えば、濃度)下で参照と比較されてもよい。

##### 【0037】

改善：本明細書で使用される場合、「改善」という用語は、状態の予防、低減もしくは緩和、または対象者の状態の改善を意味する。改善には、病状の完全な回復または完全な防止が含まれるが、これを必要とはしない。

##### 【0038】

動物：本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階のヒト以外の動物を指す。ある特定の実施形態では、ヒト以外の動物は哺乳類(例えば、齶歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、靈長類、および/またはブタ)である。いくつかの実施形態では、動物としては哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚、昆虫および/または虫が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、遺伝子導入動物、遺伝子操作された動物、および/またはクローンであってもよい。

##### 【0039】

およそまたは約：本明細書で使用される場合、1つ以上の目的の値に適用される場合、「およそ」または「約」という用語は、定められた参照値と類似の値を指す。ある特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段の定めのない限りまたは文脈からそうでないことが明らかでない限り(こうした数字が可能な値の100%を超えることになる場合を除く)を除いて、定められた参照値のいずれかの方向(それより大きい、または小さい)に25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に収まる値の範囲を指す。

##### 【0040】

関連付けられる：この用語が本明細書で使用される場合、2つの事象または実体は、一方の存在、レベル、および/または形態がもう一方のものに相關する場合、互いに「関連

10

20

30

40

50

付けられる」。例えば、特定の実体（例えば、ポリペプチド）は、その存在、レベル、および／または形態が（例えば、関連性のある集団にわたって）疾患、障害、または病状の発生率および／または感受性と相關する場合、特定の疾患、障害、または病状と関連付けられたと見なされる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体は、それらが相互に物理的近接の状態にあり、かつその状態を保持するように、それらが直接的または間接的に相互作用する場合、相互に物理的に「関連付けられる」。いくつかの実施形態では、相互に物理的に関連付けられている2つ以上の実体は、相互に共有結合しており、いくつかの実施形態では、相互に物理的に関連付けられている2つ以上の実体は、相互に共有結合されていないが、例えば、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁気、およびそれらの組み合わせによって非共有的に関連付けられる。

10

#### 【0041】

**バイオアベイラビリティ**：本明細書で使用される場合、「バイオアベイラビリティ」という用語は、対象者の血流に達する投与用量の割合を一般的に指す。

#### 【0042】

**生物学的活性**：本明細書で使用される場合、「生物学的活性」という語句は、生体系、特に生命体において活性を有する任意の薬剤の特徴を指す。例えば、ある生命体に投与された時、その生命体に生物学的效果を有する薬剤は生物学的活性であると見なされる。特定の実施形態では、ペプチドが生物学的活性である場合、ペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有するそのペプチドの一部は、典型的には「生物学的活性」部分と呼ばれる。

20

#### 【0043】

**心筋**：本明細書で使用される場合、「心筋（cardiac muscle）」という用語は、心臓の壁に見られる不随意な横紋筋の1つのタイプ、特に心筋（myocardium）を指す。

#### 【0044】

**担体または希釈剤**：本明細書で使用される場合、「担体」および「希釈剤」という用語は、医薬製剤の調製に有用な薬学的に許容可能な（例えば、ヒトへの投与のための安全かつ非毒性）担体または希釈物質を指す。例示的な希釈剤としては、滅菌水、注射用静菌水（BWFⅠ）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リソゲル液、またはデキストロース溶液が挙げられる。

30

#### 【0045】

**剤形**：本明細書で使用される場合、「剤形」および「単位剤形」という用語は、治療される患者のための治療用タンパク質（例えば、組み換えフォリスタチンポリペプチドまたは組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質）の物理的に個別の単位を指す。各単位は、望ましい治療効果を産生するよう計算された所定の量の活性物質を含有する。しかしながら、組成物の総投与量は、担当医によって健全な医学的判断の範囲内で決定することが理解されるであろう。

#### 【0046】

**フォリスタチンまたは組み換えフォリスタチン**：本明細書で使用される場合、「フォリスタチン（FS）」または「組み換えフォリスタチン」という用語は、別段の指定がない限り、実質的なフォリスタチン生物学的活性を保持する任意の野生型または修飾フォリスタチンタンパク質またはポリペプチド（例えば、アミノ酸突然変異、欠失、挿入、および／または融合タンパク質を有するフォリスタチンタンパク質）を指す。

40

#### 【0047】

**Fc領域**：本明細書で使用される場合、「Fc領域」という用語は、2つの「Fcポリペプチド」の二量体を指し、各「Fcポリペプチド」は、最初の定常領域免疫グロブリンDメインを除外した抗体の定常領域を含む。いくつかの実施形態では、「Fc領域」は、1つ以上のジスルフィド結合、化学リンカー、またはペプチドリンカーによって連結された2つのFcポリペプチドを含む。「Fcポリペプチド」とは、IgA、IgD、およびIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンDメイン、ならびにIgEおよびIgMの

50

最後の 3 つの定常領域免疫グロブリンドメインを指し、これらのドメインに対する柔軟なヒンジ N 末端の一部またはすべても含み得る。 Ig G については、「Fc ポリペプチド」は免疫グロブリンドメイン C gamma 2 (C 2) および C gamma 3 (C 3) ならびに C gamma 1 (C 1) と C 2 との間のヒンジの下部を含む。 Fc ポリペプチドの境界は変化し得るが、ヒト Ig G 重鎖 Fc ポリペプチドは通常、 T 2 2 3 または C 2 2 6 または P 2 3 0 で始まる残基をカルボキシル末端に含むように定義されているが、ナンバリングは Kabat ら (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) の EU インデックスに従っている。 Ig A については、 Fc ポリペプチドは免疫グロブリンドメイン C alpha 2 (C 2) および C alpha 3 (C 3) ならびに C alpha 1 (C 1) と C 2 との間のヒンジの下部を含む。 Fc 領域は、合成とする、組み換えとする、または IVIG などの天然源から生成することができる。

10

#### 【0048】

機能的均等物または誘導体：本明細書で使用される場合、「機能的均等物」または「機能的誘導体」という用語は、アミノ酸の配列の機能的誘導体の文脈で、元の配列と実質的に類似した生物学的活性（機能または構造のいずれか）を保持する分子を示す。機能的誘導体または均等物は、天然誘導体であってもよく、または合成的に調製されてもよい。例示的な機能的誘導体としては、タンパク質の生物学的活性が保存される限り、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または追加を有するアミノ酸の配列が挙げられる。置換するアミノ酸は、置換されたアミノ酸と類似した物理化学的特性を持つことが望ましい。望ましい類似の物理化学的特性には、電荷、嵩高性、疎水性、親水性などの類似点が含まれる。

20

#### 【0049】

融合タンパク質：本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」という用語は、元は別個の2つ以上のタンパク質またはその部分の結合を通して生成されるタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、リンカーまたはスペーサーは、各タンパク質の間に存在することになる。融合タンパク質の非限定的な例は、Fc 融合タンパク質である。融合タンパク質の非限定的な例は、フォリスタチン Fc 融合タンパク質である。

30

#### 【0050】

半減期：本明細書で使用される場合、「半減期」という用語は、タンパク質濃度または活性などの量が、期間の開始時に測定されたその値の半分に低減するために必要とされる時間である。

#### 【0051】

肥大：本明細書で使用される場合、「肥大」という用語は、その構成要素細胞の拡大に起因する器官または組織の体積の増加を指す。

#### 【0052】

改善、増加、または低減：本明細書で使用される場合、「改善」、「増加」、もしくは「低減」または文法的均等物は、本明細書に記載の治療の開始前の同一人物の測定値、または本明細書に記載の治療が欠如した対照対象者（または複数の対照対象者）の測定値など、ベースライン測定値に対する値を示す。「対照対象者」は、治療される対象者と同じ形態の疾患を罹患しており、治療される対象者とほぼ同じ年齢の対象者である。

40

#### 【0053】

阻害：本明細書で使用される場合、「阻害」、「阻害する」、および「阻害性」という用語は、目的のタンパク質または遺伝子の活性および／または発現を減少または低減するプロセスまたは方法を指す。典型的には、タンパク質または遺伝子を阻害することは、本明細書に記載の、または当技術分野で認識された1つ以上的方法で測定したタンパク質または遺伝子の発現または関連する活性を、例えば、20%、30%、40%、もしくは50%、60%、70%、80%、90%以上など、10%以上低減させること、または発現または関連する活性の1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍を超

50

えるまたはそれ以上の低減を指す。

【0054】

In Vitro：本明細書で使用される場合、「in vitro」という用語は、例えば、多細胞生命体の中ではなく、試験管または反応容器内、細胞培養内など、人工環境で生じる事象を指す。

【0055】

In Vivo：本明細書で使用される場合、「in vivo」という用語は、ヒトおよびヒト以外の動物などの多細胞生命体の中で生じる事象を指す。細胞ベースの系の文脈では、この用語は、（例えば、in vitro系とは対照的に）生きた細胞の中で生じる事象を指すために使用される場合がある。

10

【0056】

$K_D$ ：本明細書で使用される場合、「 $K_D$ 」という用語は解離定数を指すことが意図され、これは $K_D$ の $K_a$ に対する比率（すなわち、 $K_D / K_a$ ）から得られ、そしてモル濃度（M）として発現される。リガンドに対する $K_D$ 値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。リガンドの $K_D$ を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用することによって、好ましくはBIAcore（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用することである。

【0057】

リンカー：本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、融合タンパク質では、天然タンパク質の特定の位置に現れるもの以外のアミノ酸の配列を指し、一般的には柔軟になるように、または2つのタンパク質部分の間にヘリックスなどの構造を挟むように設計されている。リンカーはスペーサーとも呼ばれる。リンカーまたはスペーサーは典型的には、それ自体では生物学的機能を有しない。

20

【0058】

薬学的に許容可能な：本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、ヒトおよび動物の組織と接触する使用に好適であり、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、またはその他の問題もしくは合併症を起こさず、妥当な利益／リスク比と釣り合った物質を指す。

【0059】

ポリペプチド：本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合を介して一緒に連結されたアミノ酸の連続鎖を指す。本用語は、任意の長さのアミノ酸鎖を指すために使用されるが、当業者であれば、この用語が長い鎖に限定されず、かつペプチド結合を介して連結された2つのアミノ酸を含む最小鎖を指すことができることを理解するであろう。当業者に知られているように、ポリペプチドは処理および／または修飾されてもよい。本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は交換的に使用される。

30

【0060】

防止：本明細書で使用される場合、疾患、障害、および／または病状の発生に関連して使用される場合、「防止」または「予防」という用語は、疾患、障害、および／または病状を発症するリスクの低減を指す。「リスク」の定義を参照のこと。

40

【0061】

タンパク質：本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、個別ユニットとして機能する1つ以上のポリペプチドを指す。単一のポリペプチドが個別機能ユニットであり、かつ個別機能ユニットを形成するために他のポリペプチドと永久的または一時的な物理的関連を必要としない場合、用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は互換的に使用され得る。個別の機能的ユニットが、相互に物理的に関連付けられた2つ以上のポリペプチドから成る場合、「タンパク質」という用語は、物理的に連結されており、かつ個別ユニットとして一緒に機能する複数のポリペプチドを指す。

【0062】

リスク：文脈から理解されるように、疾患、障害、および／または病状の「リスク」は

50

、特定の個人が疾患、障害、および／または病状（例えば、筋ジストロフィー）を発症する可能性を含む。いくつかの実施形態では、リスクは割合で表現される。いくつかの実施形態では、リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90および最大100%である。いくつかの実施形態ではリスクは、参照試料または参照試料群に関連するリスクに対するリスクとして表現される。いくつかの実施形態では、参照試料または参照試料群は、疾患、障害、病状および／または事象（例えば、筋ジストロフィー）の公知のリスクを有する。いくつかの実施形態では、参照試料または参照試料群は、特定の個人と同等の複数の個人からのものである。いくつかの実施形態では、相対的リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である。

10

#### 【0063】

**横紋筋**：本明細書で使用される場合、「横紋筋」という用語は、細胞内収縮単位サルコメアの規則的配置を有し、顕微鏡を使用した横紋の外観をもたらし、かつ随意的制御下にある多核筋組織を意味する。典型的には、横紋筋は、心筋、骨格筋、および鰓節筋であり得る。

#### 【0064】

**平滑筋**：本明細書で使用される場合、「平滑筋」という用語は、単一筋および多元筋を含む不随意制御される非横紋筋を意味する。

#### 【0065】

**対象者**：本明細書で使用される場合、「対象者」という用語は、ヒトまたは任意のヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または靈長類）を指す。ヒトは、出生前および出生後の形態を含む。多くの実施形態では、対象者はヒトである。対象者は患者である可能性があり、これは疾患の診断または治療のために医療提供者の元を訪れたヒトを指す。「対象者」という用語は、本明細書では「個人」または「患者」と互換的に使用される。対象者は、疾患もしくは障害に罹患しているか、または感受性がある可能性があるが、その疾患または障害の症状を呈する場合もあり、または呈さない場合もある。

20

#### 【0066】

**実質的に**：本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、目的の特徴または性状を完全またはほぼ完全な範囲または程度示している定性的状態を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的および化学的現象は、あったとしても完了する、および／または完全に進むまたは絶対的結果を達成または避けることは稀であることを理解するであろう。したがって「実質的に」という用語は本明細書では、多くの生物学的および化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如をとらえるために使用される。

30

#### 【0067】

**実質的相同性**：本明細書では「実質的な相同性」という語句は、アミノ酸または核酸配列間の比較を指すために使用される。当業者であれば理解するように、2つの配列はそれらが対応する位置に相同的な残基を含む場合、「実質的に相同」であると一般的に見なされる。相同的な残基は同一の残基であってもよい。代替的に、相同的な残基は、適切に類似の構造および／または機能的特徴を有する非同一残基であってもよい。例えば、当業者には周知のように、ある特定のアミノ酸は典型的には「疎水性」もしくは「親水性」アミノ酸であるとして、かつ／または「極性」もしくは「非極性」側鎖を持つとして一般的に分類される。同じタイプの別のアミノ酸に対する一つのアミノ酸の置換は、「相同」置換としばしば見なされる場合がある。

40

#### 【0068】

当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するBLASTNおよびBLASTP、gapped BLAST、ならびにアミノ酸の配列に対するPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで入手可能なものを含む、様々なアルゴリズムのうちのいずれかを使用して比較され得る。例示的なこうしたプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment

50

nt search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990, Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997, Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998, および Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に説明されている。相同配列を特定することに加えて、上述のプログラムは相同性の程度の指標を典型的に提供する。いくつかの実施形態では、2つの配列は、残基の関連するひと続きに渡って、その対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が相同の場合、実質的に相同であると見なされる。いくつかの実施形態では、関連するひと続きは完全配列である。いくつかの実施形態では、関連するひと続きは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、450、475、500またはそれ以上の残基である。

## 【0069】

実質的に同一：本明細書では「実質的に同一」という語句は、アミノ酸または核酸配列間の比較を指すために使用される。当業者であれば理解するように、2つの配列はそれらが対応する位置に同一な残基を含む場合、「実質的に同一」であると一般的に見なされる。当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するBLASTNおよびBLASTP、gapped BLAST、ならびにアミノ酸の配列に対するPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで入手可能なものを含む、様々なアルゴリズムのうちのいずれかを使用して比較され得る。例示的なこうしたプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990, Altschul, et al., Methods in Enzymology, Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997, Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998;、および Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に説明される。同一の配列を特定することに加えて、上述のプログラムは同一性の程度の指標を典型的に提供する。いくつかの実施形態では、2つの配列は、残基の関連するひと続きに渡って、それらの対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が同一である場合、実質的に同一であると見なされる。いくつかの実施形態では、関連するひと続きは完全配列である。いくつかの実施形態では、関連するひと続きは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、450、475、500またはそれ以上の残基である。

## 【0070】

10

20

30

40

50

表面プラズモン共鳴：本明細書で使用される場合、BIAcore（登録商標）システム（Pharmacia Biosensor AB、スウェーデン、ウパサラ、およびニュージャージー州、ピスカタウェイ）を使用することによるなどの、例えば、バイオセンサーマトリクス内のタンパク質濃度の変化の検出を通して、特定の結合相互作用の分析をリアルタイムで可能にする光学現象を指す。詳しくは、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26、Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131、およびJohnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277を参照。

10

## 【0071】

罹患している：疾患、障害、および／または病状に「罹患している（患う）」個人は、その疾患、障害、および／または病状を有すると診断されたか、またはそれらの1つ以上の症状を示す。

## 【0072】

感受性がある：疾患、障害、および／または病状の「感受性がある」個人は、その疾患、障害、および／または病状を有すると診断されてはいない。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および／または病状の感受性がある個人は、その疾患、障害、および／または病状の症状を示さない場合がある。いくつかの実施形態では、疾患、障害、病状、または事象（例えば、DMD）に感受性がある個人は、以下の1つ以上により特徴付けられる場合がある：(1) 疾患、障害、および／または病状の発症と関連する遺伝的突然変異、(2) 疾患、障害、および／または病状の発症と関連する遺伝子多型、(3) 疾患、障害、および／または病状と関連するタンパク質の発現および／または活性の増加および／または減少、(4) 疾患、障害、病状および／または事象の発症と関連する習慣および／またはライフスタイル、(5) 移植を受けた、移植を受けることを計画している、または移植を必要としていること。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および／または病状の感受性がある個人は、その疾患、障害、および／または症状を発症するであろう。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および／または病状の感受性がある個人は、その疾患、障害、および／または病状を発症しないであろう。

20

## 【0073】

標的組織：本明細書で使用される場合、「標的組織」という用語は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）などの治療される疾患によって影響を受ける任意の組織を指す。いくつかの実施形態では、標的組織としては、疾患関連病理、症状、または特徴を示す組織（筋消耗、骨格変形、心筋症、および呼吸機能障害を含むがこれに限定されない）が挙げられる。

30

## 【0074】

治療有効量：本明細書で使用される場合、治療薬の「治療有効量」という用語は、疾患、障害、および／または病状の症状の開始を治療、診断、防止、および／または遅延するために、疾患、障害、および／もしくは病状に罹患している対象者、また感受性がある対象者に投与されたとき十分な量を意味する。当業者であれば、治療有効量は典型的には、少なくとも1単位用量を含む投与レジメンにより投与されることを理解するであろう。

40

## 【0075】

治療：本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、または「治療すること」という用語は、特定の疾患、障害、および／または病状の1つ以上の症状または特徴を部分的にもしくは完全に緩和する、改善する、解放する、抑制する、防止する、開始を遅延する、重症度を低減する、かつ／または発生率を低減させるために使用する任意の方法を指す。治療は、疾患に関連する病理の発症のリスクを減らす目的で、疾患の兆候を呈しない、および／または疾患の早期の兆候のみを呈する対象者に投与する場合もある。

## 【0076】

ある特定の実施形態の詳細な説明

50

本発明は、数ある中でも、タンパク質治療薬としてのフォリスタチンに基づく、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）および／またはベッカー型筋ジストロフィーを含む筋ジストロフィーを治療するための方法および組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、DMDの少なくとも1つの症状または特徴の強度、重症度、もしくは頻度が低減するように、または開始が遅延するように、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換え組み換えフォリスタチン - Fc融合タンパク質の有効量を、DMDに罹患している、またはDMDに感受性がある個人に投与することを含む、DMDの治疗方法を提供する。

#### 【0077】

本発明の様々な態様が以下のセクションに詳細に説明される。セクションの使用は本発明を限定することを意図しない。各セクションは本発明の任意の態様に適用することができる。本明細書では、別段の定めのない限り、「または」の使用は「および／または」を意味する。

10

#### 【0078】

##### デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）

DMDは、身体全体を通した筋肉の進行性の劣化および筋肉関連機能の喪失によって特徴付けされる疾患である。本発明は、筋肉再生のためならびに、様々な筋組織におけるDMDおよびその他の筋ジストロフィーに関連する線維症、炎症およびその他の症状もしくは特徴を治療するための方法および組成物を提供すると考えられる。いくつかの実施形態では、提供される方法および組成物の対象者における使用は、その対象者内の線維症および／または壊死の減少をもたらす。

20

#### 【0079】

##### 筋組織

動物には、横紋筋および平滑筋という2つの主なタイプの筋組織がある。本明細書で使用される場合、「横紋筋」という用語は、反復サルコメアを含有する筋組織を指す。横紋筋は随意的制御下にあり、骨格に結合している傾向があるが、例えば、横紋筋のいくつかの特性を有するが随意的制御下にはない心筋など、いくつかの例外がある。一般的に、横紋筋は身体の随意的な動きを可能にし、また四頭筋、腓腹筋、二頭筋、三頭筋、僧帽筋、三角筋、および多くの他のものなどが挙げられる主要な筋肉群を含む。横紋筋は非常に長い傾向があり、多くの横紋筋は独立して機能することができる。しかしながら、いくつかの横紋筋は、口腔、肛門、心臓、および食道の上部部分のものを含め、骨格に結合していない。

30

#### 【0080】

一方、平滑筋は非常に異なる構造を有する。別個の骨格結合を有する一連の長い筋肉ではなく、平滑筋は、平滑筋細胞間に機械的連結を有する連続的なシートへと構成される傾向がある。平滑筋はしばしば中空器官の壁に位置し、また通常は随意的制御下にはない。特定の器官をライニングする平滑筋は、同時に同じ負荷および収縮に耐えなければならない。平滑筋機能は、動きおよび／または姿勢もしくは圧力の変化によって引き起こされる中空器官上の負荷の変化を少なくとも部分的に取り扱うために機能する。この二重の役割は、平滑筋が横紋筋のように収縮できるだけでなく、持続的な負荷に対して器官の寸法を維持するように緊張的に収縮できなければならないことを意味する。平滑筋の例としては、血管、膀胱、直腸などの胃腸管をライニングするものが挙げられる。

40

#### 【0081】

筋肉の強度は、筋肉細胞の数およびサイズならびにその解剖学的位置に依存する。既存の筋原線維のサイズの増加（肥大）および／またはより多くの筋細胞の形成（過形成）によって筋纖維の直径が増加すると、筋肉の力発生能力が増加する。

#### 【0082】

筋肉もまた場所または機能によってグループ化され得る。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質は、顔の1つ以上の筋肉、咀嚼のための1つ以上の筋肉、舌および首の1つ以上の筋肉、胸部の1つ以上の筋肉、上肢帯および腕の1つ以上の筋

50

肉、腕および肩の1つ以上の筋肉、1つ以上の腹側および背側の前腕筋、手の1つ以上の筋肉、脊柱起立筋の1つ以上の筋肉、下肢帯および脚の1つ以上の筋肉、および／または前脚および足の1つ以上の筋肉を標的とする。

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、顔の筋肉としては、毛様体筋、瞳孔散大筋、虹彩括約筋などの内眼筋、耳介筋、側頭頭頂筋、アブミ骨筋、鼓膜張筋などの耳の筋肉、鼻根筋、鼻筋、鼻孔開大筋、鼻中隔下制筋、上唇鼻翼拳筋などの鼻の筋肉、口角拳筋、口角下制筋、口輪筋、頬筋、大頬骨筋および小頬骨筋、広頬筋、上唇拳筋、下唇下制筋、笑筋、オトガイ筋などの口の筋肉、および／または皺眉筋が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0084】

いくつかの実施形態では、咀嚼筋肉としては、咬筋、側頭筋、内側翼突筋、外側翼突筋が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、舌および首の筋肉としては、オトガイ舌筋、茎突舌筋、口蓋舌筋、舌骨舌筋、頸二腹筋、茎突舌骨筋、頸舌骨筋、オトガイ舌骨筋、肩甲舌骨筋、胸骨舌骨筋、胸骨甲状腺筋、甲状腺舌骨筋、胸鎖乳突筋、前斜角筋、中斜角筋、および／または後斜角筋が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、胸部、上肢帯、および腕の筋肉としては、鎖骨下筋、大胸筋、小胸筋、腹直筋、外腹斜筋、内腹斜筋、腹横筋、横隔膜、外肋間筋、内肋間筋、前鋸筋、僧帽筋、肩甲拳筋、大菱形筋、小菱形筋、広背筋、三角筋、肩甲下筋、棘上筋、棘下筋、大円筋、小円筋、および／または烏口腕筋が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0086】

いくつかの実施形態では、腕および肩の筋肉としては、上腕二頭筋長頭、上腕二頭筋短頭、上腕三頭筋長頭、上腕三頭筋外側頭、上腕三頭筋内側頭、肘筋、円回内筋、回外筋、および／または上腕筋が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0087】

いくつかの実施形態では、腹側および背側前腕の筋肉としては、腕橈骨筋、橈側手根屈筋、尺側手根屈筋、長掌筋、尺側手根伸筋、長橈側手根伸筋、短橈側手根伸筋、指伸筋、小指伸筋が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、手の筋肉としては、母指球筋、短母指外転筋、短母指屈筋、母指対立筋、小指球筋、小指外転筋、短小指屈筋、小指対立筋、掌側骨間筋、背側骨間筋および／または中様筋などの手の内在筋が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0089】

いくつかの実施形態では、脊柱起立筋の筋肉としては、頸部筋、棘筋、最長筋、および／または腸肋筋が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0090】

いくつかの実施形態では、下肢帯および脚の筋肉としては、大腰筋、腸骨筋、足底方形筋、長内転筋、短内転筋、大内転筋、薄筋、縫工筋、大腿直筋などの大腿四頭筋、外側広筋、内側広筋、中間広筋、腓腹筋、長腓骨筋、ヒラメ筋、大殿筋、中殿筋、小殿筋、ハムストリング：大腿二頭筋：長頭、ハムストリング：大腿二頭筋：短頭、ハムストリング：半腱様筋、ハムストリング：半膜様筋、大腿筋膜張筋、恥骨筋、および／または前脛骨筋が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0091】

いくつかの実施形態では、前肢および足の筋肉としては、長指伸筋、長母趾伸筋、短腓骨筋、足底筋、後脛骨筋、長母指屈筋、短指伸筋、短母指伸筋、母趾外転筋、短母指屈筋、小指外転筋、短小指屈筋、小指対立筋、短指伸筋、足の虫様筋、足底方形筋または副趾屈筋、短指屈筋、背側骨間筋、および／または底側骨間筋が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0092】

例示的な筋肉標的を表1に要約する。

50

## 【表1-1】

【表1】：筋肉標的

眼輪筋			
眼内：毛様体筋、瞳孔散大筋、虹彩括約筋			
耳：耳介筋、側頭頭頂筋、アブミ骨筋、鼓膜張筋			
鼻：鼻根筋、鼻筋、鼻孔開大筋、鼻中隔下制筋、上唇鼻翼挙筋			
口：口角挙筋、口角下制筋、口輪筋			
頬筋	大頬骨筋および小頬骨筋	広頬筋	上唇挙筋
下唇下制筋	笑筋	オトガイ筋	皺眉筋
肘筋	円回内筋	回外筋	上腕筋
咀嚼の筋肉			
咬筋	側頭筋	内側翼突筋	外側翼突筋
舌および首の筋肉			
オトガイ舌筋	茎突舌筋	口蓋舌筋	舌骨舌筋
顎二腹筋	茎突舌骨筋	顎舌骨筋	オトガイ舌骨筋
肩甲舌骨筋	胸骨舌骨筋	胸骨甲状筋	甲状舌骨筋
胸鎖乳突筋	前斜角筋	中斜角筋	後斜角筋
胸部、上肢帶および腕の筋肉			
鎖骨下筋	大胸筋	小胸筋	腹直筋
外腹斜筋	内腹斜筋	腹横筋	横隔膜
外肋間筋	内肋間筋	前鋸筋	僧帽筋
肩甲挙筋	大菱形筋	小菱形筋	広背筋
三角筋	肩甲下筋	棘上筋	棘下筋
大円筋	小円筋	烏口腕筋	
腕および肩			
上腕二頭筋長頭	上腕二頭筋短頭	上腕三頭筋長頭	上腕三頭筋外側頭
上腕三頭筋内側頭	肘筋	円回内筋	回外筋
上腕筋			
前腕筋：腹側および背側			
腕橈骨筋	橈側手根屈筋	尺側手根屈筋	長掌筋
尺側手根伸筋	長橈側手根伸筋	短橈側手根伸筋	指伸筋
小指伸筋	脊柱起立筋：頸部	脊柱起立筋：棘筋	脊柱起立筋：最長筋
脊柱起立筋：腸肋筋			
手の内在筋：母指球筋、短母指外転筋、短母指屈筋、および母指対立筋			
手の内在筋：小指球筋、小指外転筋、短小指屈筋、および小指対立筋			
手の内在筋：掌側骨間筋、背側骨間筋、および中様筋			
下肢帶および脚の筋肉			
腸腰筋：大腰筋	腸腰筋：腸骨筋	足底方形筋	長内転筋
短内転筋	大内転筋	薄筋	縫工筋
大腿四頭筋：大腿直筋	大腿四頭筋：外側広筋	大腿四頭筋：内側広筋	大腿四頭筋：中間広筋
腓腹筋	長腓骨筋	ヒラメ筋	大殿筋
中殿筋	小殿筋	ハムストリング：大腿二頭筋：長頭	ハムストリング：大腿二頭筋：短頭
ハムストリング：半腱様筋	ハムストリング：半膜様筋	大腿筋膜張筋	恥骨筋
前脛骨筋			
前肢および足の筋肉			
長指伸筋	長母趾伸筋	短腓骨筋	足底筋

10

20

30

40

## 【表1-2】

後脛骨筋	長母指屈筋	短指伸筋	短母指伸筋
母趾外転筋	短母指屈筋	小指外転筋	短小指屈筋
小指対立筋	短指伸筋	足の虫様筋	足底方形筋または副趾屈筋
短指屈筋	背側骨間筋	底側骨間筋	

## 【0093】

## 筋ジストロフィー

筋ジストロフィーは、筋肉の変性を引き起こし、動きの減弱および障害をもたらす一群の遺伝性障害である。すべての筋ジストロフィーの中心的な特徴は、進行性の性質であることである。筋ジストロフィーには、以下が含まれるがこれらに限定されない：デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、肢帶型筋ジストロフィー、および先天型の筋強直性ジストロフィー1型を含む筋強直性ジストロフィー1型および2型。症状は筋ジストロフィーの種類によって異なる場合があり、一部または全ての筋肉が影響を受ける。筋ジストロフィーの例示的な症状としては、筋運動能力の発達遅延、1つ以上の筋肉群の使用の困難、嚥下、会話、および摂食困難、流涎、眼瞼下垂、頻繁な転倒、成人としての筋肉または筋肉群の強度低下、筋肉サイズの喪失、身体のバイオメカニクスの弱化または変化による歩行障害、筋肥大、筋肉の偽性肥大、筋肉の脂肪浸潤、筋肉の非収縮性組織での置換（例えば、筋線維症）、筋壊死、および／または認知もしくは行動障害／精神遅滞が挙げられる。

## 【0094】

筋ジストロフィーには公知の治療法はないが、対症療法および疾患修飾療法の両方を含むいくつかの補助的治療が使用されている。コルチコステロイド、理学療法、矯正具、車椅子、またはADLおよび肺機能のためのその他の支援医療用具が、筋ジストロフィーでは一般的に使用される。筋強直性ジストロフィーにおける心不整脈からの突然死を防止するために、心臓ペースメーカーが使用される。筋強直症（弛緩不能）の症状を改善する抗筋強直剤には、メキシリチン、および一部の事例ではフェニトイン、プロカインアミドおよびキニンが含まれる。

## 【0095】

## デュシェンヌ型筋ジストロフィー

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、筋ジストロフィーの劣性X連鎖形態であり、筋変性および最終的な死をもたらす。DMDは、近位筋の弱化、異常な歩行、腓腹筋（ふくらはぎ）の筋肉の偽性肥大、およびクレアチンキナーゼ（CK）の上昇を特徴とする。多くのDMD患者は、典型的に症状／兆候がより明らかになる、5歳頃に診断される。罹患者は典型的には、年齢10～13歳頃に歩けなくなり、心肺機能不全のために20代半ばから後半までに死亡する。

## 【0096】

DMD障害は、ヒトX染色体上に位置するジストロフィン遺伝子の突然変異によって引き起こされ、これは細胞膜のジストログリカン複合体（DGC）に構造的安定性を提供する筋組織内の重要な構造構成要素であるタンパク質ジストロフィンをコード化する。ジストロフィンは、内部細胞質アクチンフィラメントネットワークおよび細胞外基質を連結し、筋纖維に物理的強度を提供する。したがって、ジストロフィンの改変または欠如は、異常な筋線維膜断裂および筋纖維の壊死をもたらす。男女の両方が突然変異を持つことができるが、女性が本疾患の重度の兆候を呈することは稀である。

## 【0097】

DMDの主な症状は、筋消耗と関連する筋力低下であり、典型的には随意筋が最初に罹患し、特に臀部、骨盤領域、大腿、肩、およびふくらはぎの筋肉に影響を及ぼす。筋力低下は、腕、首、およびその他の領域でも生じる。ふくらはぎはしばしば場合、拡大する。

10

20

30

40

50

兆候および症状は通常6歳前に現れ、乳児期に現れる場合もある。その他の身体症状としては、独立歩行能力の遅延化、歩行、足ふみ、または走ることが進行的に困難となり、最終的には、（通常は15歳までに）歩くことができなくなる；頻繁な転倒；疲労；運動スキル（走る、跳び歩く、ジャンプ）の困難；股関節屈筋の短縮につながる腰椎前彎の増加；筋繊維が短縮し、線維症が結合組織で起こることによりアキレス腱およびハムストリングの拘縮が機能を障害；筋繊維変形；脂肪および結合組織による筋組織の置換によって起こる舌およびふくらはぎの筋肉の偽性肥大（拡大）；神経行動学的障害（例えば、ADHD）、学習障害（ディスレクシア）、および特定の認知スキル（特に短期言語記憶）の非進行的低下のリスクがより高くなる；骨格変形（一部の事例では、脊柱側弯を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

### 【0098】

#### 組み換えフォリスタチントンパク質

単量体糖タンパク質であるフォリスタチン（FS）は、当初、ブタ卵巣卵胞液から特定され、下垂体卵胞刺激ホルモン（FSH）分泌を特異的に抑制するその機能に基づいて命名された。その後、ヒトフォリスタチンの生理学的機能は、TGF- $\beta$ のある特定のメンバー、主にアクチビンおよびミオスタチンの結合および阻害によってさらに理解されてきた。アクチビンは、胚発生および成長、生殖、エネルギー代謝、骨のホメオスタシス、炎症および線維症など、様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。ミオスタチンは成長因子および分化因子8（GDF-8）としても公知であるが、周知の筋形成および骨格筋量の重要な負の調節因子である。ミオスタチンの阻害は、肥大による骨格筋量の著しい増加を引き起こす。フォリスタチンは、アクチビンおよびミオスタチンの天然拮抗薬として、炎症、線維症、ならびにデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカーモード筋ジストロフィー（BMD）、および封入体筋炎（IBM）などの筋肉障害に関連するヒト疾患を治療するための有望な治療標的として示されている。

20

### 【0099】

フォリスタチン遺伝子は、染色体5q11.2上に局在化する。RNA処理の代替的なスプライシング事象は、2つのコードされたフォリスタチン前駆体、344アミノ酸前駆体タンパク質、および27アミノ酸カルボキシル末端切断317アミノ酸前駆体をもたらす。前駆体の最初の29個のアミノ酸残基は、推定シグナル配列に対応し、これにより2つのN末端同一コア成熟FSアイソフォーム、FS315およびFS288がもたらされる。FSの追加的バリエント、FS303は、FS315のタンパク質分解切断から生じることが報告されている。3つのアイソフォームは、リガンド結合および局在化に対するそれらの異なる親和性に基づいて、異なる生物学的役割を果たす。FS315は、ヒト血清中の主な循環アイソフォームとして提唱されており、一方でFS303は卵巣卵胞液中の主なアイソフォームである。FSのドメイン構造は、エクソンシャッフリング由来の典型的なモザイクタンパク質であり、これは、63残基N末端ドメイン（ND）、次いで3つの連續的FSドメイン（FSD1、FSD2、およびFSD3）、ならびにFS315およびFS303アイソフォームの強酸性C末端尾部（AD）から成る（図1）。約50%の主配列相同性を共有する3つのFSドメインは、その10個のシステイン残基のアライメントによって明確に関連している。FSD1の結晶構造は、FSドメインを、N末端EGF様モジュールおよびC末端カザールプロテアーゼ阻害剤ドメインの2つの別個のサブドメインへと分けることができることを示し、各FSドメインは、10個の保存されたシステインによって形成されたドメイン内のジスルフィド結合を通して自律的な折り畳みユニットを形成することが予測される。

30

40

### 【0100】

細胞表面上のプロテオグリカンのヘパリンセファロース親和性カラムおよびヘパラン硫酸鎖とFSとの関連性は、元の単離および特徴解析研究に記述されている。後の研究では、FS中のコアヘパリン結合配列（HBS）が特定され、これはFSD1ドメイン内に位置する、強塩基性12残基セグメント（残基75～86）である。HBS領域は、2つのコンセンサスヘパリン結合モチーフBBXBを含み、ここでBはリシン（K）またはアル

50

ギニン（R）であり、ヘパリン結合に関する重要な決定因子としての機能を果たす。BBXBモチーフにおけるHBSまたは点突然変異の置換は、ヘパリンへの結合を低減または消失させることができる。最近の動物研究では、除去したHBSをマウスIg1Fcドメイン（FS315 HBS-Fc）に融合した操作FS315は、マウスにおける曝露および半減期を著しく改善し、また筋委縮のマウスマルクモデルにおける用量に依存した薬理学的效果も示し、これは治療上関連する組み換えFSバリエントを作るためにヘパリン結合親和性を操作する重要性を強調している。

#### 【0101】

治療用途の組み換えFSの系統的タンパク質エンジニアリングは、ほとんど未開拓である。いくつかの実施形態では、本明細書には、操作された組み換えFSバリエントが示されている。いくつかの実施形態では、操作された組み換えFSバリエントはIgG Fcに融合されている。いくつかの実施形態では、操作された組み換えFSバリエントはヒトIgG1 Fcに融合されている。

10

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、FS HBS内の塩基性BBXBモチーフのある特定の残基の電荷は、ヘパリン結合親和性に影響を与える。FS315はN末端ドメイン（ND）、3つのFSドメイン（FSD1、FSD2、およびFSD3）、および強酸性C末端尾部（AD）から成る（図1）。塩基性残基が豊富な2つのコアヘパリン結合モチーフKKCRおよびKKNKは、FSD1内に位置し、FSD2（pI 6.7）およびFSD3（pI 4.8）と比較して最も基本的なドメイン（Pi 8.9）となっている。ヘパリンと複合した20個の非冗長三次元タンパク質構造の構造解析により、静電気と水素結合の相互作用が、カチオン性残基（KまたはR）とヘパリン中のアニオン性基との間の結合に最も寄与することが示された。ヘパリン類似体と複合化したFS FSD1ドメインの結晶構造は、静電相互作用による負電荷を持つ硫酸基を通して、ヘパリン類似体が強塩基性HBSと関連付けられていることも示された。いくつかの実施形態では、HBS領域のBBXBモチーフにおいてカチオン性残基をアニオン性残基で置換すると、静電相互作用を断ち、ヘパリン結合を消失させる。いくつかの実施形態では、負電荷残基置換バリエントK(76, 81, 82)EおよびK(76, 81, 82)Dは、SPR結合アッセイにおいて、ヘパリン結合親和性が検出不能であったが、中性残基置換バリエントK(76, 81, 82)Aは9.4NmのK<sub>D</sub>の結合を有しており、負電荷の置換を使用してヘパリン結合を除去することへの、効果がより大きいことが確認された。ヘパリン結合親和性に対する負電荷置換の顕著な影響により、わずか数個の点変異の導入で、HBS置換バリエント HBSおよびHBS欠失バリエントde175-86で見られるものと同じ結合の変化が達成される。発明者らの手により最小限の置換を利用して、CHOのFSバリエントに対する発現レベルの改善およびタンパク質A溶出液中のタンパク質凝集の低減が可能となっただけでなく、野生型と同様のアクチビンAおよびミオスタチン結合親和性も保持された。

20

30

30

#### 【0103】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンバリエントにおけるグルタミン酸置換の程度が増加すると、ヘパリン結合が漸進的に低減する。いくつかの実施形態では、第二のBBXBモチーフKKNK(81~84)は、第一のBBXBモチーフKKCR(75~78)よりもヘパリン結合に支配的な役割を果たす。いくつかの実施形態では、FS BBBXBモチーフの各々の第三の塩基性残基は、ヘパリン結合に対してより弱い効果を有する。いくつかの実施形態では、FS BBBXBモチーフの最初の2つの塩基性残基は、FS BBBXBモチーフの第三の塩基性残基よりもヘパリン結合および/またはクリアランスに影響を与える。

40

#### 【0104】

負電荷残基グルタミン酸Eを使用して、BBXBモチーフの主要残基に対する1つ、2つ、または3つの一連のアミノ酸置換を生成することにより、ヘパリン結合の主な位置および組み合わせが特定された。二重バリエントK(81, 82)Eは、K(75, 76)

50

E、K(76, 82)E、K(76, 84)E、R78E/K82E、R78E/K84EおよびK(82, 84)Eを含む、その他6個の二重バリアントと比べて、ヘパリン結合に対して最も大きな影響が観察されたので、第二のBBXBモチーフのK81およびK82が静電気相互作用に関して支配的な役割を果たすことが2つのBBXBモチーフの6つの塩基性残基のスクリーニングで示された（表8b）。いくつかの実施形態では、K82E突然変異を持つバリアントは、タンパク質発現レベルにおいて約2倍の増加を一貫して示し、タンパク質の折り畳みに対するK82Eの正の影響を示唆した。いくつかの実施形態では、試験範囲で、野生型と比較して4～100倍の低減またはそれ以上の範囲の異なるヘパリン結合度でバリアントが生成される。FSと細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンとの関連性が、急速な細胞取り込みおよびクリアランスを生じることが示されている。異なるヘパリン結合親和性を有する複数のバリアントを選択し、これらをメスのCD1マウスに単回静脈内投与（1mg/kg）として投与した。すべてのバリアントは、野生型と比較してPKプロファイルの改善を示し、ヘパリン結合の低減は、AUCの増加およびクリアランスの減少と明らかに相關した（表11）。実施例に示されたデータは、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンとの関連性が、フォリストチンタンパク質のin vivo薬物動態プロファイルに対する決定因子プロセスのうちの1つであることを示す。治療用途のために、フォリストチンタンパク質の曝露および薬物動態プロファイルは、ヘパリン結合を操作することによって調節することができる。

10

20

30

40

50

## 【0105】

ヘパリン結合とAUCまたはクリアランスのいずれかとの関係とは対照的に、終末相半減期に対する直接関係はないが、多くのバリアントは野生型と比較して延長した半減期を有した。薬物の半減期はクリアランスおよび分布容積の両方に依存するため、分布容積（表11）（タンパク質電荷および構造からもたらされ得る）は終末相半減期とヘパリン結合との非直接的な関係に寄与する因子であり得る。

## 【0106】

リガンド結合に対するHBS領域内の突然変異の影響は、異なるFSアイソフォーム/バリアントおよび異なるアッセイシステムで研究されており、異なるデータセットをもたらしている。d e l 7 5 - 8 6 バリアントに対するミオスタチン阻害のおよそ20倍の低減およびアクチビンA阻害の約5倍の低減が、分子の構造の変化によって生じる可能性がある。いくつかの実施形態では、組み換えフォリストチンバリアントは、野生型フォリストチンと比較して、ミオスタチン阻害を約50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2.5、2、1.5、または1倍、低減させる。いくつかの実施形態では、組み換えフォリストチンは、野生型フォリストチンと比較して、アクチビンA阻害を約30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1倍、低減させる。

## 【0107】

グリコエンジニアリング技術は、治療薬の医薬品特性を改善するための魅力的な戦略となりつつある。関連酵素の過剰発現または破壊による宿主生合成経路のグリコエンジニアリング遺伝子改変には多くのアプローチがある；2)可溶性酵素阻害剤の使用による宿主生合成経路の代謝干渉、3)精製タンパク質の翻訳後の酵素的または化学酵素的改変、および4)炭水化物含有量を増加させるためまたは特異的結合をブロックするための新たなグリコシル化部位の導入。

## 【0108】

いくつかの実施形態では、高グリコシル化部位は、フォリストチンのN75上に見出される。FSD1の結晶構造は、残基64～74がループを形成し、その後にストランド1(75～79)およびストランド2(85～89)が続くことを示す。残基75は、ループとストランド1を連結するII型ターン(72～75)に位置し、これはある程度の柔軟性を有する露出ループ領域でグリコシル化がしばしば生じるという所見と一致する。

## 【0109】

2つの高グリコシル化バリアント K 75N / C 77N / K 82T および C 66A / K 75N / C 77T は、マウスの研究で、野生型と比較して *in vivo* 曝露の著しい改善を示した。C 66A / K 75N / C 77T に対する、N 75 にグリカンを添加することによる、*in vitro* のヘパリン結合低減はなかった。

#### 【0110】

いくつかの実施形態では、第一の BBBXB モチーフ（残基 75 ~ 78）は、第二の BBBXB モチーフ（残基 81 ~ 84）よりもヘパリン結合に与える影響が少ない。理論に束縛されるものではないが、C 66A / K 75N / C 77T に対する *in vivo* の曝露の約 10 倍の改善はグリカン占有率の増加によって生じる可能性があり、これは組み換え F S 315 - Fc 分子に対する *in vivo* の糖依存性クリアランスを低減させ、嵩高のグリカンの *in vivo* での追加によって一部のヘパリン結合をブロックする可能性も一定程度ある。バリアント K 75N / C 77N / K 82T は C 66A / K 75N / C 77T よりも高いグリカン占有率および弱い *in vitro* ヘパリン結合親和性を有し、これは *in vitro* 曝露に対するより大きな改善に貢献した。

10

#### 【0111】

本明細書で使用される場合、本発明に好適な組み換えフォリスタチンには、実質的なフォリスタチン生物学的活性を保持する任意の野生型または改変型（アミノ酸突然変異、欠失、挿入、および / または融合タンパク質を有するフォリスタチンタンパク質）が含まれる。典型的には、組み換えフォリスタチンタンパク質は、組み換え技術を使用して產生される。しかしながら、天然資源から精製された、化学的に合成されたフォリスタチンタンパク質（野生型または改変型）を本発明に従って使用することができる。典型的には、好適な組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、約 12 時間、18 時間、24 時間、36 時間、2 日、2.5 日、3 日、3.5 日、4 日、4.5 日、5 日、5.5 日、6 日、6.5 日、7 日、7.5 日、8 日、8.5 日、9 日、9.5 日、または 10 日以上の *in vivo* 半減期を有する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質は、0.5 ~ 10 日、1 日 ~ 10 日、1 日 ~ 9 日、1 日 ~ 8 日、1 日 ~ 7 日、1 日 ~ 6 日、1 日 ~ 5 日、1 日 ~ 4 日、1 日 ~ 3 日、2 日 ~ 10 日、2 日 ~ 9 日、2 日 ~ 8 日、2 日 ~ 7 日、2 日 ~ 6 日、2 日 ~ 5 日、2 日 ~ 4 日、2 日 ~ 3 日、2.5 日 ~ 10 日、2.5 日 ~ 9 日、2.5 日 ~ 8 日、2.5 日 ~ 7 日、2.5 日 ~ 6 日、2.5 日 ~ 5 日、2.5 日 ~ 4 日、3 日 ~ 10 日、3 日 ~ 9 日、3 日 ~ 8 日、3 日 ~ 7 日、3 日 ~ 6 日、3 日 ~ 5 日、3 日 ~ 4 日、3.5 日 ~ 10 日、3.5 日 ~ 9 日、3.5 日 ~ 8 日、3.5 日 ~ 7 日、3.5 日 ~ 6 日、3.5 日 ~ 5 日、3.5 日 ~ 4 日、4 日 ~ 10 日、4 日 ~ 9 日、4 日 ~ 8 日、4 日 ~ 7 日、4 日 ~ 6 日、4 日 ~ 5 日、4.5 日 ~ 10 日、4.5 日 ~ 9 日、4.5 日 ~ 8 日、4.5 日 ~ 7 日、4.5 日 ~ 6 日、4.5 日 ~ 5 日、5 日 ~ 10 日、5 日 ~ 9 日、5 日 ~ 8 日、5 日 ~ 7 日、5 日 ~ 6 日、5.5 日 ~ 10 日、5.5 日 ~ 9 日、5.5 日 ~ 8 日、5.5 日 ~ 7 日、5.5 日 ~ 6 日、6 日 ~ 10 日、7 日 ~ 10 日、8 日 ~ 10 日、9 日 ~ 10 日の *in vivo* 半減期を有する。

20

#### 【0112】

フォリスタチン（FS）は、下垂体細胞の卵胞刺激ホルモン（FSH）分泌を抑制する能力を有するタンパク質因子として、最初に卵胞液から単離された。FS は、アクチビンの結合および中和を通して少なくとも部分的に FSH に影響を及ぼす。

30

#### 【0113】

FS には少なくとも 3 つのアイソフォームがある：FS 288、FS 303、および FS 315（表 3）。全長 FS 315 タンパク質は、エクソン 6 によってコードされる酸性 26 残基 C 末端尾部を含む（配列番号 2、C 末端尾部は單一下線付き）。いくつかの事例では、FS 315 アイソフォームは、シグナル配列を含み得る（配列番号 1、シグナル配列は太字およびイタリックで指定される）。FS 288 アイソフォームは、C 末端における代替的スプライシングを通して生成され、それゆえにエクソン 5（配列番号 5）で終了する。フォリスタチンタンパク質は、アクチビン結合に重要な疎水性残基を含む 63 個の

40

50

アミノ酸N末端領域から成る独特の構造を有し、タンパク質の主要部分（残基64～288、例えば、配列番号2に示されるようなもの）は各々がおよそ73～75個のアミノ酸である3つの10-システイン富ドメインを含む。これらのN末端からC末端までの10-システインドメインは、それぞれドメイン1、ドメイン2、およびドメイン3（すなわち、FSD1、FSD2、およびFSD3）と呼ばれる。F S 2 8 8 はヘパリン結合ドメインの存在に起因する組織結合である傾向があり、一方F S 3 1 5 は、ヘパリン結合ドメインが拡張C末端によってマスクされるため、潜在的に循環形態である傾向がある。F S 3 0 3（配列番号4）は、F S 3 1 5からのC末端ドメインのタンパク質分解切断によって生成されると考えられる。いくつかの事例では、F S 3 0 3アイソフォームは、シグナル配列を含み得る（配列番号3、シグナル配列は太字およびイタリックで指定される）。F S 3 0 3は、F S 2 8 8とF S 3 1 5の間に中等度レベルの細胞表面結合を有する。

#### 【0114】

ヘパリン結合ドメインまたは配列（例えば、HBS）は、F S 3 1 5の残基75～86に対応するアミノ酸を含み、例えば配列番号2に示されるように、FSD1内にある。HBSは二重下線で指定される。F S 3 0 3タンパク質およびF S 2 8 8タンパク質はまた、対応するアミノ酸（これも二重下線によって指定される）においてHBSを含む。この領域内のアミノ酸の突然変異、欠失、または置換は、ヘパリン結合を低減または消失させ、これによって治療用フォリスタチン-Fc融合タンパク質のクリアランスを低減し、かつ半減期を改善することができる。

#### 【0115】

いくつかの実施形態では、HBS内の少なくとも1つ以上のアミノ酸を、より少ない正電荷を有するアミノ酸と置換して、ヘパリン結合親和性が低減した組み換えフォリスタチントンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、HBS内の少なくとも1つ以上のアミノ酸を、より多くの中性または負の電荷を有するアミノ酸と置換して、低減したヘパリン結合親和性を有する組み換えフォリスタチントンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、元のアミノ酸残基と比べて電荷が低減したアミノ酸で置換すると、低減したヘパリン結合親和性を有する組み換えフォリスタチントンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、HBS内に存在する1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸を、より少ない正電荷を有する、中性電荷を有する、より多くの負電荷を有する、または低減した電荷を有するアミノ酸で置換すると、ヘパリン結合親和性が低減した組み換えフォリスタチントンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、HBS内に存在する1、2、または3個のアミノ酸を、より少ない正電荷を有する、中性電荷を有する、より多くの負電荷を有する、または低減した電荷を有するアミノ酸で置換すると、ヘパリン結合親和性が低減した組み換えフォリスタチントンパク質をもたらす。いくつかの実施形態では、HBSの2つ以上のアミノ酸を、より少ない正電荷を有する荷電アミノ酸、中性アミノ酸、負に荷電したアミノ酸、または荷電を低減したアミノ酸で置換すると、なされたアミノ酸置換の量に対応してヘパリン結合が漸進的に低減する。例えば、HBS内の3個のアミノ酸をより少ない正電荷、中性電荷、より多くの負電荷、または低減した電荷を有するアミノ酸で置換すると、HBS内の2個のアミノ酸のみをより少ない正電荷、中性電荷、より多くの負電荷、または低減した電荷を有するアミノ酸で置換した場合と比べて、組み換えフォリスタチントンパク質によるヘパリン結合が低くなる。別の例として、HBS内の2個のアミノ酸をより少ない正電荷、中性電荷、より多くの負電荷、または低減した電荷を有するアミノ酸で置換すると、HBS内の1個のアミノ酸のみをより少ない正電荷、中性電荷、より多くの負電荷、または低減した電荷を有するアミノ酸で置換した場合と比べて、組み換えフォリスタチントンパク質によるヘパリン結合が低くなる。

#### 【0116】

当業者であれば、他のアミノ酸と比較して、ある特定のアミノ酸は、より少なく正に荷電している、中性である、負に荷電している、または低減された電荷を有していることを認識するであろう。アミノ酸は、アミノ酸の等電点によって示されるように、正味荷電に基づいて分離することができる。等電点は、アミノ酸分子の平均正味荷電がゼロとなるp

10

20

30

40

50

Hである。pH > pIの場合、アミノ酸は正味負電荷を有し、pH < pIの場合、アミノ酸は正味正電荷を有する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質の測定pI値は、約3~9(例えば、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、および9)およびその間の任意の値である。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質の測定pI値は、約4~7(例えば、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)およびその間の任意の値である。例示的なアミノ酸の等電点を下記の表2に示す。一般的に、正の電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸としては、例えば、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、およびリシン(K)が挙げられる。負の電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E)が挙げられる。極性特性を有するアミノ酸としては、例えば、セリン(S)、トレオニン(T)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、及びシスティン(C)、チロシン(Y)およびトリプトファン(W)が挙げられる。非極性アミノ酸としては、例えば、アラニン(A)、バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、およびプロリン(P)が挙げられる。

10

### 【0117】

いくつかの実施形態では、HBS内の点変異は、HBS内の1つ以上のリシン(K)残基の1つ以上の置換を含む。例えば、フォリスタチンポリペプチドのHBS内の1つ以上(例えば、1、2、3、4、5個)のリシン残基は、別のアミノ酸に置換される。HBSは、FS315の残基75~86、すなわち残基K K C R M N K K N K P Rに対応するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の負に荷電したアミノ酸、例えばグルタミン酸(E)および/またはアスパラギン酸(D)をリシン(K)アミノ酸に置換すると、pIシフトとして知られる組み換えフォリスタチンポリペプチドの全体的な電荷の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、フォリスタチン分子の全体的な電荷の変化はin vivoのクリアランスおよび半減期を改善する。一実施形態では、組み換えフォリスタチンポリペプチドの全体的な電荷の変化はin vivoのクリアランスを減速する。いくつかの実施形態では、1つ以上の負に荷電したアミノ酸、例えばグルタミン酸(E)および/またはアスパラギン酸(D)を1つ以上のリシン(K)アミノ酸に置換すると、組み換えフォリスタチン分子の全体的な電荷の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の負に荷電したアミノ酸、例えばグルタミン酸(E)および/またはアスパラギン酸(D)を1つ以上のリシン(K)アミノ酸に置換すると、組み換えフォリスタチンポリペプチドの発現中の高分子量種の量の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の負に荷電したアミノ酸、例えばグルタミン酸(E)および/またはアスパラギン酸(D)を1つ以上のリシン(K)アミノ酸に置換すると、組み換えフォリスタチンポリペプチドの発現の増加をもたらす。

20

30

## 【表2】

【表2】:アミノ酸等電点

アミノ酸	1文字の略語	p I (等電点)
アラニン	A	6. 0
アルギニン	R	10. 76
アスパラギン	N	5. 41
アスパラギン酸	D	2. 77
システイン	C	5. 07
グルタミン酸	E	3. 22
グルタミン	Q	5. 65
グリシン	G	5. 97
ヒスチジン	H	7. 59
イソロイシン	I	6. 02
ロイシン	L	5. 98
リシン	K	9. 74
メチオニン	M	5. 74
フェニルアラニン	F	5. 48
プロリン	P	6. 30
セリン	S	5. 58
トレオニン	T	5. 60
トリプトファン	W	5. 89
チロシン	Y	5. 66
バリン	V	5. 96

10

20

30

40

## 【0118】

FSはin vitroでミオスタチンおよびアクチビンの両方を阻害し、この阻害は、in vivoでマウスにおいて筋肥大につながる可能性があることが示されている (Lee et al., Regulation of Muscle Mass by Folliculin and Activins, (2010), Mol. Endocrinol., 24(10):1998-2008、Gilsen et al., Folliculin Induces Muscle Hypertrophy Through Satellite Cell Proliferation and Inhibition of Both Myostatin and Activin, (2009), J. Physiol. Endocrinol., 297(1):E157-E164)。特定の理論に束縛されるものではないが、この観察された効果は、FSがミオスタチンおよびアクチビンによるSmad2/3経路の活性化を防止することに少なくとも部分的に起因し得る。Smad2/3経路の活性化は、筋肉成長の負の調節をもたらすことが示されている (Zhu et al., Folliculin Improves Skeletal Muscle Healing After Injury and Disease Through an Interaction with Muscle Regeneration, Angiogenesis, and Fibrosis, (2011), Musculoskeletal Pathology, 179(2):915-930)。

## 【0119】

典型的な野生型または自然発生のヒトFS315、FS303、およびFS288タンパク質のアミノ酸の配列を表3に示す。

【表3-1】

【表3】ヒトフォリスタチニアイソフォームの例

アイソフォーム	フォリスタチニアイソフォーム配列
F S 3 1 5、シグナル配列付き	<p><b>MVRARHQPGGLCLLLLCQFMEDRSAQAGNCW</b></p> <p>LRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVD CGPG<u>KKCRMNKKNKPRCV</u>CAPDCSNI TWKG PVC GLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCK KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPE PASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSI GLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAM KEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDE DQDYSFPISI LEW (配列番号1)</p>
F S 3 1 5	<p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVD CGPG<u>KKCRMNKKNKPRCV</u>CAPDCSNI TWKG PVCGL DGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCR DVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQ YLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSI GLAYEGKC IAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLE VKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISI LEW (配列番号2)</p>
F S 3 0 3、シグナル配列付き	<p><b>MVRARHQPGGLCLLLLCQFMEDRSAQAGNCW</b></p> <p>LRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVD CGPG<u>KKCRMNKKNKPRCV</u>CAPDCSNI TWKG PVC GLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCK KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPE PASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSI GLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAM KEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDE DQ (配列番号3)</p>
F S 3 0 3	<p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS TSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETC ENVDCGPG<u>KKCRMNKKNKPRCV</u>CAPDCSNI TWKG GPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQ GRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNR ICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLL GRSI GLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDF KVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYAS ECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEE EDEDQ (配列番号4)</p>
F S 2 8 8、シグナル配列付き	<p><b>MVRARHQPGGLCLLLLCQFMEDRSAQAGNCW</b></p> <p>LRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVD CGPG<u>KKCRMNKKNKPRCV</u>CAPDCSNI TWKG PVC GLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCK KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPE PASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSI</p>

10

20

30

40

【表3-2】

	GLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAM KEAACSSGVLEVVKHSGSCN (配列番号119)
FS288	GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLS TSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETC ENVDCGPG <u>KKCRMNKKNKPR</u> CVCAPDCSNITWK GPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQ GRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNR ICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLL GRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDF KVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYAS ECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCN (配列番号5)

10

20

30

40

50

## 【0120】

それゆえに、いくつかの実施形態では、本発明好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS315（配列番号1または配列番号2）である。本明細書に開示されるように、配列番号2は、ヒトフォリスタチンタンパク質の基準のアミノ酸の配列を表す。いくつかの実施形態では、フォリスタチンタンパク質は、スプライスアイソフォームまたはタンパク質分解バリエント（FS303（配列番号3または配列番号4）など）であってもよい。いくつかの実施形態では、フォリスタチンタンパク質は、FS288（配列番号5）などのスプライスアイソフォームであってもよい。いくつかの実施形態では、好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、野生型または自然発生のタンパク質の相同体または類似体であってもよい。例えば、ヒト野生型または自然発生のフォリスタチンタンパク質の相同体または類似体は、相当なフォリスタチンタンパク質活性（例えば、ミオスタチン阻害またはアクチビン阻害）を保持しながら、野生型または自然発生のフォリスタチンタンパク質と比較して、1つ以上のアミノ酸またはドメインの置換、欠失、および／または挿入を含んでもよい（例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5）。それゆえに、いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS315フォリスタチンタンパク質（配列番号1）と実質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号1に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、相同なアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS315フォリスタチンタンパク質（配列番号1）と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号1に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸の配列を有する。

## 【0121】

いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS315フォリスタチンタンパク質（配列番号2）と実質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号2に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、相同なアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS315フォリスタチンタンパク質（配列番号2）と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号2に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸の配列を有する。

、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸の配列を有する。

【0122】

いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS303フォリスタチンタンパク質（配列番号3）と実質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号3に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、相同的なアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS303フォリスタチンタンパク質（配列番号3）と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号3に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸の配列を有する。

10

【0123】

いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS303フォリスタチンタンパク質（配列番号4）と実質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号4に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、相同的なアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS303フォリスタチンタンパク質（配列番号4）と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号4に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸の配列を有する。

20

【0124】

それゆえに、いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS288フォリスタチンタンパク質（配列番号5）と実質的に相同である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号5に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、相同的なアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、ヒトFS288フォリスタチンタンパク質（配列番号5）と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、配列番号5に対し、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸の配列を有する。

30

【0125】

ヒトフォリスタチンタンパク質の相同体または類似体は、当業者に公知のポリペプチド配列を改变する方法（このような方法を集めた参考文献に見られるものなど）に従って調製することができる。当業者であれば理解するように、2つの配列はそれらが対応する位置に相同的な残基を含む場合、「実質的に相同」であると一般的に見なされる。相同的な残基は同一の残基であってもよい。代替的に、相同的な残基は、適切に類似の構造および／または機能的特徴を有する、非同一残基であってもよい。例えば、当業者には周知のように、ある特定のアミノ酸は「疎水性」または「親水性」アミノ酸として典型的に分類され、かつ／または「極性」または「非極性」側鎖を有し、同じタイプ別の1つのアミノ酸の置換

40

50

は、しばしば「相同」な置換とみなされ得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸の保存的置換には、以下の群内のアミノ酸の中でなされる置換が含まれる：( a ) M、I、L、V；( b ) F、Y、W、( c ) K、R、H；( d ) A、G；( e ) S、T；( f ) Q、N；および( g ) E、D。いくつかの実施形態では、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされるタンパク質の相対的な電荷またはサイズの特徴を改変しないアミノ酸置換を指す。

#### 【0126】

当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するBLASTNおよびBLASTP、gapped BLAST、ならびにアミノ酸の配列に対するPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで入手可能なものを含む、様々なアルゴリズムのうちのいずれかを使用して比較され得る。例示的なこうしたプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990、Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997、Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998;、およびMisener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に説明される。相同配列を特定することに加えて、上述のプログラムは相同性の程度の指標を典型的に提供する。

#### 【0127】

いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、野生型ヒトフォリスタチンタンパク質と比較して、1つ以上のアミノ酸の欠失、挿入、または置換を含む。例えば、好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、表4に示すように、アミノ酸の欠失、挿入、および/または置換を含んでもよい。例示的なアミノ酸の欠失、挿入、および/または置換は、配列番号2に対応するFS315に例示される。いくつかの実施形態では、同じ欠失、挿入、または置換が、シグナル配列を含むFS315(例えば、配列番号1)、FS303(例えば、配列番号3、配列番号4)、またはFS288(例えば、配列番号5)の対応する場所に存在する場合がある。

10

20

30

【表4-1】

【表4】例示的な組み換えフォリスタチンタンパク質

配列番号（突然変異の説明 *）	例示的な組み換えフォリスタチンタンパク質	
配列番号12 (アミノ酸75～86の欠失；ブレークポイントは^によって示される)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG CVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE QPELEVQYQGR ^ ^ CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA SSEQYLCGNDGVTSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVK HSGCNSI SEDTEEEEDEDQDYSFP I S S I LEW	10
配列番号13 (アミノ酸75～84の欠失およびQS CVVDQT GSの挿入(配列番号14) )**	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>QSCVVDQTGS</u> PRCV CAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	20
配列番号15 (K(81,82)A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCRMNA <u>A</u> ANKPRCV CAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	30
配列番号16 (K(76,81,82)A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG K <u>A</u> CRMNA <u>A</u> ANKPRCV CAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	40
配列番号17 (K82E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCRMN <u>K</u> ENKPRCV CAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	

【表4-2】

配列番号18 (K (75, 76) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>E</u> <u>E</u> CRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELC PDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	10
配列番号19 (K (75, 76) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>K</u> <u>E</u> CRMN <u>K</u> <u>E</u> NKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELC PDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	20
配列番号20 (K (81, 82) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KK</u> CRMN <u>E</u> <u>E</u> NKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELC PDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	30
配列番号21 (K (76, 81, 82) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>K</u> <u>E</u> CRMN <u>E</u> <u>E</u> NKPR <u>C</u> <u>E</u> APDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELC PDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	40
配列番号22 (K (76, 81, 82) E / V 88 E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>K</u> <u>E</u> CRMN <u>E</u> <u>E</u> NKPR <u>C</u> <u>E</u> APDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELC PDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	
配列番号23 (K 84 E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRLSTS EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KK</u> CRMN <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> PRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY	

【表4-3】

	SSAChLRKATC LLGRS IGLAYEGKC I KAKS CED IQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	
配列番号24 (K(76,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>K<u>E</u>CRMNKKNE</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATC LLGRS IGLAYEGKC I KAKS CED IQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	10
配列番号25 (K(82,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCRMNK<u>E</u>N<u>E</u></u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATC LLGRS IGLAYEGKC I KAKS CED IQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	20
配列番号26 (R78E/K84E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCE<u>MNKKNE</u></u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATC LLGRS IGLAYEGKC I KAKS CED IQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	30
配列番号27 (K(76,82,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>K<u>E</u>CRMNKKNE</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATC LLGRS IGLAYEGKC I KAKS CED IQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	30
配列番号28 (R78E/K82E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTEL SKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCE<u>MNKENK</u>PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR</u> NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSAChLRKATC LLGRS IGLAYEGKC I KAKS CED IQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSFP I SSILEW	40
配列番号29	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTEL SKEECCSTGRLSTSWT	

【表4-4】

(R 78 E / K (82, 84) E)	EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCE <u>MNKE</u> <u>NE</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPD SKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	
配列番号30 K (76, 81) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTS WT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KE <u>CRMNE</u> <u>KNK</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPD SKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	10
配列番号31 (K 82 T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTS WT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCRMN <u>K</u> <u>NK</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPD SKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	20
配列番号32 (P 85 T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTS WT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCRMN <u>K</u> <u>NK</u> <u>T</u> RCV CAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPD SKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	30
配列番号33 (R 78 N / N80T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTS WT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKC <u>NMT</u> <u>K</u> <u>NK</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPD SKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFP I S S I LEW	40
配列番号34 (R 86 N / V88T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTS WT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCRMN <u>K</u> <u>NK</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> TCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT	

【表4-5】

	GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPPISSILEW	
配列番号35 (K75N/ C77T/K 82T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>NKTRMNKT</u> NKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSDEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPPISSILEW	10
配列番号36 (G74N/ K76S) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN <u>KSCR</u> MNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSDEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPPISSILEW	20
配列番号37 (G74N/ K76T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN <u>KTCRMNKKNK</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSDEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPPISSILEW	30
配列番号38 (G74N/ K76T/P 85T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN <u>KTCRMNKKNK</u> T <sub>R</sub> CVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSDEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPPISSILEW	40
配列番号39 (C66S/ K75N/C 77T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKET <u>S</u> ENVDCGPG <u>NKTRMNKKNK</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSDEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPPISSILEW	
配列番号40 (C66A/	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKET <u>A</u> ENVDCGPG	

【表4-6】

K 7 5 N / C 7 7 T) #	<u>NK</u> TRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVF CPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSPFISSILEW
配列番号 1 0 1 (K 7 5 N / C 7 7 S / K 8 2 T) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRL ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>NK</u> SRMNKT <u>NK</u> PRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVF CPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSPFISSILEW
配列番号 1 0 2 (C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 S) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRL ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKET <u>S</u> ENVDCGPG <u>NK</u> SRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVF CPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSPFISSILEW
配列番号 1 0 3 (C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 S) #	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRL ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETAENVDCGPG <u>NK</u> SRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVF CPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSPFISSILEW
配列番号 1 0 4 K (8 1, 8 2) D	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRL ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG KKCRMN <u>DD</u> NKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVF CPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNS I SEDTEE EEEDEDQDYSPFISSILEW
配列番号 1 0 5 K (7 6, 8 1, 8 2) D	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRL ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KDC</u> CRMN <u>DD</u> NKPRCVCAPDCSNI TWKG PVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVF CPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDI QCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN

10

20

30

40

【表4-7】

	ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE E E E D E D Q D Y S F P I S S I L E W
配列番号 1 0 6 K ( 7 6 , 8 2 ) D	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTTELSEECCSTGRSLSTSWT E EDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>K</u> DCRMNK <u>D</u> NKPVCAPDCSNTWKGPVCGLDGKTYR NECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSS TCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNNDGVTY SSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDN ATYASECAMKEAACSSGVLEVVKHSGSCNSISEDTEE E E E D E D Q D Y S F P I S S I L E W

\* アミノ酸のナンバリングはFS315配列対応する（例えば、配列番号2）；野生型FS315配列と比較したアミノ酸変化は下線で示される。

\*\* QSCVVDQTGSの置換は、J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2): 238に発表された。これは実験的対照として使用された。

10

20

30

40

50

### 高グリコシル化バリアント

#### 【0128】

グリコシル化は、糖タンパク質の複雑な翻訳後修飾であり、タンパク質溶解性、折り畳み、安定性、細胞輸送、免疫原性、生物活性、および分布に影響を与える。現在、15個を超えるグリコエンジニアリング抗体が臨床試験で評価されている。天然FSアイソフォームは、アスパラギンN95、N112、およびN259において3つのN-グリコシル化部位を有する（図1）。潜在的炭水化物含有量を調節し、ヘパリン結合を阻害し、免疫原性のリスクを低減させるために、新規グリコシル化部位をFSヘパリン結合ループへと導入することはまだ調査されていない。

#### 【0129】

いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質には、N-X-T/Sコンセンサス配列を有するHBS領域の高グリコシル化変異体が含まれる。N-X-T/Sコンセンサスは、グリコシル化コンセンサス配列モチーフであり、ここでXはAsn(N)とThr(T)またはAsn(N)とSer(S)の間のプロリノンを除いて任意のアミノ酸とことができる。いくつかの実施形態では、グリコシル化コンセンサス配列の追加は、ヘパリン結合をマスクする、害する、または防止する。いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は表5に提供されるアミノ酸の配列を含み、これらは野生型ヒトフォリスタチンタンパク質FS315、FS303、およびFS288（例えば、配列番号2、配列番号4、または配列番号5）の位置66～88に対応する。いくつかの実施形態では、高グリコシル化バリアントは、改善されたPKパラメータを有する。いくつかの実施形態では、高グリコシル化バリアントは、pI（等電点）によって示される、電荷の正味変化を有しない。

#### 【0130】

いくつかの実施形態では、フォリスタチンポリペプチド内のアミノ酸の欠失、挿入、または置換は、HBS内である。いくつかの実施形態では、アミノ酸の欠失、挿入、または置換は、HBSのN末端アミノ酸またはC末端アミノ酸の20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1アミノ酸以内などのHBSに近いか、またはそれに隣接している。理論に束縛されるものではないが、HBS内、HBSの近く、またはHBSに隣接した変化は、HBSのヘパリン結合を低減させると考えられる。ヘパリン結合の低減は、例えば、in vivo血清半減期などの組み換えタンパク質の薬物動態パラメータを改善すると考えられる。理論に束縛されるものではないが、HBS内、HBSの近く、またはHBSに隣接する変化は、免疫原性を低減させ、かつ／または組み換えタンパク質の発現を増加させ得るとも考えられる。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンの発現増加は、K75D、K75E

、K 7 6 D、K 7 6 E、K 8 1 D、K 8 1 E、K 8 1 D、またはK 8 2 E H B S 突然変異のうちの1つ以上に存在する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンの発現増加は、K 8 2 E H B S 突然変異に存在する。いくつかの実施形態では、H B S 内の少なくとも1つのアミノ酸残基（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個）を、より少ない正電荷を有する少なくとも1つのアミノ酸残基で置換すると、組み換えフォリスタチンタンパク質によるヘパリン結合を低減させることができる。

#### 【0131】

いくつかの実施形態では、フォリスタチンポリペプチド内のアミノ酸置換は、ヘパリン結合領域内にコンセンサスグリコシル化部位を導入する（例えば、K 8 2 T、P 8 5 T、R 7 8 N / N 8 0 T、R 8 6 N / V 8 8 T、K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T、G 7 4 N / K 7 6 S、G 7 4 N / K 7 6 T、G 7 4 N / K 7 6 T / P 8 5 T、C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T、C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T、K 7 5 N / C 7 7 S / K 8 2 T、C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 S、C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 S）。その後のアミノ酸のグリコシル化は、ヘパリン結合ドメインをマスクし、そしてそれゆえに組み換えタンパク質のヘパリンへの結合を低減させると予想される。グリカンの存在はまた、置換アミノ酸をマスクし、これによって、組み換えタンパク質によって付与される免疫原性の任意の潜在的な増加を調節すると予想される。高グリコシル化は、組み換えタンパク質の溶解性および/または半減期を改善することも予想される。例示的な高グリコシル化バリエントを、表4、5、および9に示す。

【表5-1】

【表5】例示的なF S配列

配列番号 (突然変異の説明*)	野生型フォリスタチンのアミノ酸66～88に対応するF S配列*
F S-WTアミノ酸66～88 配列番号 107	CENVD CGPGKKCRMNKKPRCV
F S d e 1 H B S (F S D 2) (F S 3 1 5 ; F S 3 0 3 ; F S 2 8 8) 配列番号 108	CENVD CGPGSTCVVDQTNNAYCV
F S 3 1 5 H B S (d e 1 7 5 - 8 6 ) 配列番号 109	CENVD CGPG-----CV
配列番号41 F S 3 1 5 d e 1 H B S / F S T L - D 2 配列番号13 (アミノ酸75～84の欠失およびQSCVVDQTG Sの挿入(配列番号14)) **	CENVD CGPG <u>QSCVVDQTGSPRCV</u>
配列番号42 (K(81, 82)A)	CENVD CGPGKKCRMNA <u>AANKPRCV</u>
配列番号43 (K(76, 81, 82)A)	CENVD CGPG <u>KACRMNAAANKPRCV</u>
配列番号44 (K82E)	CENVD CGPGKKCRMN <u>KENKPRCV</u>
配列番号45 (K(75, 76)E)	CENVD CGPG <u>EECRMNKKPRCV</u>
配列番号46 (K(76, 82)E)	CENVD CGPG <u>KECRMNKENKPRCV</u>
配列番号47 (K(81, 82)E)	CENVD CGPGKKCRMN <u>EEENKPRCV</u>
配列番号48 (K(76, 81, 82)E)	CENVD CGPG <u>KECRMNEENKPRCV</u>
配列番号49 (K(76, 81, 82)E / V 88 E)	CENVD CGPG <u>KECRMNEENKPRCE</u>
配列番号50 (K84E)	CENVD CGPGKKCRMNKK <u>NEPRCV</u>
配列番号51 (K(76, 84)E)	CENVD CGPG <u>KECRMNKKNEPRCV</u>
配列番号52 (K(82, 84)E)	CENVD CGPGKKCRMN <u>KEENEPRCV</u>
配列番号53 (R78E / K84E)	CENVD CGPGKK <u>CEMNKKNEPRCV</u>
配列番号54 (K(76, 82, 84)E)	CENVD CGPG <u>KECRMNKENEPRCV</u>
配列番号55 (R78E / K82E)	CENVD CGPGKK <u>CEMNKENKPRCV</u>
配列番号56 (R78E / K(82, 84)E)	CENVD CGPGKK <u>CEMNKENEPRCV</u>
配列番号57 (K(76, 81)E)	CENVD CGPG <u>KECRMNEKNKPRCV</u>

10

20

30

40

【表5-2】

配列番号58 (K82T) #	CENVDCGPGKKCRMNK <u>T</u> NKPRCV
配列番号59 (P85T) #	CENVDCGPGKKCRMNKK <u>N</u> KTRCV
配列番号60 (R78N/N80T) #	CENVDCGPGKKC <u>N</u> M <u>T</u> KKNKPRCV
配列番号61 (R86N/V88T) #	CENVDCGPGKKCRMNKK <u>N</u> K <u>P</u> N <u>C</u> T
配列番号62 (K75N/C77T/K82T) #	CENVDCGPG <u>N</u> K <u>T</u> RMNK <u>T</u> NKPRCV
配列番号63 (G74N/K76S) #	CENVDCGPN <u>K</u> S <u>C</u> RMNKKNKPRCV
配列番号64 (G74N/K76T) #	CENVDCGPN <u>K</u> T <u>C</u> RMNKKNKPRCV
配列番号65 (G74N/K76T/P85T) #	CENVDCGPN <u>K</u> T <u>C</u> RMNKK <u>N</u> K <u>T</u> RCV
配列番号66 (C66S/K75N/C77T) #	<u>S</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>T</u> RMNKKNKPRCV
配列番号67 (C66A/K75N/C77T) #	<u>A</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>T</u> RMNKKNKPRCV
配列番号111 (K75N/C77S/K82T) #	CENVDCGPG <u>N</u> K <u>S</u> RMNK <u>T</u> NKPRCV
配列番号112 (C66S/K75N/C77S) #	<u>S</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>S</u> RMNKKNKPRCV
配列番号113 (C66A/K75N/C77S) #	<u>A</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>S</u> RMNKKNKPRCV
配列番号114 K(81, 82) D	CENVDCGPGKKCRMN <u>D</u> DNKPRCV
配列番号115 K(76, 81, 82) D	CENVDCGPG <u>K</u> <u>D</u> CRMN <u>D</u> DNKPRCV
配列番号116 K(76, 82) D	CENVDCGPG <u>K</u> <u>D</u> CRMN <u>K</u> <u>D</u> NKPRCV

\* アミノ酸のナンバリングはFS315配列に対応する（例えば、配列番号2）；アミノ酸変化は下線で示される。

\*\* QSCVVDQQTGSの置換は、J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2): 238に発表された。これは実験的対照として使用された。

# 高グリコシル化バリアント

## 【0132】

## フォリスタチン融合タンパク質

好適な組み換えフォリスタチントンパク質は融合タンパク質構成とすることができると考えられる。例えば、本発明のために好適な組み換えフォリスタチントンパク質は、例えば、フォリスタチントンパク質の安定性、効力、および／または送達を強化または増加させる、または免疫原性もしくはクリアランスを低減または除去することにより、典型的にはフォリスタチントンパク質の治療効果を促進することができる、フォリスタチンドメインと別のドメインまたは部分との間の融合タンパク質とすることができる。フォリスタチントンパク質に対するこうした好適なドメインまたは部分としては、Fcドメイン、XENドメイン、またはヒトアルブミン融合が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0133】

## Fcドメイン

いくつかの実施形態では、好適な組み換えフォリスタチントンパク質は、FcRn受容体に結合するFcドメインまたはその一部分を含む。非限定的な例として、好適なFcドメインは、IgGなどの免疫グロブリンサブクラスに由来してもよい。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、ドメイン Fc ドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 に由来する。いくつかの実施形態では、好適な Fc ドメインは、IgM、IgA、IgD、または IgE に由来する。特に好適な Fc ドメインとしては、ヒトまたはヒト化抗体由來のものが挙げられる。いくつかの実施形態では、好適な Fc ドメインは、修飾ヒトFc部分などの修飾Fc部分である。

【0134】

いくつかの実施形態では、好適な Fc ドメインは、表 6 に提供されるアミノ酸の配列を含む。

【表6】

【表6】例示的なFcドメイン

配列ID番号(説明)	Fcドメイン*
配列番号6(野生型ヒトIgG1Fc)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE SNG QPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号7(ヒトIgG1Fc-LALA)	DKTHTCPPCPAPE <u>AAGG</u> PSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE SNG QPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号8(ヒトIgG1Fc-NHance)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE SNG QPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEAL <u>KFHY</u> TQKSLSLSPGK
配列番号9(ヒトIgG1Fc-LALA+NHance)	DKTHTCPPCPAPE <u>AAGG</u> PSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE SNG QPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEAL <u>KFHY</u> TQKSLSLSPGK
配列番号10	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHN VEVHNA AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVE WE SNG QPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号11	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE SNG QPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

\* EUナンバリングに基づくアミノ酸のナンバリング。LALAおよびNHance突然変異は下線付きである。

10

20

30

40

## 【0135】

いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、相同または同一である

50

アミノ酸の配列を含む。

【0136】

FcドメインとFcRn受容体との間の結合の改善は、組み換えタンパク質の血清半減期の延長をもたらすと考えられる。それゆえに、いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、FcRnへの結合の改善につながる1つ以上のアミノ酸突然変異を含む。FcRnへの結合を改善する効果があるFcドメイン内の様々な突然変異が当技術分野で公知であり、本発明を実施するように適合することができる。いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、EUナンバリングに従い、ヒトIgG1のThr250、Met252、Ser254、Thr256、Thr307、Glu380、Met428、His433、および/またはAsn434に対応する1つ以上の位置に1つ以上の突然変異を含む。10

【0137】

いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、EUナンバリングに従い、ヒトIgG1のL234、L235、H433、およびN434に対応する1つ以上の位置に1つ以上の突然変異を含む。

【0138】

組み換え融合タンパク質のFc部分は、Fc受容体を発現する細胞の標的化につながり、炎症促進性の影響をもたらし得る。Fcドメインにおけるいくつかの突然変異は、組み換えタンパク質のFcガンマ受容体への結合を低減させ、これによってエフェクター機能を阻害する。一実施形態では、エフェクター機能は抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)である。例えば、好適なFcドメインは、L234A(Leu234Ala)および/またはL235A(Leu235Ala)(EUナンバリング)の突然変異を含んでもよい。いくつかの実施形態ではL234A突然変異およびL235A突然変異は、LA突然変異とも呼ばれる。非限定的な例として、好適なFcドメインは、突然変異L234AおよびL235A(EUナンバリング)を含有し得る。L234A突然変異およびL235A突然変異を含む例示的なFcドメイン配列が、表6に配列番号7として示されている。20

【0139】

いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、H433K(His433Lys)および/またはN434F(Asn434Phe)(EUナンバリング)の変異を含有してもよい。非限定的な例として、好適なFcドメインは、突然変異H433KおよびN434F(EUナンバリング)を含有し得る。いくつかの実施形態では、H433K突然変異およびN434F突然変異は、NHance突然変異とも呼ばれる。突然変異H433KおよびN434Fを組み込む例示的なFcドメイン配列が、表6の配列番号8として示される。30

【0140】

いくつかの実施形態では、好適なFcドメインは、L234A(Leu234Ala)、L235A(Leu235Ala)、H433K(His433Lys)、および/またはN434F(Asn434Phe)(EUナンバリング)の突然変異を含有してもよい。非限定的な例として、好適なFcドメインは、L234A、L235A、H433KおよびN434F(EUナンバリング)を含有し得る。突然変異L234A、L235A、H433K、およびN434Fを組み込む例示的なFcドメイン配列が、表6の配列番号9として示される。40

【0141】

Fcドメインに含むことができる追加のアミノ酸置換としては、例えば、米国特許第6,277,375号、同第8,012,476号、および同第8,163,881号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるものが含まれる。

【0142】

リンカーまたはスペーサー

フォリスタチンドメインは、Fcドメインに直接的または間接的に連結されてもよい。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、好適な組み換えフォリスタチンタンパク質は、フォリスタチンドメインと Fc ドメインを結合するリンカーまたはスペーサーを含有する。アミノ酸リンカーまたはスペーサーは、一般的に柔軟性、または 2 つのタンパク質部分の間にアルファヘリックスなどの構造を挟むように設計されている。リンカーまたはスペーサーは比較的短くすることができ、またはより長くすることができる。典型的には、リンカーまたはスペーサーは、例えば、3 ~ 100 ( 例えば、5 ~ 100, 10 ~ 100, 20 ~ 100, 30 ~ 100, 40 ~ 100, 50 ~ 100, 60 ~ 100, 70 ~ 100, 80 ~ 100, 90 ~ 100, 5 ~ 55, 10 ~ 50, 10 ~ 45, 10 ~ 40, 10 ~ 35, 10 ~ 30, 10 ~ 25, 10 ~ 20 ) のアミノ酸長を含有する。いくつかの実施形態では、リンカーまたはスペーサーは、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, または 100 アミノ酸長以上である。典型的には、より長いリンカーは立体障害を減少させ得る。いくつかの実施形態では、リンカーはグリシン残基およびセリン残基の混合物を含む。いくつかの実施形態では、リンカーはトレオニン、プロリン、および / またはアラニン残基をさらに含み得る。それゆえに、いくつかの実施形態では、リンカーは、10 ~ 100, 10 ~ 90, 10 ~ 80, 10 ~ 70, 10 ~ 60, 10 ~ 50, 10 ~ 40, 10 ~ 30, 10 ~ 20, 10 ~ 15 個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, または 95 個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、A L E V L F Q G P ( 配列番号 68 ) からなるリンカーではない。  
10  
20

#### 【 0143 】

非限定的な例として、本発明のために好適なリンカーまたはスペーサーは、以下を含むがこれらに限定されない：

G G G ( 配列番号 69 ) ;

G A P G G G G G A A A A A G G G G G G G A P ( G A G リンカー、配列番号 70 ) ;

G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G G A A A A A G G G G G G A P ( G A G 2 リンカー、配列番号 71 ) ; および

G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P ( G A G 3 リンカー、配列番号 72 ) 。  
30

#### 【 0144 】

好適なリンカーまたはスペーサーは、上記の例示的なリンカーと、少なくとも 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % またはそれ以上相同または同一であるアミノ酸の配列を有するもの、例えば、G A G リンカー ( 配列番号 70 ), G A G 2 リンカー ( 配列番号 71 ), または G A G 3 リンカー ( 配列番号 72 ) も含む。いくつかの実施形態での使用のために好適な追加のリンカーは、2012 年 3 月 2 日に出願された米国特許出願公開第 20120232021 号の中に見出され、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

いくつかの実施形態では、フォリスタチンポリペプチドがその同族リガンド ( 例えば、アクチビン A, ミオスタチン、ヘパリンなど ) のいずれかと結合する能力に実質的に影響を与えることなく、フォリスタチンペプチドを Fc ドメインと関連付けるリンカーが提供される。いくつかの実施形態では、フォリスタチンポリペプチド単独と比較して、フォリスタチンペプチドのヘパリンへの結合が改変されないようなリンカーが提供される。  
40

例示的なフォリスタチン融合タンパク質

#### 【 0145 】

特定の実施形態では、好適な組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、フォリスタチンドメインおよび Fc ドメインを含み、フォリスタチンポリペプチドは、野生型ヒト F S 3 1 5 タンパク質 ( 配列番号 1 または配列番号 2 ), F S 3 0 3 タンパク質 ( 配列番号 3, または配列番号 4 ) または F S 2 8 8 ( 配列番号 5 ) と、少なくとも 50 %, 55

%、60%、65%、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の配列を含む。特定の実施形態では、好適な組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、フォリスタチンポリペプチド、Fcドメイン、およびフォリスタチンポリペプチドをFcドメインと関連付けるリンカーを含み、フォリスタチンポリペプチドは、野生型ヒトF5315タンパク質（配列番号1）またはF5315タンパク質（配列番号2）と、少なくとも50%、55%、60%、65%、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の配列を含む。典型的には、適切な組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、アクチビンAおよびミオスタチンに結合することができる。いくつかの実施形態では、好適な組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、約0.5～6日（例えば、約0.5～5.5日、約0.5～5日、約1～5日、約1.5～5日、約1.5～4.5日、約1.5～4.0日、約1.5～3.5日、約1.5～3日、約1.5～2.5日、約2～6日、約2～5.5日、約2～5日、約2～4.5日、約2～4日、約2～3.5日、約2～3日）のin vivo半減期を有する。いくつかの実施形態では、好適な組み換えフォリスタチン融合タンパク質は、約2～10日の範囲（例えば、約2.5～10日、約3～10日、約3.5～10日、約4～10日、約4.5～10日、約5～10日、約3～8日、約3.5～8日、約4～8日、約4.5～8日、約5～8日、約3～6日、約3.5～6日、約4～6日、約4.5～6日、約5～6日の範囲）のin vivo半減期を有する。

#### 【0146】

非限定的な例として、好適なフォリスタチンFc融合タンパク質は、表7に示すアミノ酸の配列を有してもよい。

10

20

【表7-1】

【表7】例示的なフォリスタチンFc融合タンパク質

配列番号（突然変異の説明*）	例示的な組み換えフォリスタチニ-Fc融合タンパク質#
配列番号73（アミノ酸75～86の欠失；ブレークポイントは^～によって示される）	<p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGR  LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC  KETCENVDCGPGCVCAPDCSNI TWKG PVCGL  DGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGR  ^ ^</p> <p>CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNR  ICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC  LLGRS IGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKC  LWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASD  NATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNS  I SEDTEEEEDEDQDYSFP I SSILEWDKTHT  <i>CPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRT</i>  <i>PEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</i>  <i>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</i>  <i>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY</i>  <i>TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</i>  <i>WESENQQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT</i>  <i>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i></p>
配列番号74（アミノ酸75～84の欠失およびQSCVV D Q T G S の挿入（配列番号14）**）	<p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGR  LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC  KETCENVDCGPG<u>QSCVV</u>DQTGSPRCVCAPDC  SNI TWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ  PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT  NNAYCVTCNR ICPEPASSEQYLCGNDGVTYS  SACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIAKSCCE  DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS  KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL  EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFP I S  SILEWDKTHTC<i>CPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPK</i>  <i>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNW</i>  <i>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</i>  <i>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</i>  <i>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</i>  <i>GFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTTPPVLDSD</i>  <i>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</i>  <i>HNHYTQKSLSLSPGK</i></p>
配列番号75（K(81, 82)A）	<p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGR  LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC  KETCENVDCGPGKKCRMN<u>AAN</u>KPRCVCAPDC  SNI TWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ  PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT  NNAYCVTCNR ICPEPASSEQYLCGNDGVTYS  SACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIAKSCCE  DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS  KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL  EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFP I S</p>

10

20

30

40

【表7-2】

	S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	
配列番号76 (K (76, 81, 82) A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR L ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <span style="color: #0000ff;">G</span> KACRMNA <span style="color: #0000ff;">A</span> ANKPRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSI SEDTEEEEEEDEDQDYSFPIS S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	10
配列番号77 (K 82 E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR L ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <span style="color: #0000ff;">G</span> KKCRMN <span style="color: #0000ff;">K</span> E <span style="color: #0000ff;">N</span> KPRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSI SEDTEEEEEEDEDQDYSFPIS S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	20
配列番号78 (K (75, 76) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR L ST SWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <span style="color: #0000ff;">G</span> E <span style="color: #0000ff;">E</span> CRMNK <span style="color: #0000ff;">N</span> KPRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS	30
		40

【表7-3】

	SACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKD TLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>	10
配列番号79 (K (76, 82) E)	GNCWLRQAKNGRCQVL YKTEL SKEECCSTGR LSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <u>GK</u> <u>E</u> CRMN <u>K</u> <u>E</u> NKPRCVCAPDC SNI TWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKT CRDVFC PGSS TCVVDQT NNAYC VTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKD TLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>	20
配列番号80 (K (81, 82) E)	GNCWLRQAKNGRCQVL YKTEL SKEECCSTGR LSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <u>GK</u> <u>E</u> CRMN <u>E</u> ENKPRCVCAPDC SNI TWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKT CRDVFC PGSS TCVVDQT NNAYC VTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKD TLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLT</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESENQQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>	30
配列番号81 (K (76, 81, 82))	GNCWLRQAKNGRCQVL YKTEL SKEECCSTGR LSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC	40

【表7-4】

E)	KETCENVDCPGK <u>E</u> CRMNE <u>E</u> NKPRCVCAPDC SNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>
配列番号82 (K(76, 81, 82) E/V 88E) )	GNCWLRQAKNGRCQVLKYKTEL SKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCPGK <u>E</u> CRMNE <u>E</u> NKPRCE <u>E</u> CAPDC SNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>
配列番号83 (K 8 4 E)	GNCWLRQAKNGRCQVLKYKTEL SKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCPGKKCRMNKK <u>E</u> PRCVCAPDC SNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSD</u>

10

20

30

40

【表7-5】

	<b><i>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i></b>	
配列番号84 (K (76, 84) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPGKE <u>CRMNKKNE</u> PRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCP <i>PPCPAPEAAGGPSVFLFPPK</i> <i>PKDTLMISRTP</i> EVTCVVVDVS <i>HEDPEVKFNW</i> <i>YVDGVEVHN</i> A <sub>K</sub> T <i>KPREEQYNSTYRVVS</i> VLTV <i>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</i> <i>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</i> <i>GFYPSDIAVEWE</i> NGQ <i>PENNYKTTPPVLDSD</i> <b><i>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i></b>	10
配列番号85 (K (82, 84) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPGKKCRMN <u>KENE</u> PRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCP <i>PPCPAPEAAGGPSVFLFPPK</i> <i>PKDTLMISRTP</i> EVTCVVVDVS <i>HEDPEVKFNW</i> <i>YVDGVEVHN</i> A <sub>K</sub> T <i>KPREEQYNSTYRVVS</i> VLTV <i>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</i> <i>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</i> <i>GFYPSDIAVEWE</i> NGQ <i>PENNYKTTPPVLDSD</i> <b><i>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i></b>	20
配列番号86 (R78E/K84 E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPGKK <u>CEMNKKNE</u> PRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCP <i>PPCPAPEAAGGPSVFLFPPK</i> <i>PKDTLMISRTP</i> EVTCVVVDVS <i>HEDPEVKFNW</i>	30

【表7-6】

	<i>YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDI AVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i>
配列番号87 (K(76, 82, 84) E)	<i>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCPGPK<u>E</u>CRMN<u>K</u><u>E</u>PRCVCAPDC SNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSI SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPCPAPE<u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <i>YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDI AVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i></i>
配列番号88 (R7 8E / K82E)	<i>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCPGPK<u>K</u><u>E</u>EMN<u>K</u><u>E</u>NKPRCVCAPDC SNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSI SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPCPAPE<u>AAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <i>YVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDI AVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i></i>
配列番号89 (R7 8E / K (82, 8 4) E)	<i>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCPGPK<u>K</u><u>E</u>EMN<u>K</u><u>E</u>PRCVCAPDC SNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKTCDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS</i>

10

20

30

40

【表7-7】

	K S D E P V C A S D N A T Y A S E C A M K E A A C C S S G V L L E V K H S G S C N S I S E D T E E E E D E D Q D Y S F P I S S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	10
配列番号90 K (76, 81) E)	G N C W L R Q A K N G R C Q V L Y K T E L S K E E C C S T G R L S T S W T E E D V N D N T L F K W M I F N G G A P N C I P C K E T C E N V D C G P G K E C R M N E K N K P R C V C A P D C S N I T W K G P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q P E L E V Q Y Q G R C K K T C R D V F C P G S S T C V V D Q T N N A Y C V T C N R I C P E P A S S E Q Y L C G N D G V T Y S S A C H L R K A T C L L G R S I G L A Y E G K C I K A K S C E D I Q C T G G K K C L W D F K V G R G R C S L C D E L C P D S K S D E P V C A S D N A T Y A S E C A M K E A A C C S S G V L L E V K H S G S C N S I S E D T E E E E D E D Q D Y S F P I S S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	20
配列番号91 (K 8 2 T)	G N C W L R Q A K N G R C Q V L Y K T E L S K E E C C S T G R L S T S W T E E D V N D N T L F K W M I F N G G A P N C I P C K E T C E N V D C G P G K K C R M N K T N K P R C V C A P D C S N I T W K G P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q P E L E V Q Y Q G R C K K T C R D V F C P G S S T C V V D Q T N N A Y C V T C N R I C P E P A S S E Q Y L C G N D G V T Y S S A C H L R K A T C L L G R S I G L A Y E G K C I K A K S C E D I Q C T G G K K C L W D F K V G R G R C S L C D E L C P D S K S D E P V C A S D N A T Y A S E C A M K E A A C C S S G V L L E V K H S G S C N S I S E D T E E E E D E D Q D Y S F P I S S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	30
配列番号92 (P 8 5 T)	G N C W L R Q A K N G R C Q V L Y K T E L S K E E C C S T G R L S T S W T E E D V N D N T L F K W M I F N G G A P N C I P C K E T C E N V D C G P G K K C R M N K K N K T R C V C A P D C S N I T W K G P V C G L D G K T Y R N E C A L L K A R C K E Q	40

【表7-8】

	PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASTDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPS</u> VFLFPPK <u>PKDTLMISRTP</u> EVT <sup>CVVVDVSHEDPEVKFNW</sup> <sup>YVDGVEVHN</sup> AKTKPREEQYNSTYR <sup>VVS</sup> VLTV <sup>LHQDWLNG</sup> KEYKCKVSNKALPAPIEKTI <sup>SKA</sup> <sup>KGQP</sup> REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK <sup>GFYPS</sup> DIAVEWE <sup>SN</sup> GQPENNYK <sup>TT</sup> PPVLDSD <sup>GSFFLYSKL</sup> TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <sup>HNHYTQKSLSLSPGK</sup>	10
配列番号93 (R78N/N80T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL <sup>SKEECCSTGR</sup> LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <sup>GKKCNMT</sup> KKNKPRCVCAPDC SNI <sup>TWKGPVCGLDGKTYRN</sup> ECA <sup>LKARCKEQ</sup> PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASTDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPS</u> VFLFPPK <u>PKDTLMISRTP</u> EVT <sup>CVVVDVSHEDPEVKFNW</sup> <sup>YVDGVEVHN</sup> AKTKPREEQYNSTYR <sup>VVS</sup> VLTV <sup>LHQDWLNG</sup> KEYKCKVSNKALPAPIEKTI <sup>SKA</sup> <sup>KGQP</sup> REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK <sup>GFYPS</sup> DIAVEWE <sup>SN</sup> GQPENNYK <sup>TT</sup> PPVLDSD <sup>GSFFLYSKL</sup> TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <sup>HNHYTQKSLSLSPGK</sup>	20
配列番号94 (R86N/V88T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL <sup>SKEECCSTGR</sup> LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <sup>GKKCRMNKKNPNC</sup> T <sup>C</sup> APDC SNI <sup>TWKGPVCGLDGKTYRN</sup> ECA <sup>LKARCKEQ</sup> PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCASTDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPS</u> VFLFPPK <u>PKDTLMISRTP</u> EVT <sup>CVVVDVSHEDPEVKFNW</sup> <sup>YVDGVEVHN</sup> AKTKPREEQYNSTYR <sup>VVS</sup> VLTV <sup>LHQDWLNG</sup> KEYKCKVSNKALPAPIEKTI <sup>SKA</sup> <sup>KGQP</sup> REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK <sup>GFYPS</sup> DIAVEWE <sup>SN</sup> GQPENNYK <sup>TT</sup> PPVLDSD <sup>GSFFLYSKL</sup> TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL <sup>HNHYTQKSLSLSPGK</sup>	30 40

【表7-9】

配列番号95 (K75N/C77T/K82T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <u>NK</u> <u>T</u> RMNK <u>T</u> NKPRCVCAPDC SNI TWKG P VCG LDG K TYRNE CALL KAR CKE Q PELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGS STCVVDQT NNAYC VTCNR ICPEPASSEQYL CGNDGV TYS SACHLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCS LCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCP <u>P</u> <u>C</u> PAPE <u>A</u> <u>AGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</u> <u>HEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVS</u> <u>VLT</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESEN</u> <u>GQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>
配列番号96 (G74N/K76S)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <u>NK</u> <u>S</u> CRMNKKNKPRCVCAPDC SNI TWKG P VCG LDG K TYRNE CALL KAR CKE Q PELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGS STCVVDQT NNAYC VTCNR ICPEPASSEQYL CGNDGV TYS SACHLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCS LCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCP <u>P</u> <u>C</u> PAPE <u>A</u> <u>AGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</u> <u>HEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVS</u> <u>VLT</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESEN</u> <u>GQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>
配列番号97 (G74N/K76T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGP <u>NK</u> <u>T</u> CRMNKKNKPRCVCAPDC SNI TWKG P VCG LDG K TYRNE CALL KAR CKE Q PELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGS STCVVDQT NNAYC VTCNR ICPEPASSEQYL CGNDGV TYS SACHLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCS LCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDYSFPIS SILEWDKTHTCP <u>P</u> <u>C</u> PAPE <u>A</u> <u>AGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</u> <u>HEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVS</u> <u>VLT</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u>

10

20

30

40

【表 7 - 10】

	<i>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i>	
配列番号 98 (G 7 4 N / K 7 6 T / P 8 5 T)	<i>GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPNKTRCMNKKNKTRCVCAPDC SNI TWKG P VCG LDG K TYRNE CALL KAR CKE Q PELEVQYQGRCKKT CRDVFC PG S STC VVD QT NNAYC VTC NR ICPEPASSE Q YLC GNDGV TYS SACHLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDY SFP I S SILEWDKTHTC PPCPAPE AAAGGPS VFL FPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i>	10
配列番号 99 (C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T)	<i>GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETSEN VDCGPGNKT RMNKKNKPRCV CAPDC SNI TWKG P VCG LDG K TYRNE CALL KAR CKE Q PELEVQYQGRCKKT CRDVFC PG S STC VVD QT NNAYC VTC NR ICPEPASSE Q YLC GNDGV TYS SACHLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDY SFP I S SILEWDKTHTC PPCPAPE AAAGGPS VFL FPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i>	20
配列番号 100 (C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T)	<i>GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETAEN VDCGPGNKT RMNKKNKPRCV CAPDC SNI TWKG P VCG LDG K TYRNE CALL KAR CKE Q PELEVQYQGRCKKT CRDVFC PG S STC VVD QT NNAYC VTC NR ICPEPASSE Q YLC GNDGV TYS SACHLRKATCLLGRS I GLAYEGKC I KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNS I SEDTEEEEDEDQDY SFP I S</i>	30

【表 7 - 11】

	S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	
配列番号 117 (K (76, 82) D)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPGKD <del>C</del> RMN <del>D</del> DKPRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKT <del>C</del> RDVF <del>C</del> PGSS <del>T</del> CVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATC <del>L</del> LLGRS <del>I</del> GLAYEGKC <del>I</del> KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPV <del>C</del> ASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSI <del>E</del> DT <del>EE</del> EEDEDQDY <del>SFP</del> IS S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	10
配列番号 120 (K (81, 82) D)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPGKKCRMN <del>D</del> DKPRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKT <del>C</del> RDVF <del>C</del> PGSS <del>T</del> CVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS SACHLRKATC <del>L</del> LLGRS <del>I</del> GLAYEGKC <del>I</del> KAKSCE DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDS KSDEPV <del>C</del> ASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSI <del>E</del> DT <del>EE</del> EEDEDQDY <del>SFP</del> IS S I L E W D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V 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 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y 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 Q K S L S L S P G K	20
配列番号 118 (K (76, 81, 82) D)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPC KETCENVDCGPGKD <del>C</del> RMN <del>D</del> DKPRCVCAPDC SNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ PELEVQYQGRCKKT <del>C</del> RDVF <del>C</del> PGSS <del>T</del> CVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTVS	30

40

40

40

40

## 【表7-12】

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

\* アミノ酸のナンバリングはF S 3 1 5配列に対応する（例えば、配列番号2）。

\*\* Q S C V V D Q T G S の置換は、J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2): 238に発表された。これは実験的対照として使用された。

#太字およびイタリックの配列は、位置234および235（下線付き、EUナンバリング）にLA LA突然変異を含むヒトIgG1Fcに対応する（配列番号7）。

10

20

30

40

50

## 【0147】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、F S 3 1 5 K (81, 82) A - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (81, 82) A - G G G - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) A - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) A - G G G - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) A - G G G - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) A - G G G - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81) E - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) E / V 8 8 E - h F c L A L A、F S 3 1 5 W T - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (75, 76) E - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 82) E - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 82) D - h F c L A L A、F S 3 1 5 R 8 6 N / V 8 8 T - h F c L A L A、F S 3 1 5 K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T - h F c L A L A、F S 3 1 5 K 7 5 N / C 7 7 S / K 8 2 T - h F c L A L A、F S 3 1 5 d e l 7 5 - 8 6 - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (81, 82) E - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (81, 82) D - h F c L A L A F S 3 1 5 K 8 2 E - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) E - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81, 82) D - h F c L A L A、F S 3 1 5 R 7 8 N / N 8 0 T - h F c L A L A、F S 3 1 5 P 8 5 T - h F c L A L A、F S 3 1 5 K (76, 81) E - h F c L A L AまたはF S 3 1 5 K 7 5 N / C 7 7 N / K 8 2 T - h F c L A L Aとして指定し得る。

## 【0148】

フォリスタチン-Fc融合タンパク質は、ホモ二量体または単量体構成を含む様々な構成で提供され得ると考えられる。例えば、好適なホモ二量体構成は、両方のFcポリペプチド鎖のN末端に結合した融合パートナー（例えば、フォリスタチンポリペプチド+リンカー）のC末端を有するように設計されてもよい。好適な単量体構成は、一つのFc二量体、または一つのFcモノマーに融合された融合パートナー（例えば、フォリスタチンポリペプチド+リンカー）のC末端を有するように設計されてもよい。単量体構成は、立体障害を低減させ得る。

## 【0149】

本明細書で使用される場合、本明細書で特定された参照タンパク質配列（例えば、参照フォリスタチントンパク質配列）に対する「アミノ酸の配列の同一性パーセント（%）」は、最大配列同一性パーセントを達成するために、いかなる保存的置換も配列同一性の一部としてみなさずに、必要な場合は配列を整列し、ギャップを導入した後の、参照配列中

のアミノ酸残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸の配列の同一性パーセントを決定する目的でのアライメントは、例えば、BLAST、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当技術分野のスキルのうちの様々な方法で達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大アライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。WU-BLAST-2ソフトウェアを使用して、アミノ酸の配列の同一性を決定することが好ましい(Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); http://blast.wustl.edu/blast/README.html)。WU-BLAST-2はいくつかの検索パラメータを使用し、そのほとんどはデフォルト値に設定される。調節可能なパラメータは、以下の値に設定される: overlap span = 1、overlap fraction = 0.125、world threshold(T) = 11。HSPスコア(S)およびHSP S2パラメータは動的な値であり、特定の配列の組成に応じてプログラム自体によって確立されるが、最小値は調整されてもよく、上述のように設定されている。

#### 【0150】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、ミオスタチンの結合および/または活性を阻害する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、ミオスタチンに結合する時、約0.1pM超、約0.5pM超、約1pM超、約5pM超、約10pM超、約50pM超、約100pM超、約500pM超、または約1000pM超のK<sub>D</sub>を有する。組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質の親和性は、例えば、BIAcoreアッセイなどの表面プラズモン共鳴アッセイで、測定され得る。

#### 【0151】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、アクチビンAの結合および/または活性を阻害する。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、アクチビンAに結合する時、約0.1pM超、約0.5超、約1超、約5pM超、約10pM超、約50pM超、約100pM超、約500pM超、または約1000超のK<sub>D</sub>を有する。組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質の親和性は、例えば、BIAcoreアッセイなどの表面プラズモン共鳴アッセイで測定され得る。

#### 【0152】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、野生型フォリスタチン-Fcタンパク質のヘパリンに対する結合親和性と比較して、ヘパリンに対する結合親和性が低下している。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、ヘパリンと結合する時、約0.01nM超、約0.05nM超、約0.1nM超、約0.5nM超、約1nM超、約5nM超、約10nM超、約50nM超、約100nM超、約150nM超、約200nM超、約250nM超、または約500nM超のK<sub>D</sub>を有する。

#### 【0153】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、Fc受容体に結合する時、約1nM超、約5nM超、約10nM超、約50nM超、約100nM超、約500nM超、または約1000nM超のK<sub>D</sub>を有する。いくつかの実施形態では、Fc受容体はFc受容体である。いくつかの実施形態では、Fc受容体は、FcRI、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIIA、またはFcRIIIIBである。

#### 【0154】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、BMP-9に対する結合が最小限であるか、または明らかな結合を有していない。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、BMP-10 に対する結合が最小限であるか、または明らかな結合を有していない。いくつかの実施形態では、最小限または明らかでない結合は、190 pM ~ 2500 pM の範囲で決定される。

#### 【0155】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、ミオスタチン刺激アッセイにおける、約 20 nM 未満、約 15 nM 未満、約 10 nM 未満、約 5 nM 未満、約 4 nM 未満、約 3 nM 未満、約 2 nM 未満、約 1 nM 未満、約 0.5 nM 未満、約 0.25 nM 未満、約 0.1 nM 未満、約 0.05 nM 未満、または約 0.01 nM 未満の IC<sub>50</sub> によって特徴付けられる。

#### 【0156】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、アクチビン A アッセイにおける、約 20 nM 未満、約 15 nM 未満、約 10 nM 未満、約 5 nM 未満、約 4 nM 未満、約 3 nM 未満、約 2 nM 未満、約 1 nM 未満、約 0.5 nM 未満、約 0.25 nM 未満、約 0.1 nM 未満、約 0.05 nM 未満、または約 0.01 nM 未満の IC<sub>50</sub> によって特徴付けられる。

10

#### 【0157】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質の in vivo の投与は、対照と比べて筋肉量の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、筋肉量は、例えば、筋肉の重量である。いくつかの実施形態では、筋肉は、例えば、表 1 に示される 1 つ以上の骨格筋である。いくつかの実施形態では、筋肉は、横隔膜、三頭筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、腓腹筋、長指伸筋、腹直筋、四頭筋、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

20

#### 【0158】

いくつかの実施形態では、フォリスタチン - Fc 投与は筋肥大をもたらす。いくつかの実施形態では、フォリスタチン - Fc 投与は筋肉機能の改善をもたらす。

組み換えフォリスタチンまたは組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質の生成

#### 【0159】

本発明のために好適な組み換えフォリスタチントンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、任意の利用可能な手段によって生成され得る。例えば、組み換えフォリスタチントンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、組み換えフォリスタチントンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質コード核酸を発現するように操作された宿主細胞系を利用することによって組み換えにより生成され得る。代替的または追加的に、組み換えフォリスタチントンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、内因性遺伝子を活性化することによって生成され得る。代替的または追加的に、組み換えフォリスタチントンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、化学合成によって部分的または完全に調製され得る。

30

#### 【0160】

いくつかの例を挙げると、公知の発現システムとしては、例えば、大腸菌、卵、バキュロウイルス、植物、酵母、または哺乳類細胞、例えば CHO 細胞および / または以下に記載されるその他の哺乳類細胞が挙げられる。

40

#### 【0161】

いくつかの実施形態では、本発明のために好適な組み換えフォリスタチントンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、哺乳類細胞で生成される。本発明に従って使用され得る哺乳類細胞の非限定的な例としては、BALB/c マウス骨髄腫株 (NSO / 1, ECACC No : 85110503)、ヒト網膜芽細胞 (PER.C6, Crucell, Leiden、オランダ)、SV40 により形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7, ATCC CRL-1651)、ヒト胎児由来腎臓株 (懸濁培養液中増殖のためにサブクローニングされた HEK293 または 293 細胞、Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59, 1977)、ヒト纖維肉腫細胞株 (

50

例えば、HT1080)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK21, ATCC CCL 10)、チャイニーズハムスター卵巣細胞+/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216, 1980)、マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251, 1980)、サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1 587)、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa, ATCC CCL 2)、イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34)、バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)、ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75)、ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065)、マウス乳腺腫瘍/MMT 060562, ATCC CCL 51)、TRI細胞(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68, 1982)、MRC 5細胞、FS4細胞、およびヒト肝細胞癌株(Hep G2)が挙げられる。

#### 【0162】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト以外の細胞またはヒト細胞から生成された組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、CHO細胞またはHT1080細胞から生成された組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質を提供する。

#### 【0163】

典型的には、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質を発現するように操作された細胞は、本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質をコードする導入遺伝子を含み得る。当然のことながら、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質をコードする核酸は、制御配列、遺伝子制御配列、プロモーター、非コード化配列および/または組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質を発現するためのその他の適切な配列を含み得る。典型的には、コード化領域は、これらの核酸構成要素のうちの1つ以上と動作可能に連結される。

#### 【0164】

導入遺伝子のコード化領域は、特定の細胞型のコドンを使用を最適化するための1つ以上のサイレント突然変異を含み得る。例えば、フォリスタチン導入遺伝子のコドンは、脊椎動物細胞の発現のために最適化されてもよい。いくつかの実施形態では、フォリスタチン導入遺伝子のコドンは、哺乳類細胞、例えばCHO細胞での発現のために最適化され得る。いくつかの実施形態では、フォリスタチン導入遺伝子のコドンは、ヒト細胞の発現のために最適化され得る。

医薬組成物および投与

#### 【0165】

本発明は、本発明による治療有効成分(例えば、組み換えフォリスタチンタンパク質、または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質)を、1つ以上の薬学的に許容可能な担体または賦形剤と一緒に含む医薬組成物をさらに提供する。このような医薬組成物は、随意に1つまたは複数上の追加的治療活性物質を含んでもよい。

#### 【0166】

本明細書に提供される医薬組成物の記述は、ヒトへの倫理的投与のために好適な医薬組成物を主に対象としているが、こうした組成物は一般的に全ての種類の動物への投与のために好適であることを当業者は理解するであろう。様々な動物への投与のために好適な組成物を与えるための、ヒトへの投与のために好適な医薬組成物の修正はよく理解されており、獣医学薬理学者の当業者であれば、もある場合は単に通常の実験を用いて設計および/または実施することができる。

#### 【0167】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学の技術分野で公知の、または今後開発される任意の方法によって調製され得る。一般に、こうした調製方法は、有効成分を希釈剤または別の賦形剤もしくは担体および／または1つ以上のその他の副成分と関連付ける工程、そして次に必要な場合、および／または望ましい場合、製品を望ましい単一用量または複数用量単位へと成形および／または包装する工程を含む。

#### 【0168】

本発明による医薬組成物は、バルクで、単一単位用量および／または複数の単一単位用量として、調製、包装、および／または販売されてもよい。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の有効成分を含む医薬組成物の個別量である。有効成分の量は、対象者に投与されることになる有効成分の投与量と一般的に等しい、かつ／またはこうした投与量の好都合な分数（例えば、このような投与量の半分または3分の1）である。10

#### 【0169】

本発明による医薬組成物中の有効成分、薬学的に許容可能な賦形剤または担体、および／または任意の追加の成分の相対量は、治療される対象者の身元、サイズ、および／または病状に応じて、さらに組成物が投与される経路に応じて変化する。一例として、組成物は、0.1%～100%（w/w）の有効成分を含み得る。

#### 【0170】

医薬製剤は、薬学的に許容可能な賦形剤または担体をさらに含んでもよく、これは本明細書で使用される場合、望ましい特定の剤形のために適する、あらゆるすべての溶媒、分散媒体、希釈剤、またはその他の液体溶媒、分散または懸濁補助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、防腐剤、固体結合剤、潤滑剤およびこれに類するものを含む。RemingtonのThe Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 参照により本明細書に組み込まれる)は、医薬組成物の処方およびその調製のための公知技法に使用される様々な賦形剤を開示している。任意の従来の賦形剤または担体が、何らかの望ましくない生物学的効果を生じるか、そうでなければ医薬組成物のその他任意の構成要素と有害な様式で有害な方法で相互作用することにより、物質またはその誘導体と不適合な場合を除き、その使用は本発明の範囲内であると考えられる。20

#### 【0171】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤または担体は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%純粋である。いくつかの実施形態では、賦形剤または担体は、ヒトおよび獣医での使用のために承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤または担体は、米国食品医薬品局によって承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤または担体は医薬品グレードである。いくつかの実施形態では、賦形剤または担体は、米国薬局方（U.S.P.）、欧州薬局方（E.P.）、英国薬局方、および／または国際薬局方の基準を満たしている。30

#### 【0172】

医薬組成物の製造に使用される薬学的に許容可能な賦形剤または担体には、不活性な希釈剤、分散剤、および／または造粒剤、表面活性薬剤および／または乳化剤、崩壊剤、結合剤、防腐剤、緩衝剤、潤滑剤、および／または油が挙げられるがこれらに限定されない。こうした賦形剤または担体は随意に、医薬製剤に含まれ得る。処方者の判断により、組成物中には、ココアバターおよび坐剤ワックスなどの賦形剤または担体、着色剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、および／または着香剤が存在することができる。40

#### 【0173】

好適な薬学的に許容可能な賦形剤または担体としては、水、塩溶液（例えば、NaCl）、生理食塩水、緩衝生理食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアガム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、炭水化物（ラクトース、アミロース、またはデンプンなど）、糖類（マンニトール、スクロース、または

10

20

30

40

50

その他など)、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど、およびそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。所望であれば、医薬品調製物は、活性化合物と有害に反応しない、またはその活性を妨害しない補助剤(例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩類、緩衝液、着色剤、香味および/または芳香物質など)と混合することができる。好ましい実施形態では、静脈内投与のために好適な水溶性担体が使用される。

#### 【0174】

望ましい場合、好適な医薬組成物または薬剤は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはPh緩衝剤も含むことができる。組成物は、液体溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸薬、カプセル、徐放性製剤、または粉末とすることができます。組成物はまた、従来の結合剤およびトリグリセリドなどの担体とともに、坐剤として製剤化することができる。口腔製剤としては、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンブン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を挙げることができる。

10

#### 【0175】

医薬組成物または薬剤は、ヒトへの投与のために適合された医薬組成物として日常的な手順に従って製剤化することができる。例えば、いくつかの実施形態では、静脈内投与のための組成物は典型的には、滅菌等張性水性緩衝液中の溶液である。必要に応じて、組成物は可溶化剤および注射部位の痛みを緩和する局所麻酔も含み得る。一般的に、成分は、例えば、有効成分の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封された容器中、乾燥凍結粉末または無水濃縮物として、単位剤形で別個にまたは一緒に混合されて供給される。組成物が注入によって投与される場合、組成物は、滅菌医薬品グレード水、生理食塩水、またはデキストロース/水を含む注入瓶とともに分与することができる。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合してもよいように、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。

20

#### 【0176】

本明細書に記載される組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、中性形態または塩形態として製剤化することができる。薬学的に許容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する遊離アミノ基で形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来する遊離カルボキシル基で形成されるものが挙げられる。

30

#### 【0177】

医薬品の製剤および/または製造における一般的な考慮事項は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005(参照により本明細書に組み込まれる)に見出され得る。

40

#### 【0178】

##### 投与経路

本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質(または本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質を含有する組成物もしくは薬剤)は、任意の適切な経路によって投与される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質、またはそれを含有する医薬組成物は、全身投与される。全身投与は、静脈内、皮内、吸入、経皮(局所的)、眼内、筋肉内、皮下、筋肉内、経口、および/または経粘膜投与であり得る。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質またはそれらを含有する医薬組成物は、皮下投与される。本明細書で使用される場合、「皮下組織」という用語は、皮膚のすぐ下の緩い、不

50

規則な結合組織の層として定義される。例えば、皮下投与は、大腿部領域、腹部領域、臀部領域、または肩甲骨領域を含むがこれらに限定されない区域に組成物を注入することによって実施され得る。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質またはそれらを含有する医薬組成物は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質またはそれらを含有する医薬組成物は、経口投与される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質、組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質またはそれらを含有する医薬組成物は、筋肉内投与される。例えば、筋肉内投与は、大腿部領域、腹部領域、臀部領域、肩甲骨領域の筋肉、または表 1 に開示される任意の筋肉を含むがこれらに限定されない区域に組成物を注入することによって実施され得る。望ましい場合、2つ以上の経路を同時に使用することができる。

10

#### 【0179】

いくつかの実施形態では、投与は、個人に局所的効果のみを生じさせる一方、他の実施形態では、投与は、個人の複数の部分全体を通して効果をもたらし、例えば、全身効果をもたらす。典型的には、投与は、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質の1つ以上の標的組織への送達をもたらす。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、心臓、脳、脊髄、横紋筋（例えば、骨格筋）、平滑筋、腎臓、肝臓、肺、および／または脾臓を含むがこれらに限定されない、1つ以上の標的組織に送達される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、心臓に送達される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、横紋筋、特に骨格筋に送達される。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - Fc 融合タンパク質は、三頭筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、腓腹筋、二頭筋、僧帽筋、三角筋、四頭筋、および／または横隔膜に送達される。

20

#### 【0180】

##### 剤形および投与レジメン

いくつかの実施形態では組成物は、治療有効量で、かつ／または特定の望ましい転帰（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーの治療またはリスク低減）と相関する投与レジメンに従って投与される。

30

#### 【0181】

本発明に従って投与される特定の用量または量は、例えば、望ましい転帰の性質および／または程度、投与の経路および／またはタイミングの詳細、ならびに／または1つ以上の特徴（例えば、体重、年齢、個人歴、遺伝的特性、ライフスタイルパラメータ、心臓障害の重症度および／もしくは心臓障害リスクの程度など、またはその組み合わせ）に応じて、変動し得る。こうした用量または量は、当業者によって決定することができる。いくつかの実施形態では、適切な用量または量は、標準的な臨床技法に従って決定される。代替的または追加的に、いくつかの実施形態では、適切な用量または量は、投与される望ましい量または最適な投与範囲または量を特定するのに役立つ1つ以上のin vitroまたはin vivoアッセイの使用を通して決定される。

40

#### 【0182】

様々な実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質は治療有効量で投与される。一般に、治療有効量は、対象者に対して有意義な利益を達成するのに十分である（例えば、基礎疾患または病状の治療、調節、治癒、予防および／または改善）。いくつかの特定の実施形態では、投与される適切な用量または量は、in vitroモデルまたは動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から外挿によって推定される場合がある。

#### 【0183】

いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーの治療用の治療有効量のフォリスタチン - Fc は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、静脈内投与される治療有効量は、動物またはヒトの体重の約0.5 mg / kg～約7.5 mg / kgであるが、この例示的範

50

囲より上またはそれより下の投与量も本開示の範囲内である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、動物またはヒトの体重の約 $0.5\text{ mg/kg}$ ~ $75\text{ mg/kg}$ である（すなわち、治療有効量は約 $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $11$ 、 $12$ 、 $13$ 、 $14$ 、 $15$ 、 $16$ 、 $17$ 、 $18$ 、 $19$ 、 $20$ 、 $21$ 、 $22$ 、 $23$ 、 $24$ 、 $25$ 、 $26$ 、 $27$ 、 $28$ 、 $29$ 、 $30$ 、 $31$ 、 $32$ 、 $33$ 、 $34$ 、 $35$ 、 $36$ 、 $37$ 、 $38$ 、 $39$ 、 $40$ 、 $41$ 、 $42$ 、 $43$ 、 $44$ 、 $45$ 、 $46$ 、 $47$ 、 $48$ 、 $49$ 、 $50$ 、 $51$ 、 $52$ 、 $53$ 、 $54$ 、 $55$ 、 $60$ 、 $65$ 、 $70$ 、または約 $75\text{ mg/kg}$ である）。いくつかの実施形態では、静脈内投与される治療有効量は、約 $5\text{ mg/kg}$ 、 $10\text{ mg/kg}$ 、 $15\text{ mg/kg}$ 、 $20\text{ mg/kg}$ および $25\text{ mg/kg}$ である。

## 【0184】

10

いくつかの実施形態では、治療有効量は、約 $5.0$ ~ $18.0\text{ mg/kg}$ （すなわち、 $5.5$ 、 $6.0$ 、 $6.5$ 、 $7.0$ 、 $7.5$ 、 $8.0$ 、 $8.5$ 、 $9.0$ 、 $9.5$ 、 $10.0$ 、 $10.5$ 、 $11.0$ 、 $11.5$ 、 $12.0$ 、 $12.5$ 、 $13.0$ 、 $13.5$ 、 $14.0$ 、 $14.5$ 、 $15.0$ 、 $15.5$ 、 $16.0$ 、 $16.5$ 、 $17.0$ 、 $17.5$ および $18.0\text{ mg/kg}$ 、ならびにその間の任意の値）で静脈内投与される。いくつかの実施形態では、有効量は少なくとも約 $8\text{ mg/kg}$ である。いくつかの実施形態では、有効量は少なくとも約 $10\text{ mg/kg}$ である。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、月に1回行われる。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、月に2回行われる。

## 【0185】

20

いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーの治療のためのフォリストチン-Fc治療有効量が皮下投与される。いくつかの実施形態では、皮下投与される治療有効量は、動物またはヒトの体重の約 $20\text{ mg/kg}$ ~ $110\text{ mg/kg}$ である（すなわち、治療有効用量は約 $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $35$ 、 $40$ 、 $50$ 、 $55$ 、 $60$ 、 $65$ 、 $70$ 、 $75$ 、 $80$ 、 $85$ 、 $90$ 、 $95$ 、 $100$ 、 $105$ 、または約 $110\text{ mg/kg}$ である）。いくつかの実施形態では、皮下投与される治療有効用量は、動物またはヒトの体重の約 $1.0\text{ mg/kg}$ ~ $50\text{ mg/kg}$ である（すなわち、治療有効量は約 $1.0$ 、 $1.5$ 、 $2.0$ 、 $2.5$ 、 $3.0$ 、 $3.5$ 、 $4.0$ 、 $4.5$ 、 $5.0$ 、 $5.5$ 、 $6.0$ 、 $6.5$ 、 $7.0$ 、 $7.5$ 、 $8.0$ 、 $8.5$ 、 $9.0$ 、 $9.5$ 、 $10.0$ 、 $11.0$ 、 $12.0$ 、 $13.0$ 、 $14.0$ 、 $15.0$ 、 $16.0$ 、 $17.0$ 、 $18.0$ 、 $19.0$ 、 $20.0$ 、 $21.0$ 、 $22.0$ 、 $23.0$ 、 $24.0$ 、 $25.0$ 、 $26.0$ 、 $27.0$ 、 $28.0$ 、 $29.0$ 、 $30.0$ 、 $31.0$ 、 $32.0$ 、 $33.0$ 、 $34.0$ 、 $35.0$ 、 $36.0$ 、 $37.0$ 、 $38.0$ 、 $39.0$ 、 $40.0$ 、 $41.0$ 、 $42.0$ 、 $43.0$ 、 $44.0$ 、 $45.0$ 、 $46.0$ 、 $47.0$ 、 $48.0$ 、 $49.0$ 、および約 $50\text{ mg/kg}$ である）。いくつかの実施形態では、皮下投与される治療有効量は、約 $3\text{ mg/kg}$ 、 $5\text{ mg/kg}$ 、 $10\text{ mg/kg}$ 、 $15\text{ mg/kg}$ 、 $20\text{ mg/kg}$ 、 $25\text{ mg/kg}$ および $30\text{ mg/kg}$ である。

30

## 【0186】

いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーの治療のためのフォリストチン-Fc治療有効量が皮下投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量が約 $1.5$ ~ $7.0\text{ mg/kg}$ （すなわち、 $1.5$ 、 $2.0$ 、 $2.5$ 、 $3.0$ 、 $3.5$ 、 $4.0$ 、 $4.5$ 、 $5.0$ 、 $5.5$ 、 $6.0$ 、 $6.5$ および $7.0\text{ mg/kg}$ 、ならびにその間の任意の値）で皮下投与される。いくつかの実施形態では、治療有効量は少なくとも約 $2.0\text{ mg/kg}$ である。いくつかの実施形態では、治療有効量は少なくとも約 $3.0\text{ mg/kg}$ である。いくつかの実施形態では、皮下投与は、週に1回行われる。いくつかの実施形態では、皮下投与は、週に2回行われる。いくつかの実施形態では、皮下投与は、2週間に1回行われる。

40

## 【0187】

50

いくつかの実施形態では、フォリストチン-Fcタンパク質は、用量比例性を有する。いくつかの実施形態ではであるフォリストチン-Fcタンパク質は、用量直線性を有する。いくつかの実施形態では、投与用量の増加が曝露および転帰の比例的増加を伴う場合、用量比例性および/または用量直線性が生じる。いくつかの実施形態では、投与用量が高いほど、有益な転帰に対する効果が大きくなる。いくつかの実施形態では、治療された対

象者の体重は、用量に依存する様式で増加する。

【0188】

いくつかの実施形態では、フォリスタチン - F c 投与は筋肥大をもたらす。いくつかの実施形態では、フォリスタチン - F c 投与は筋肉機能の改善をもたらす。いくつかの実施形態では、四頭筋および横隔膜の病理は、操作されたフォリスタチン治療に伴い改善される。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーを有する対象者のフォリスタチン - F c 治療は、ミオスタチン拮抗薬を用いた治療より大きい筋肉機能の改善をもたらす。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーを有する対象者のフォリスタチン - F c 治療は、ミオスタチン拮抗薬を用いた治療より大きい筋肉病理の改善をもたらす。

【0189】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は医薬製剤として提供される。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーの発生率またはリスクの低減の達成と相関する投与レジメンに従って投与するための単位用量であるか、またはそれを含む。

【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質を含む製剤は、単回投与として投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質を含む製剤は、一定の間隔で投与される。本明細書で使用される場合、ある「間隔」での投与は、治療有効量が定期的に投与されること（単回投与と区別される）を示す。間隔は、標準的な臨床技法によって決定することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質を含む製剤は、隔月、毎月、月に2回、3週間ごと、隔週、毎週、週に2回、週に3回、毎日、1日に2回、または6時間ごとに投与される。単一の個人に対する投与間隔は、固定間隔である必要はなく、個人のニーズに応じて経時的に変更することができる。

【0191】

本明細書で使用される場合、「隔月」という用語は2ヶ月に1回（すなわち、2ヶ月ごとに1回）の投与を意味し、「毎月」という用語は月に1回の投与を意味し、「3週間ごと」という用語は3週間に1回（すなわち、3週間ごとに1回）の投与を意味し、「隔週」という用語は、2週間に1回（すなわち、2週間ごとに1回）の投与を意味し、「毎週」という用語は週に1回の投与を意味し、「毎日」という用語は1日に1回の投与を意味する。

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質を含む製剤は、一定の間隔で無期限に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質を含む製剤は、一定の間隔で定められた期間の間投与される。

【0193】

本明細書に記載されるように、「治療有効量」という用語は、本発明の医薬組成物に含まれる治療薬の総量に基づいて主に決定される。治療有効量は、複数の単位用量を含んでもよい投与レジメンで一般的に投与される。任意の特定の組成物については、治療有効量（および／または有効投与レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路または他の医薬品との組み合わせに依存して異なり得る。

【0194】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質の投与は、少なくとも1つのDMDの兆候もしくは症状の強度、重症度、もしくは頻度を低減させるか、または開始を遅延させる。いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン - F c 融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質の投与は、筋消耗、骨格変形、心筋症、筋虚血、認知機能障害、および呼吸機能障害からなる群から選択される少なくとも1つのDMDの兆候もしくは症状の強度、重症度、もしくは頻度を低減させるか、または開始を遅延させる。

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質の投与は、6分間歩行試験、定量的筋力試験、時間運動能力試験によって測定された臨床的転帰を改善する。BrookeおよびVignos四肢機能スケール、肺機能試験（努力性肺活量、1秒量、最大呼気流量、最大吸気圧および呼気圧）、健康関連の生活の質、膝および肘屈筋、肘伸筋、肩外転、握力、背臥位からの立ち上がり所要時間、North Star Ambulatory Assessment、10メートル歩行/走行時間、Egen-Klasseificationスケール、Gowersスコア、HammerSmith運動能力、徒手筋力計、可動域、ゴニオメトリー、高炭酸ガス血症、Nayley乳幼児発達尺度、および/または介護者負担感尺度。

10

#### 【0196】

##### 併用療法

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質は、筋ジストロフィーの治療に現在使用されている1つ以上の公知の治療薬（例えば、コルチコステロイド）と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、公知の治療薬は、その標準的もしくは承認された投与レジメンおよび/またはスケジュールに従って投与される。いくつかの実施形態では、公知の治療薬は、その標準的もしくは承認された投与レジメンおよび/またはスケジュールと比較して改変されたレジメンに従って投与される。いくつかの実施形態では、こうした改変されたレジメンは、1つ以上の単位用量の量が改変されている（例えば、低減または増加）という点で、および/または投与の頻度が改変されている（例えば、単位用量間の1つ以上の間隔が拡大され、結果的に頻度がより低くなる、または間隔が低減され、結果的に頻度がより高くなる）という点で、標準的または承認された投与レジメンとは異なる。

20

#### 【0197】

いくつかの実施形態では、組み換えフォリスタチンタンパク質または組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質は、1つ以上の追加的治療薬と組み合わせて投与される。一実施形態では、追加的治療薬はコルチコステロイド（例えば、プレドニゾン）である。別の実施形態では、追加的治療薬はグルココルチコイド（例えば、デフラザコート）である。別の実施形態では、追加的治療薬は抗F1t-1抗体またはその抗原結合性断片である。別の実施形態では、追加的治療薬はRNA調節治療薬である。RNA調節治療は、エクソンスキッピング治療または遺伝子治療であってもよい。RNA調節治療薬は、例えば、Drisapersen、CAT-1004、FG3019、PRO044、PRO045、Eteplirsen(AVI-4658)、SRP-4053、SRP-4045、SRP-4050、SRP-4044、SRP-4052、SRP-4055、またはSRP-4008であってもよい。いくつかの実施形態では、追加的治療薬は、筋ジストロフィーの治療に現在使用されている。他の実施形態では、追加的な治療薬は、他の疾患または障害を治療するためにも使用される場合がある。いくつかの実施形態では、公知の治療薬は、その標準的もしくは承認された投与レジメンおよび/またはスケジュールに従って投与される。いくつかの実施形態では、公知の治療薬は、その標準的もしくは承認された投与レジメンおよび/またはスケジュールと比較して改変されたレジメンに従って投与される。いくつかの実施形態では、こうした改変されたレジメンは、1つ以上の単位用量が量的に改変されている（例えば、低減または増加）という点で、および/または投与の頻度が改変されている（例えば、単位用量間の1つ以上の間隔が拡大され、結果的に頻度がより低くなる、または間隔が低減され、結果的に頻度がより高くなる）という点で、標準的または承認された投与レジメンとは異なる。

30

40

#### 【実施例】

50

## 【0198】

## 実施例

## 実施例1. フォリスタチン - Fc 融合タンパク質はミオスタチンを標的とする

この実施例は、標的リガンドおよび非標的リガンドに結合しているフォリスタチン - Fc 融合タンパク質を例示する。理論に束縛されるものではないが、ミオスタチンおよびアクチビンAによる Smad2 / 3 経路の活性化は、筋原性タンパク質発現の阻害につながり、結果として筋芽細胞は筋肉へと分化しないと考えられる。したがって、ミオスタチンおよびアクチビンAは、筋肉再生の刺激のために実行可能な標的と見なされる。しかしながら、可溶性アクチビン受容体 II B型 (SactriIB) などの多くのミオスタチンおよびアクチビンA拮抗薬も、ある特定の構造的類似性に起因して骨形成タンパク質 (BMP) に結合する。BMP、特に BMP-9 および BMP-10 は、身体全体を通して組織構造を編成する中心的な形態形成シグナルであると見なされる。こうした BMP の阻害は、望ましくない病的状態につながる場合がある。フォリスタチンはまた、3つのFSドメインのうちの最初において、塩基性ヘパリン結合配列 (HBS) を通して細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンにも結合する。理論に束縛されるものではないが、例えば、HBSの突然変異または欠失による、ヘパリン結合の不活性化、低減または調節は、フォリスタチンおよび / またはフォリスタチン融合タンパク質の in vivo 曝露および / または半減期を増加し得る。下記に詳細に説明するように、本実施例で説明される実験的データは、フォリスタチン - Fc 融合タンパク質が、高い親和性を有するミオスタチンを特異的に標的とし、かつ非標的 BMP またはヘパリンには意義のある親和性で結合しないことを確認する。

10

20

20

## 【0199】

具体的には、ミオスタチン、アクチビンA、ヘパリンBMP-9 および BMP-10 に対するフォリスタチン - Fc 融合タンパク質の結合親和性 ( $K_D$ ) および動態を、以下に説明されるように、BIAcore (登録商標) アッセイおよび標準方法を使用して評価した。

## 【0200】

ミオスタチンに対する結合親和性および動態を決定するために、抗ヒトFc (GEカタログ番号BR-1008-39) を、 $10 \mu\text{l}/\text{分}$  の流量で 420 秒間、2つのフローセル CM5 チップの上へと固定化した。ランニング緩衝液は HBS-EP+ であった。すべての試料および対照を、ランニング緩衝液を使用して  $10 \mu\text{g}/\text{ML}$  に希釈した。ミオスタチン ( $4 \text{mM}$  の HC1 中  $0.1 \text{mg}/\text{mL}$ ) (R&D Systems、カタログ番号 788-G8-010/CF) を、 $25 \text{kDa}$  の分子量に基づいて  $0.3125, 0.625, 1.25, 2.5$ 、および  $5 \text{nM}$  に希釈した。アッセイは、 $50 \mu\text{L}/\text{分}$  の流量で 8 秒の捕捉設定、 $50 \mu\text{L}/\text{分}$  の流量で 300 秒間の会合および  $50 \mu\text{L}/\text{分}$  の流量で 1200 秒間の解離に続いて、 $3 \text{M}$  の  $\text{MgCl}_2$  を使用した  $60 \mu\text{L}/\text{分}$  の流量で 30 秒間の再生を行うことにより実施した。

30

## 【0201】

アクチビンAの結合親和性および動態を決定するために、抗ヒトFc (GEカタログ番号BR-1008-39) を、 $10 \mu\text{L}/\text{分}$  の流量で 420 秒間、2つのフローセル CM5 チップの上へと固定化した。ランニング緩衝液は HBS-EP+ であった。すべての試料および対照を、ランニング緩衝液を使用して  $10 \mu\text{g}/\text{ML}$  に希釈した。アクチビンA ( $4 \text{mM}$  の HC1 中  $0.1 \text{mg}/\text{mL}$ ) (R&D Systems、カタログ番号 338-AC-050/CF) を、 $26 \text{kDa}$  の分子量を使用して  $0.156, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5$ 、および  $2.5 \text{nM}$  に希釈した。

40

## 【0202】

ヘパリンの結合親和性および動態を決定するために、ビオチニル化ヘパリンを  $1 \text{mg}/\text{mL}$  でアッセイ当日に調製し、次に HBS + N 中で  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  へと希釈した。ストレプトアビシンチップフローセルを、HBS + N 緩衝液を使用して  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  で  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  にて 5 分間、固定化することにより調製した。試料を、HBS + EP 中で 0

50

. 31 nM ~ 25 nM の濃度まで希釈した。アッセイは、30 µL / 分の流量で300秒の会合時間、および300秒の解離時間を使用し、続いて30秒間4MのNaClで再生し、直ちに4MのNaClで30秒間第2の再生成を行うことによって実施された。

### 【0203】

BMP-9および/またはBMP-10に対する結合親和性および動態を決定するため、抗ヒトFcを、CM5チップ上で、およそ6000~9000RUでFc3およびFc4に結合した。ActRIIB-Fcタンパク質が、BMP-9およびBMP-10への結合に対する陽性対照(R&D Systems、カタログ番号339-RBB-100)として使用された。BMP-9結合の分析については、すべての試料を2.5 µg/mLに希釈し、またランニング緩衝液はHBS+EPであった。BMP-10結合の分析については、すべての試料を5 µg/mLに希釈し、またランニング緩衝液はHBS+EP+0.5 mg/mL BSAであった。分析条件としては、180秒の接触時間、300秒の解離時間、および30 µL / 分の流量が挙げられる。BMP-9(R&D Systems、カタログ番号3209-BP-010CF)およびBMP-10(R&D Systems、カタログ番号2926-BP-025CF)を25 nMから0.19 nMへと3倍系列希釈法で希釈した。例示的な結果を表8Aおよび表8Bに示す。

【表 8 A - 1】

【表 8 A】選択されたフォリスタチニ-F c 融合タンパク質に対する例示的結合親和性および動態データ

フォリスタチニ-F c 融合タンパク質	ミオスタチン結合KD (pM) 試験範囲 5~0.31 nM	アクチビンA結合KD (pM) 試験範囲 2.5~0.15 nM	ヘパリン結合KD (nM) 試験範囲 25~0.31 nM	BMP-9 試験範囲 25~0.19 nM	BMP-10 試験範囲 25~0.19 nM
F S 3 1 5 W T - h F c	6~10	1~2	0.3	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 W T - h F c L A L A	20.2	未試験	0.16	未試験	未試験
A c t R I I B - F c	未試験	未試験	未試験	0.44	0.9
F S 3 1 5 K (81, 82) A - h F c L A L A	11.9	未試験	1.50	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (81, 82) A - G G G - h F c L A L A	10.7	未試験	1.30	未試験	未試験
F S 3 1 5 K (76, 81, 82) A - h F c L A L A	11.3	未試験	9.40	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 0 3 K (76, 81, 82) A - h F c L A L A	12.7	未試験	0.57	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (76, 81, 82) A - G G G - h F c L A L A	10.9	未試験	3.70	未試験	未試験
F S 3 0 3 K (76, 81, 82) A - G G G - h F c L A L A	11.6	未試験	0.51	未試験	未試験
F S 3 1 5 K 8 2 T - h F c L A L A	15.0	未試験	1.40	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 0 3 K 8 2 T - h F c L A L A	9.7	未試験	0.33	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし

10

20

30

40

【表 8 A - 2】

F S 3 1 5 K 8 2 T - G G G - h F c L A L A	1 3 . 0	未試験	1 . 3 0	未試験	未試験
F S 3 0 3 K 8 2 T - G G G - h F c L A L A	9 . 6	未試験	0 . 1 8	未試験	未試験
F S 3 1 5 K 8 2 E - h F c L A L A	1 1 . 9 0	未試験	1 . 5 0	未試験	未試験
F S 3 1 5 K (7 5 , 7 6) E - h F c L A L A	1 1 . 7 0	未試験	1 . 1 0	未試験	未試験
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1) E - h F c L A L A	1 1	未試験	4	未試験	未試験
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 2) E - h F c L A L A	1 0 . 5 0	未試験	4	未試験	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (8 1 , 8 2) E - h F c L A L A	9 . 8 7	未試験	1 1	未試験	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (8 1 , 8 2) D - h F c L A L A	7 . 0 9	0 . 4 7	2 0 . 6	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1, 8 2) E - h F c L A L A	2~6	1~2	> 2 5	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1, 8 2) D - h F c L A L A	5 . 9 2	0 . 7 6	> 2 5	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1, 8 2) E / V 8 8 E - h F c L A L A	4 . 5	未試験	> 2 5	未試験	未試験
F S 3 1 5 (d e 1 7 5 - 8 6) - h F c L A L A	5 7 . 1 0	未試験	> 2 5	未試験	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 R 8 6 N / V 8 8 T - h F c L A L A	1 2 . 7 0	未試験	1 . 3 0 ~ 1 . 7	未試験	試験範囲内に結合なし

10

20

30

40

【表 8 A - 3】

F S 3 1 5 K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T - h F c L A L A	4 0 . 3 0	未試験	1 4	未試験	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 R 7 8 N / N 8 0 T - h F c L A L A	1 3 . 0 0	未試験	0 . 8 5	未試験	未試験
F S 3 1 5 P 8 5 T - h F c L A L A	1 2 . 4 0	未試験	0 . 3 7	未試験	未試験
F S 3 1 5 C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T - h F c L A L A	2 4 . 4	未試験	F S 3 1 5 w t - h F c より 3 倍少ない	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T - h F c L A L A	6 . 4	未試験	F S 3 1 5 w t - h F c より 3 倍少ない	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし
F S 3 1 5 K (7 6, 8 1, 8 2) E - m F c	1 4 . 8	未試験	> 2 5	未試験	未試験
一価分子：					
m o n o F S 3 1 5 w t - h F c L A L A	2 . 8 9	未試験	2 9 . 2	未試験	未試験
m o n o F S 3 1 5 Δ H B S - h F c L A L A	3 . 3	未試験	> 2 5	未試験	未試験
m o n o F S 3 1 5 K (7 6, 8 1, 8 2) E - h F c L A L A	< 4	未試験	> 2 5	試験範囲内に結合なし	試験範囲内に結合なし

10

20

30

## 【表8B】

【表8B】選択されたフォリスタチン-Fc融合タンパク質に対する例示的結合親和性および動態データ

F S 3 1 5 - h Fcバリアント	ヘパリン結合K D (nM)	ミオスタチン結合K D (pM)	F c R N結合 K D (nM)	c I E F (pI)
野生型	0. 2	20. 2	31. 4	5. 0 7
Δ H B S	ND*	17. 4	48	4. 8 2
de175-86	ND*	57. 1	38. 8	4. 8 3
K84E	0. 9	9. 9	34. 9	5. 0 7
K82E	1. 5	11. 9	10. 5	5. 4 8
K(76, 84)E	0. 8	9	33	4. 8 7
R78E/K84E	0. 8	7. 2	45. 5	5. 0 6
K(75, 76)E	1. 1	11. 7	34. 2	5. 0 5
K(82, 84)E	1. 1	9	45. 1	4. 8 6
R78E/K82E	1. 3	3. 9	53. 3	4. 9 6
K(81, 82)A	1. 5	11. 9	38. 5	5. 3 1
K(76, 82)E	3. 9	10. 5	38. 2	4. 8 9
K(81, 82)E	10. 7	9. 9	40. 8	4. 8 3
K(81, 82)D	20. 6	7. 1	24. 7	4. 8 8
K(76, 81, 82)A	9. 4	11. 3	41. 6	5. 2 4
K(76, 82, 84)E	13. 8	4. 7	50. 8	4. 8 5
K(76, 81, 82)E	ND*	4. 2	44	4. 8 7
K(76, 81, 82)D	ND*	5. 9	59. 9	4. 8 2

ND\* : 試験F S濃度範囲0. 019~25 nM内には検出可能なヘパリン結合はない

## 【0204】

表8に示されるように、フォリスタチン融合タンパク質は高い親和性でミオスタチンと結合するが、BMP-9および/またはBMP-10とは結合しない。BMP-10に結合するフォリスタチン-Fc融合タンパク質を試験する研究では、試験範囲(25000~190 pM)内では運動定数は決定されなかった。これは、最も弱いミオスタチン結合K<sub>D</sub>よりもおよそ430倍高い結合親和性を表す。BMP-9に結合するフォリスタチン-Fc融合タンパク質を試験する研究では、試験範囲(25000~190 pM)内では運動定数は決定されなかった。これは、最も弱いミオスタチン結合K<sub>D</sub>よりもおよそ1400倍高い結合親和性を表す。

## 【0205】

実施例2 F S H B S内の塩基性モチーフ(BBX B)の電荷はヘパリン結合親和性に影響する

抗体Fc断片に融合した場合でさえも、天然F Sの急速なヘパリン媒介性肝クリアランスは、その治療能力を制限する。この制限を克服するために、部位特異的突然変異誘発によるヘパリン結合活性の調節のためにF Sのヘパリン結合ループを標的とした。F S 2 8 8アイソフォームヘパリン結合モチーフ((K(75, 76)A、K(81, 82)AおよびK(76, 81, 82)A)内のリシン残基の突然変異は、競合アッセイでのヘパリン結合の減少をもたらした。2つのBBXBモチーフ内の正に荷電した残基を、負電荷を有するアミノ酸で置換すると、アラニン置換で見られるものよりもさらに大きなヘパリン結合の減少をもたらすと仮定した。この仮説を試験するために、K(81, 82)E、K(81, 82)D、K(76, 81, 82)E、およびK(76, 81, 82)Dバリアントを生成し、K(81, 81)AおよびK(76, 81, 82)Dと比較した。いくつかの実施形態では、本明細書に示されるバリアントおよび野生型は、ヒトg G 1 Fc部分に直接融合したF S 3 1 5アイソフォームの組み換えタンパク質である。F Sバリアントとヘパリンとの間の結合相互作用は、表面プラズモン共鳴(S P R)法を使用して測定された。結合親和性を測定し、平衡解離定数(K<sub>D</sub>)により報告した(表8Aおよび8B)

10

20

30

40

50

)。より負電荷の残基に置換した後、K(81, 82)EおよびK(81, 82)Dは両方とも、K(81, 82)Aと比較してヘパリン結合が7~13分の1に低減し、さらなるヘパリン結合活性の低下を示した。一貫して、三重バリアントK(76, 81, 82)EおよびK(76, 81, 82)Dも、K(76, 81, 82)Aと比較して親和性が大きく低減していた。EおよびD三重バリアントの両方を含有する分子は、試験範囲内では検出可能なヘパリン結合を有しなかった。しかしながら、ヘパリンSPR結合K<sub>D</sub>はK(76, 81, 82)Aに対して9.4nMであり、二重K(81, 82)EおよびK(81, 82)Dバリアントと同等またはより強い親和性を有した。これらのデータは、負の荷電がより少ないしたアミノ酸との置換で、中性アミノ酸で置換された複数部位と同じようにヘパリン結合を低減させることができることを示す。まとめると、FS HBS内の塩基性BBXBモチーフの電荷の変化が、ヘパリンへの結合親和性に有意に影響を及ぼすことをこれらのデータは示した。

#### 【0206】

このデータはまた、2つのBBXBモチーフが改変された三重K(76, 81, 82)EおよびK(76, 81, 82)Dバリアントは、2つのBBXBモチーフのうちの1つだけが改変された二重K(81, 82)EおよびK(81, 82)Dバリアントと比較して親和性のより大きな低減を示すことも実証し、両方のモチーフがヘパリン結合に貢献することを示した(表8B)。ヘパリン結合親和性に対する2つのBBXBモチーフ内の主要な塩基性残基の役割をさらに理解するために、1つ、2つまたは3つの塩基性残基を負に荷電したグルタミン酸Eで置換した一連のバリアントを生成した。より大きな変化を有する2つのHBSバリアントも生成された：1) HBS(残基75~86)が、ヘパリン結合能力を持たないFSD2(残基148~159)からの対応セグメントで置換されたHBS置換バリアント HBS、および2)コア12aaa HBSが欠失しているHBS欠失バリアントde175-86(配列は図8Aおよび8Bにリストされる)。細胞ベースのアッセイにおいて、hFcと融合した組み換え野生型FS315アイソフォームは、ミオスタチンおよびアクチビンに対して、天然FS315(R&D、カタログ番号4889-FN/CF)と同様の効力を有していた。この均等物は「野生型」と名付けられ、全体を通して対照として使用された。SPR結合データは、1つ、2つ、または3つのグルタミン酸置換を有するバリアントのすべてが、野生型と比較して異なる程度の親和性の低下を有することを示した(試験範囲内で4~100倍の低下または検出不能な結合)(表8B)。データは、グルタミン酸置換の程度が増すと、ヘパリン結合が漸進的に低減することを示した。例えば、ヘパリン結合K<sub>D</sub>値は、K82E、K(81, 82)E、およびK(76, 81, 82)Eに対してそれぞれ1.5nM、10.7nMおよび検出不能な結合であった。K(76, 81, 82)E、HBS、およびde175-86バリアントはすべて、類似したヘパリン結合消失を示し(表8B)、FSヘパリン結合親和性が3つの負に荷電した点突然変異で効果的に消滅したことを示した。

#### 【0207】

異なるバリアントを評価することにより、2つのFS BBBXBモチーフにおける塩基性残基の役割に関して次の結論が引き出された。第一に、K(81, 82)E(K<sub>D</sub> 10.7nM)はK(75, 76)E(K<sub>D</sub> 1.1nM)と比べて、結合がおよそ10倍弱いことで示されるように、第二のBBXBモチーフKKNNK(81~84)は第一のBBXBモチーフKKCR(75~78)よりもヘパリン結合において主要な役割を果たした(表8B)。第二に、FS BBBXBモチーフのそれぞれにおける第三の塩基性残基は、ヘパリン結合に対してはるかに弱い効果を有していた。データ(表8B)は次のことを見た；1)両方のモチーフ内に第二の塩基性残基突然変異を有する二重バリアントK(76, 82)Eは、両方のモチーフに第三の塩基性残基R78/K84を有する二重バリアントR78/K84よりも結合が5倍弱い；2)K82E、K78E/82E、およびK(82, 84)EのKDは、それぞれ1.5nM、1.3nM、および1.1nMであり、第3の塩基性残基の突然変異を各モチーフ(R78EおよびK84E)からK82Eバリアントへと加えることは結合親和性に影響を及ぼさなかった；3)K(81, 82)

10

20

30

40

50

E バリアントは K ( 8 2 , 8 4 ) E バリアントよりもヘパリンへの結合が約 10 倍弱く ( 1 0 . 7 nM 対 1 . 1 nM ) 、 K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E は K ( 7 6 , 8 2 , 8 4 ) E よりも結合親和性もはるかに弱く、 K 8 4 の軽微な役割を示した。いくつかの実施形態では、ヘパリン結合について、 F S B B X B モチーフでは第一の 2 つの塩基性残基が、第三の塩基性残基よりも重要であることをデータは示した。まとめると、これらのデータは、アミノ酸置換の量、アミノ酸置換の位置、および残基の電荷がヘパリン結合親和性に影響を及ぼすことを実証した。

## 【 0 2 0 8 】

実施例 2 F c R n 受容体に結合するフォリスタチン - F c 融合タンパク質

F c ドメイン内のいくつかの突然変異は、 F c R n 受容体との結合の低減につながり、これによって in vivo 血清半減期が低減された。フォリスタチン - F c 融合タンパク質の F c R n 受容体への結合親和性を、標準的な方法を使用して評価した。例示的結果が表 9 に示されている。

## 【表 9】

【表 9】例示的 F c R n 結合データ

フォリスタチン - F c 融合タンパク質	KD (nM)
F S 3 1 5 W T - h F c	1 1 4 . 0
F S 3 1 5 K ( 8 1 , 8 2 ) A - h F c L A L A	1 0 7 . 0
F S 3 1 5 K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) A - h F c L A L A	8 6 . 5
F S 3 1 5 K ( 7 6 , 8 2 ) E - h F c L A L A	1 2 5 . 0
F S 3 1 5 K ( 8 1 , 8 2 ) E - h F c L A L A	1 7 8 . 0
F S 3 1 5 K ( 8 1 , 8 2 ) D - h F c L A L A	2 4 . 7
F S 3 1 5 K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E - h F c L A L A	9 6 ~ 1 3 1
F S 3 1 5 K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) D - h F c L A L A	5 9 . 9
F S 3 1 5 Δ H B S - h F c L A L A	3 7 2 . 0
F S 3 1 5 ( d e l 7 5 - 8 6 ) - h F c L A L A	1 2 6 . 0
F S 3 1 5 K 8 2 T -- h F c L A L A	4 4 . 8
F S 3 0 3 K 8 2 T - h F c L A L A	2 7 . 6
F S 3 1 5 R 8 6 N / V 8 8 T - h F c L A L A	6 9 . 5
F S 3 1 5 K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T - h F c L A L A	1 2 6 . 0
F S 3 1 5 C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T - h F c L A L A	2 8 . 0
F S 3 1 5 C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T - h F c L A L A	8 3 . 0
mono F S 3 1 5 K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E - h F c L A L A	4 0 . 6
mono F S 3 1 5 - h F c L A L A	1 2 . 8
mono F S 3 1 5 Δ H B S - h F c L A L A	3 6 . 7

## 【 0 2 0 9 】

F c ドメイン内のいくつかの突然変異は、 F c ガンマ I A 受容体との結合の低減につながり、これによってエフェクター機能が低下した。フォリスタチン - F c 融合タンパク質のガンマ I A 受容体への結合親和性を、標準的な方法を使用して評価した。フォリスタチン - F c 融合タンパク質のガンマ I A 受容体への結合親和性を、標準的な方法を使用して

10

20

30

40

50

評価した。

#### 【0210】

Fcガンマ受容体IAに対する結合親和性を決定するために、フォリスタチン-Fcタンパク質を、酢酸ナトリウムpH5.0中で、2.5 μg/mLに希釈し、CM5チップ上で約150RUにて固定化した。Fcガンマ受容体RIAは、凍結乾燥ストックとしてR&D Systems(カタログ番号1257-Fc-050)から購入した。Fcガンマ受容体IAの分析については、ランニング緩衝液はHBS-P+であった。分析条件としては、180秒の接触時間、600秒の解離時間、および30 μL/分の流量が挙げられる。再生条件は、10 mMのリン酸ナトリウム(pH2.5)、500 mMのNaClを30 μL/分で10秒間、30秒の安定性であった。Fcガンマ受容体IAを62.5 nM～0.49 nMに希釈した。例示的な結果が表10に示されている。

10

20

30

40

50

#### 【表10】

【表10】例示的なFcガンマIA結合データ

フォリスタチン-Fc融合タンパク質	FcガンマIA KD (nM)
FS315wt-hFc (比較基準タンパク質)	0.14
FS315K (76, 81, 82) E-hFcLALA	81.9
FS315K (76, 81, 82) D-hFcLALA	58.8

#### 【0211】

実施例3 フォリスタチン-Fc融合タンパク質は血清半減期を延長した

いくつかの実施形態では、ヘパリンへの結合親和性はin vivoのPKプロファイルに影響する。フォリスタチンは、短い血清半減期を有することが報告されている。例えば、典型的な市販のFS315タンパク質は、約1時間の血清半減期を有する。この例では、図3A、図3B、および表11に示す様々な突然変異を含むフォリスタチン-Fc融合タンパク質のin vivo半減期は、比較タンパク質と比較して有意に延長された血清半減期を有することが決定された。

#### 【0212】

表11. 投与後、フォリスタチン-Fc融合タンパク質の血清レベルを様々な時点で収集した(図3Aおよび図3B)。組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質の血清半減期は、45.7～194時間の範囲であった。

#### 【0213】

塩基性BBXBモチーフの突然変異誘発によって、異なるin vitroヘパリン結合親和性を有する一連のバリエントが生成された。ヘパリン結合は、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの会合に対する代用であり、これはin vivoでの多くのタンパク質の内部移行およびクリアランスのための重要なプロセスである。マウスでの薬物動態について調節されたヘパリン結合を研究した。異なるヘパリン結合親和性を有する選択されたHBSバリエントを、単一静脈内用量で(1 mg/kg)メスのCD1マウスに投与した。これらの分子の血清曝露を、投与後168時間までモニターした。1.0 mg/kgの単回静脈内投与後、野生型は30 mL/時間/kgのクリアランス速度および68時間の半減期を有し、HBSバリエントははるかに低いクリアランス(1.3 mL/時間/kg)および長い半減期(92時間)を有し(表12)、FS315-mFcおよびFFS315-HBS-mFcの報告値と一致した。新たに設計されたヘパリン結合バリエントのすべてが、野生型と比較して改善されたPKプロファイルを示した(図3A、表11)。in vitroのヘパリン結合親和性の低減は、野生型と比較した場合、曲線下面積(AUC)として測定される曝露の増加、およびクリアランスの低減(2～25分の1の範囲)と相關していた(図3Aおよび3B、図4Aおよび4B)。操作されたバリエントの大部分は、半減期の延長も示した(表11)。データは、in vivoのPK

特性に対するヘパリン結合の重大な影響を明確に実証する。

【0214】

以前のレポートでは、組み換え F S 3 1 5 H B S タンパク質は、マウスにおいて組み換え野生型と比較して、A U C および半減期を約 8 倍～約 3 倍改善することが示されている。測定可能なヘパリン結合を示さなかった K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E バリアントは、野生型と比較して、A U C の約 2.5 倍の改善および半減期の約 2 倍の改善を示した（表 1 1）。さらに、K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E は、発明者らの研究の H B S バリアントと比較して、タンパク質発現の増加および凝集の低減を含む、より良好な発展性特性も示した（表 1 1）。本明細書に記載の P K プロファイルの改善および発展性特性に基づき、ヒト F c またはマウス F c のいずれかに融合された K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E バリアントが薬力学試験に使用され、用量に依存した様式で筋肉量の著しい増加および機能的改善をもたらした。

【表 1 1】

【表 1 1】例示的なフォリスタチニ - F c 融合タンパク質の i n v i v o での P K データ

融合タンパク質	用量 ( m g / k g )	T <sub>1/2</sub> (時間)	A U C <sub>INF</sub> (時間 * n g / m L)	% A U C <sub>外挿</sub> (%)	C 1 (M L / 時間 / k g )	V <sub>s s</sub> (m L / k g )
WT ( 比較基準 融合タンパク質 )	1. 0	3. 77	1 5 5 0	2 9. 3	3 2 2	1 4 9 0
K82E	1. 0	9 3. 5	6 7 7 0 0	1 4. 1	1 1. 8	8 0 7
K82T	1. 0	5 8. 9	6 3. 3		1 6	4 2 4
K(81,82)A	1. 0	8 0. 1	1 2 6		8. 0	3 8 5
K(76,81,82)E	1. 0	1 5 4	8 5 1		1. 2	2 2 7
K(76,82)E	1. 0	9 5. 4	2 6 2 0 0 0	1 7. 4	2. 6 7	2 2 2
K(82,84)E	1. 0	6 4. 2	3 3 6 0 0 0	9. 9 7	2. 9 8	1 6 7
K(81,82)E	1. 0	1 0 4	2 3 6 5 0 0	1 7. 6	4. 2 0	4 1 8
K(81,82)D	1. 0	1 9 4	5 2 9 0 0 0	3 7. 7	1. 8 9	3 7 1
R78E/K82E	1. 0	9 4. 5	7 6 0 0 0 0	2 5. 0	1. 3 2	1 5 1
K(76,81,82)A	1. 0	6 0. 4	1 7 9 0 0 0	5. 9 5	4. 4 6	2 0 5
K(76,81,82)E	1. 0	1 1 6	6 4 6 0 0 0	2 8. 8	1. 8 6	2 5 3
K(76,81,82)D	1. 0	8 5. 4	5 9 8 0 0 0	2 1. 7	1. 6 7	1 6 8
K(76,82,84)E	1. 0	7 4. 7	6 3 8 0 0 0	1 7. 3	1. 5 7	1 3 6
(K(76,81,82)E/V88E)	1. 0	8 7. 9	9 9 3 0 0 0	2 6. 1	1. 0 1	1 2 2
R78E/K(82,84)E	1. 0	7 1. 5	4 5 3 0 0 0	1 8. 0	2. 2 1	2 0 2
K75N/C77T/K82T	1. 0	5 5. 6	5 6 6 0 0 0	1 2. 7	0. 8 8 6	7 1. 0
G74N/K76T/P85T	1. 0	4 5. 7	9 2 1 0 0	5. 5 4	1 0. 9	5 0 9
C66A/K75N/C77T	1. 0	5 1. 6	3 3 1 0 0 0	9. 3 7	3. 0 2	1 9 4

【0215】

実施例 4 フォリスタチニ - F c 融合タンパク質はミオスタチンおよびアクチビン A を阻害する

ルシフェラーゼ遺伝子レポーターアッセイを使用して、フォリスタチニ - F c 融合タンパク質がミオスタチンおよびアクチビン A 活性を阻害する能力を試験した。横紋筋肉腫 A 2 0 4 細胞が、p G L 3 ( C A G A ) 1 2 - L u c ブラスミドを用いて安定的に形質移入され、これはホタルルシフェラーゼ遺伝子の前に S m a d 3 選択的応答要素を含有する。1. 2 n M のミオスタチンまたはアクチビン A を S m a d 3 シグナル伝達の刺激に使用した。融合タンパク質を細胞に添加する前に、ミオスタチンまたはアクチビン A のいずれかとともに室温で 3 0 分間インキュベートし、次に 3 7 ℃ で 2 4 時間インキュベーションし

10

20

30

40

50

た後、ルシフェラーゼ活性を測定した。シグナル伝達アッセイに使用されたミオスタチンまたはアクチビンAの濃度は1.2nMであった。表14に示されるように、刺激アッセイ内でフォリスタチン-Fc融合タンパク質はミオスタチンを阻害し、IC<sub>50</sub>は、0.5nM未満～1.5nM超の範囲であった。表12に示されるように、刺激アッセイ内でフォリスタチン-Fc融合タンパク質はアクチビンAを阻害し、IC<sub>50</sub>は、0.5nM未満～1.5nM超の範囲であった。

#### 【0216】

負に荷電したアミノ酸で置換されたFS315-hFcバリアントの中のヘパリン結合親和性について観察された大きな差異（野生型と比較して4～100分の1未満に低減）とは対照的に、本バリアントはミオスタチンに対する結合親和性の変化をほとんど示さなかつた。SPR方法によって決定されたK<sub>D</sub>値を、表8Aおよび8Bに要約する。いくつかのヘパリン結合バリアントは、SPRアッセイによりミオスタチン結合親和性が中程度に改善した（野生型と比較して1.5～5倍の誘導）。HBS欠失バリアントd e 175-86は、野生型と比較して、ミオスタチン結合親和性が3分の1に低減を示した。バリアントがFS生物学的機能を変化させるかどうかを決定するために、バリアントのサブセットを選択し、A204横紋筋肉腫細胞においてSMAD2/3ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して、ミオスタチンおよびアクチビンA誘発性Smad2/3シグナル伝達のバリアントのサブセットによる阻害を評価した。1つ、2つ、または3つの点突然変異を有するすべてのヘパリン結合バリアントについて、ミオスタチンおよびアクチビンシグナル伝達阻害の効力は類似しており、野生型と同等であった（表12および図2A）。HBS欠失(d e 175-86)バリアントは、細胞ベースのアッセイで野生型と比較して、ミオスタチン阻害が約20分の1に、またアクチビン阻害が約5分の1に低減していた（表12および図2A）。しかしながら、HBS置換バリアントHBSに対する機能的低減はなく（表12）、アミノ酸75～86の欠失が分子の構造を変化させ得ることを示唆している。

#### 【0217】

B BX Bモチーフでの突然変異をSPRによって試験し、これらの突然変異が組み換えバリアントのFc部分とFcRnとの相互作用に影響を及ぼすかどうかを評価した。この突然変異はC末端融合Fc領域から遠いFSD1のHBS領域に位置するため、データは、野生型と比較して我々のヘパリン結合バリアントのFcRnに明白な親和性変化がなかったことを示している（表8Aおよび8B）。負に荷電したアミノ酸置換を有するバリアントの大部分、ならびにHBSおよびd e 175-86バリアントについては、等電点(pI)は酸性範囲にシフトした（表8B）。

10

20

30

## 【表12】

【表12】SMAD経路についての細胞ベースのアッセイからのミオスタチンおよびアクチビンAのIC<sub>50</sub>s

試料名	ミオスタチン IC <sub>50</sub> (nM)	アクチビンA IC <sub>50</sub> (nM)
F S 3 1 5 w t - h F c (比較基準タンパク質)	0. 4	0. 7
A c t R I I B - F c	0. 5	0. 5
F S 3 1 5 Δ H B S - h F c L A L A	0. 4	1. 4
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1 , 8 2) A - h F c L A L A	0. 3	0. 7
F S 3 1 5 K 8 2 E -- h F c L A L A	0. 4	0. 6
F S 3 1 5 K (8 1 , 8 2) E - h F c L A L A	0. 6	1. 0
F S 3 1 5 K (8 2 , 8 4) E - h F c L A L A	0. 7	1. 1
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1 , 8 2) E - h F c L A L A	0. 5	0. 7
K (7 6 , 8 2 , 8 4) E	0. 4	1. 0
K (7 6 , 8 1 , 8 2) A	0. 8	1. 1
K (7 6 , 8 1 , 8 2) D	0. 7	1. 1
F S 3 1 5 K (8 1 , 8 2 , 8 4) E - h F c L A L A	0. 4	1. 0
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1 , 8 2) E / V 8 8 E - h F c L A L A	0. 6	0. 6
F S 3 1 5 R 7 8 E / K 8 2 E - h F c L A L A	0. 5	1. 0
F S 3 1 5 R 7 8 E / K (8 2 , 8 4) E - h F c L A L A	0. 5	0. 6
F S 3 1 5 K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T - h F c L A L A	0. 7	1. 1
F S 3 1 5 G 7 4 N / K 7 6 T / P 8 5 T - h F c L A L A	1. 0	1. 3
F S 3 1 5 C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T - h F c L A L A	1. 5	2. 1
F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1 , 8 2) E - m F c	0. 7	0. 8
高グリコシル化バリエント		
K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T	1. 8	3. 4
C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T	1. 5	2. 1
C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T	1. 9	4. 2
K 8 2 T	0. 9	1. 2
G 7 4 N / K 7 6 S	0. 9	1. 3

## 【0218】

実施例5 フオリスタチン - F c 融合タンパク質 - 全身投与の In vivo 有効性

この実施例は、10 mg / kg の投与量で静脈内または皮下投与されたフオリスタチン - F c 融合タンパク質（例えば、F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1 , 8 2) E - H f C l A L A 、F S 3 1 5 K (7 6 , 8 1 , 8 2) E - m F c ）の、野生型マウスおよびデュシェンヌ型筋ジストロフィーの mdx マウスマルヘへの全身投与が、in vivo の筋肉量の増

10

20

30

40

50

加傾向をもたらすことを示す。

#### 【0219】

具体的には1つの研究では、雄のC57BL/6（野生型マウス）に溶媒（すなわち、PBS）またはFS315K（76, 81, 82）E-hFcLALAを、10mg/kgの用量で静脈注射するかまたは20mg/kgの用量で皮下注射することにより週に2回、4週間投与した。第二の試験では、雄のmdxマウスに溶媒（すなわち、PBS）またはFS315K（76, 81, 82）E-mFcを、10mg/kgの用量で皮下注射するか、またはマウス溶解性アクチビン受容体タイプIIBキメラFc融合（ActRIIB-mFc）を、3mg/kgの用量で皮下注射することにより、週に2回、12週間投与した。最後の治療の24時間後に、マウスを屠殺し、腓腹筋および四頭筋を採取し、重量を計測した。表13の例示的なデータは、溶媒のみで治療された腓腹筋および四頭筋と比較して、mdxおよびC57BL/6マウスの両方の腓腹筋または四頭筋の重量には著しい増加があったことを示す。それゆえに、野生型マウスおよびDMDの動物モデルに全身投与した時、組み換えフォリスタチン-Fc融合タンパク質が筋肉量を増加させることが明確な指標があった。mdx研究では、前肢の握力を投与から11週間後に測定した。図7の例示的データは、溶媒のみで治療された動物の握力と比較して、FS315K（76, 81, 82）E-mFcで治療されたmdxマウスの前肢の握力が有意に増加したことを示す。FS315K（76, 81, 82）E-mFcで治療した動物に対する握力の度合いは、ActRIIB-mFc陽性対照で治療したマウスよりも大きく、野生型C57BL/10ScSnJマウスよりも大きかった。

#### 【表13】

	溶媒に対する変化率(%)			
	C57BL/6		mdx	
	腓腹筋	四頭筋	腓腹筋	四頭筋
FS315K（76, 81, 82）E-Hf C1ALA 10mg/kg（静脈内、週に2回）	+28%	+33%		
FS315K（76, 81, 82）E-hFc cLALA 20mg/kg（皮下、週に2回）	+32%	+39%		
FS315K（76, 81, 82）E-mFc 10mg/kg（皮下、週に2回）			31%	36%
ActRIIB-mFc 3mg/kg（皮下、週に2回）			24%	28%

#### 【0220】

##### 実施例6：フォリスタチン構築物の特徴付け

この実施例は、10mg/kgの投与量で静脈内または皮下投与されたフォリスタチン-Fc融合タンパク質（例えば、FS315K（76, 81, 82）E-hFcLALA、FS315K（76, 81, 82）E-mFc）の、野生型マウスおよびデュシェンヌ型筋ジストロフィーのmdxマウスマodelへの全身投与が、in vivoで筋肉量の増加傾向をもたらすことを実証する。

#### 【0221】

フォリスタチン-Fc融合タンパク質に対するpIの変化も評価した。以下の表14は、HBSでのEおよびD突然変異ならびに高グリコシル化バリアントにおける、より酸性のpIへのシフトを示す。pIのシフトは、ヘパリン結合の減少およびin vivo曝露の増加と相關する。

#### 【0222】

cIEFプロファイル（pI範囲）は、NanoPro Instrument（ProteinSimple）を使用して決定された。試験した最終的なタンパク質濃度は0

10

20

30

40

50

. 0 0 2 5 m g / m L であり、1 2 μ L をウェルに装填した。使用された希釈緩衝液は、D P B S および尿素 / C h a p s ( 1 0 M / 0 . 6 % ) であった。使用された追加の試薬には G 2 プレミックス : 4 - 9 ( P r o t e i n S i m p l e 0 4 0 - 9 6 9 ) 、 P i 標準ラダー-1 ( P r o t e i n S i m p l e 0 4 0 - 6 4 4 ) 、一次抗体：ウサギ抗 F S p A B ( A b c a m # a b 4 7 9 4 1 ) 1 : 1 0 0 希釀、二次抗体：ウサギ抗 I g G H R P 抱合体 ( P r o m e g a # 4 0 1 1 ) 1 : 1 0 0 希釀、および基質：ルミノール / 過酸化物 X D R が含まれた。

#### 【表 14】

【表 14】フォリスタチニ- F c 融合タンパク質中の等電点 (p I) 範囲

フォリスタチニ- F c 融合タンパク質	p I 範囲
FS315WT-hFc	5. 5 1 ~ 6. 1 7
FSΔHBS-hFcLALA	4. 8 2 ~ 5. 7 2
FSΔHBS-GGG-hFcLALA	4. 8 2 ~ 5. 7 2
FS315de175-86-hFcLALA	4. 8 3 ~ 5. 2 6
FS315K(81, 82)A-hFcLALA	5. 3 1 ~ 5. 9 6
FS315K(81, 82)A-GGG-hFcLALA	5. 2 3 ~ 5. 9 3
FS315K(76, 81, 82)A-hFcLALA	5. 2 4 ~ 5. 9 3
FS303K(76, 81, 82)A-hFcLALA	5. 2 8 ~ 5. 9 3
FS315K(76, 81, 82)A-GGG-hFcLALA	5. 2 3 ~ 5. 8 7
FS303K(76, 81, 82)A-GGG-hFcLALA	5. 2 3 ~ 5. 9 3
FS315K82T-hFcLALA	5. 2 9 ~ 5. 9 3
FS303K82T-hFcLALA	5. 2 7 ~ 6. 1 4
FS315K82T-GGG-hFcLALA	5. 4 8 ~ 5. 9 5
FS303K82T-GGG-hFcLALA	5. 2 3 ~ 6. 1 5
FS315K82E-hFcLALA	5. 4 8 ~ 6. 0 9
FS315K(75, 76)E-hFcLALA	5. 0 5 ~ 5. 2 6
FS315K(76, 82)E-hFcLALA	4. 8 9 ~ 5. 2 6
FS315K(81, 82)E-hFcLALA	4. 8 3 ~ 5. 2 5
FS315K(81, 82)D-hFcLALA	4. 8 8 ~ 5. 5 9
FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA	4. 8 7 ~ 5. 8 0
FS315K(76, 81, 82)D-hFcLALA	4. 8 2 ~ 5. 6 7
FS315P85T-hFcLALA	5. 5 1 ~ 6. 0 9
FS315R86N/V88T-hFcLALA	5. 4 9 ~ 6. 0 8
FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA	4. 8 9 ~ 5. 2 6
FS315R78N/N80T-hFcLALA	5. 4 7 ~ 6. 0 9
FS315C66A/K75N/C77T-hFcLALA	4. 8 1 ~ 6. 4 7
FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA	4. 8 2 ~ 6. 5 9
FS315K(76, 81, 82)E-mFc	4. 7 ~ 5. 3
MonoFS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA	4. 7 ~ 5. 3
MonoFS315WT-hFcLALA	4. 7 ~ 5. 6 7
MonoFS315 Δ HBS-hFcLALA	4. 8 3 ~ 5. 9

10

20

30

40

#### 【0 2 2 3】

実施例 7 : 卵巣切除した雌の S p r a g u e D a w l e y ラットの卵胞刺激ホルモン ( F S H ) およびミオスタチンレベルに対する組み換えフォリスタチニ- F c の治療の効果 この研究の目的は、卵巣切除した雌の S p r a g u e D a w l e y ラットへの F S 3 1 5 K ( 7 6 , 8 1 , 8 2 ) E - h F c L A L A 、 A C E - 0 3 1 または F S 3 1 5 W T - h F c の単回静脈内 ( ボーラス ) 注射が、卵胞刺激ホルモン ( F S H ) およびミオスタチンレベルに及ぼす効果を評価することであった。

#### 【0 2 2 4】

これらの研究では、卵巣切除した雌のラットに、溶媒 1 ( P B S ) 、溶媒 2 ( 1 0 m M クエン酸塩、 8 % スクロース、 0 . 0 2 % T w e e n ( 登録商標 ) 8 0 、 p H 6 . 5 ) 、

50

溶媒3(20 mMヒスチジン、50 mMアルギニン、6%スクロース、0.005%ポリソルベート20、pH 6.8)、溶媒2中のFS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA、または溶媒3中のFS315WT-hFcの単一用量を静脈内(IV)(ボーラス)注射により投与した。以下の表15は研究設計の概要である。

## 【表15】

【表15】単一の静脈内(ボーラス)注射後の、卵巣切除した雌のSprague Dawleyラットでの卵胞刺激ホルモン(FSH)およびミオスタチンレベルに対する治療の効果についての研究設計

組番	被試験物 <sup>a</sup>	用量レベル(mg/kg)	用量濃度(mg/mL)	投与容積(mL/kg)	雌の数
1	溶媒1	0	0	5	12
2	溶媒2	0	0	5	12
3	溶媒3	0	0	5	12
4	EEE-FS-hFc*	1	0.2	5	12
5		3	0.6	5	12
6		10	2	5	12
7		30	6	5	12
8	ACE-031	10	2	5	12
9	FS315WT-hFc	10	2	5	12

<sup>a</sup> 体重から計算された用量。

\* EEE-FS-hFcはFS315K(76, 81, 82)E-hFcLALAである

## 【0225】

血液試料は、試験-2日目、-1日目、投与前、投与後5分、投与後1、2、6、10、16、24、48、72、168、240、および336時間に、時点および群あたり6匹の雌から抗凝固薬入りの試験管の中へと採取された。これらの試験のFSH濃度データを以下の表16に示す。

## 【表16】

【表16】投与後の平均FSH濃度

時点	平均FSH濃度(ng/mL)									
	溶媒1	溶媒2	溶媒3	1mg/kg EEE-FS-hFc*	3mg/kg EEE-FS-hFc*	10mg/kg EEE-FS-hFc*	30mg/kg EEE-FS-hFc*	10mg/kg ACE-031	10mg/kg FS315WT-hFc	
投与前	21.9	20.3	24.5	29.8	23.6	20.9	25.2	24.3	23.9	
PD5分	25.7	23.9	24.7	23.6	27.1	29.1	23.8	22.3	26.3	
PD1時間	30.0	27.9	30.2	28.1	25.6	20.8	26.1	26.0	26.9	
PD2時間	24.9	26.5	26.0	24.4	24.9	26.3	22.2	22.0	30.4	
PD6時間	27.6	24.0	24.5	21.9	18.4	16.2	18.7	24.5	21.7	
PD10時間	30.4	31.2	30.6	17.0	16.1	15.8	9.5	12.2	13.5	
PD16時間	30.9	27.9	28.9	22.4	12.8	8.8	10.1	19.4	22.7	
PD24時間	29.7	27.4	28.4	17.9	13.6	4.6	2.9	14.7	29.2	
PD48時間	27.9	26.4	29.0	26.0	15.4	8.9	7.0	16.1	30.2	
PD72時間	32.0	28.1	27.4	23.5	20.0	11.2	2.8	14.8	29.5	
PD168時間	28.0	25.6	28.4	26.9	26.8	17.6	13.8	17.1	30.1	
PD240時間	31.3	26.8	32.6	25.6	31.9	25.1	19.6	16.3	28.6	
PD336時間	30.1	27.7	30.0	30.7	31.0	29.9	29.3	24.8	39.9	

PD=投与後、hr=時間、min=分

\* EEE-FS-hFcはFS315K(76, 81, 82)E-hFcLALAである

## 【0226】

10

20

30

40

50

平均被試験物（TA）濃度（すなわち、溶媒1、溶媒2、溶媒3、FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA、ACE-031、またはFS315WT-hFc）を示す生物分析データを以下のPK（薬物曝露）表17にまとめる。

【表17】

【表17】投与後の生物分析データ

時点	平均TA濃度 (ng/mL) (SD)								
	溶媒1	溶媒2	溶媒3	1mg/kg EEE-FS-hFc*	3mg/kg EEE-FS-hFc*	10mg/kg EEE-FS-hFc*	30mg/kg EEE-FS-hFc*	10mg/kg ACE-031	10mg/kg FS315WT-hFc
投与前	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
PD 5分	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	17500.0 (2354.0)	66000.0 (8863.8)	217000.0 (25183.8)	774000.0 (90650.3)	225000.0 (37052.5)	36800.0 (9190.2)
PD 1時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	10200.0 (7308.1)	32900.0 (16645.4)	78500.0 (53774.0)	160000.0 (210793.0)	57600.0 (71006.1)	3920.0 (2022.1)
PD 2時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	12900.0 (958.6)	35800.0 (7922.5)	123000.0 (47016.5)	401000.0 (97890.2)	164000.0 (20719.7)	1570.0 (371.0)
PD 6時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	7230.0 (3304.1)	24900.0 (8544.6)	63000.0 (30004.0)	161000.0 (88094.8)	73700.0 (49048.4)	620.0 (347.1)
PD 10時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	7720.0 (590.4)	22800.0 (4591.9)	73200.0 (13229.1)	238000.0 (53610.7)	151000.0 (21990.9)	263.0 (94.8)
PD 16時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	5060.0 (1024.4)	17200.0 (5205.6)	43300.0 (11025.3)	134000.0 (30675.8)	85000.0 (38208.8)	458.0 (597.6)
PD 24時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	6080.0 (182.7)	14900.0 (1793.0)	44800.0 (9838.3)	1270000 (21903.3)	102000.0 (10660.1)	101.0 (73.2)
PD 48時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	2590.0 (390.2)	8330.0 (1776.9)	14100.0 (3557.2)	65500.0 (5433.0)	78800.0 (14341.1)	301.0 (444.4)
PD 72時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1770.0 (324.3)	6360.0 (1205.9)	25400.0 (10170.1)	68700.0 (6478.3)	71300.0 (10509.1)	54.5 (54.2)
PD 168時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1010.0 (265.3)	2730.0 (814.3)	7360.0 (1592.5)	17900.0 (2463.4)	43600.0 (19076.9)	96.7 (154.1)
PD 240時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	740.0 (157.9)	1610.0 (185.5)	3930.0 (1314.7)	10500.0 (1462.4)	31700.0 (7431.8)	6.2 (15.1)
PD 336時間	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	450.0 (83.5)	939.0 (243.4)	3530.0 (1143.5)	6200.0 (1679.6)	17300.0 (13034.0)	24.7 (51.0)

PD=投与後、hr=時間、min=分

\* EEE-FS-hFcはFS315K(76, 81, 82)E-hFcLALAである

【0227】

薬物動態解析

すべての雌のラットを、それぞれすべての用量レベルのFS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA、ACE-031、またはFS315WT-hFcの単回IVボーラス注入後に、FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA、ACE-031、またはFS315WT-hFcに曝露させた。全体として、AUClastおよびCmaxの観点から、1~30mg/kgの用量範囲で比較すると、FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALAのC1値は低く、すべての用量レベルにわたり0.0246~0.0318mL/min/kgの範囲であった。FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALAのVss値は、すべての用量レベルで0.177~0.212L/kgの範囲であり、ラットの全血量(0.054L/kg)と比較した時、組織への中程度の分布を示唆している。FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALAに対するT1/2値は、すべての用量レベルで74.8~135時間の範囲であった。ACE-031のC1およびVssは、それぞれ0.00812mL/min/kgおよび0.0891L/kgであった。C1値はラットの全血量と比較した場合、低く、組織への分布(Vss)が小さかった。これらの値から、ACE-031のT1/2は134時間となった。SHP619のC1およびVssは、それぞれ2.82mL/min/kgおよび10.1L/kg(両方とも近似値)であった。ラットの全血量と比較した場合、組織への分布(Vss)が高いとき、C1値は低かった。これらの値から、FS315WT-hFcに対してT1/2は60.8時間(近似値)となった。

【0228】

実施例8：フォリスタチン-Fc融合タンパク質の用量予想

10

20

30

40

50

上記の実施例で示されたデータに基づき、筋ジストロフィーの治療に使用するための組み換えフォリスタチン F c 融合タンパク質 ( F S - F c ) に対するヒトにおける有効用量を予測するために、機構的 P K / P D モデルを作製した。以下は、機構的 P K / P D モデルの構造についての解析である。第一に、ミオスタチン / アクチビンシグナル伝達経路に関連する文献を分析して、 P K / P D モデルのパラメータ化、較正、およびバリデーションに使用できるデータを特定した。第二に、ミオスタチン / アクチビン A 結合、および筋肉量増加および F S H 調節を含む P D 評価項目についての関連療法の効果の機構的モデルを開発した。このモデルは、前臨床および臨床曝露、バイオマーカー、ならびにツール分子および文献に報告されたミオスタチン抗体からの有効性データを使用して検証された。  
 Jacobsen L et al., PPMD Connect Conference, June 26 - 29, 2016 を参照のこと。この内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。最後に、機構的 P K / P D モデルを使用して、受容体占有率 ( R O ) 、筋肉量増加、および作用時間を含む、様々な P D 評価項目についての用量反応関係をシミュレーションした。

10

## 【 0229 】

構築された機構的 P K / P D モデルには、3つの区画、すなわち血漿、下垂体、および筋肉が含まれる。このモデルは、 F S - F c の生物学的プロセス、およびミオスタチンおよびアクチビン A とのその相互作用を説明するために設計された。血清から筋肉へおよび下垂体への F S - F c の生体分布を、 P B P K 方法論を使用して推定した。 P B P K 方法論は、 Shah and Bettis AM., J Pharmacokinetic Pharmacodynamics ( 2012 ) 39 : 67 - 86 に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらに、卵巣切除したラットの F S H 調節を使用して、 in vivo でのアクチビン A 阻害を検証した。結果は、ミオスタチンおよびアクチビン A 結合の両方による筋肉内の A ct R I I B R O が、筋肉量増加にリンクすることを示した。筋ジストロフィーの治療に対する B M S - 986089 の使用からの臨床データ ( Jacobsen L et al., PPMD Connect Conference, June 26 - 29, 2016 を参照 ) を使用して、ヒトにおける筋肉量増加のための A ct I I B R O の閾値を確立した。

20

## 【 0230 】

筋肉中のミオタチンおよびアクチビン A 阻害のために A ct R I I B R O を組み込んだ機構的 P K / P D モデルを適用することにより、 F S - F c が、約 3 mg / kg の用量の週に1回皮下投与で、健康なヒトボランティアの筋体積を著しく増加させることが予測された。このモデルはまた、 F S - F C が、約 10 mg / kg の用量の月に1回の静脈内投与で、健康なヒトボランティアの筋体積を著しく増加されることになることも予測した。

30

## 【 0231 】

まとめると、上記の実施例は、 D M D 疾患モデルにおける筋肥大の誘導において組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質が、例えば、全身投与によって非常に効果的であることを実証する。 m d x マウスモデルにおける筋肥大は、前肢の握力の機能的改善に変換された。それゆえに、組み換えフォリスタチン - F c 融合タンパク質は、 D M D の治療のための有効なタンパク質治療薬とすることができます。

40

## 【 0232 】

実施例 9 高グリコシリ化に対して導入された新規 N - 結合型グリコシリ化コンセンサス配列 ( N X T / S )

本実施例は、新しい N - 結合型グリコシリ化コンセンサス配列をヘパリン結合ループへと導入することによる、高グリコシリ化組み換え F S 315 - h F c バリアントの生成を示す。高グリコシリ化突然変異体の作製に対する設定根拠には、免疫原性のリスクを低減させ、クリアランスを低減させるために炭水化物含有量を調節し、負に荷電した嵩高いグリカン構造を加えることによってヘパリン結合を阻害することが含まれた。 H B S 領域内の 74 、 75 、 78 、 80 、 83 、および 86 位にある 6 個のコンセンサス N - 結合型グ

50

リコシル化部位、N X T / S（ここで、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸とすることができます）を示す、10個の新しいバリアントが設計された。追加的炭水化物部分の組み込みの初期検出は、SDS-PAGEの分子量(MW)シフトによって観察された（図5A）。野生型および他のバリアントと比較して、バリアントK75N/C77T/K82Tは、より高いMWへの明確なシフトを示し、グリカンの組み込みを示唆している。2つの追加的なバリアント（C66A/K75N/C77TおよびC66S/K75N/C77T）は、より高いMWへのシフトがそれほど顕著ではないことを示している（図5A）。これらのバリアントの3つすべてが共通の突然変異部位K75N/C77Tを有した。CIEFデータは、K75N/C77T/K82TバリアントがK82Tバリアントと比較して、pIの明確な酸性シフトを有することを示しており（図5B）、これはMWおよびpIシフトの両方を生じさせるK75N部位における負に荷電したグリカン部分の潜在的占有を示した。すべての導入されたN-結合型グリコシル化部位上のグリカン占有の状態をさらに確認するために、LC/MSベースの特徴解析を実施した。ヘパリン結合ループで研究された6つの部位の中で、グリコシル化コンセンサス部位を75位に導入することにより高グリコシル化FSが生成されたことが、LC/MSデータで確認された（表18）。同じK75N/C77T突然変異を含有する3つのバリアントK75N/C77T/K82T、C66A/K75N/C77T、およびC66S/K75N/C77Tは、様々なグリカン占有率（69.7%、39.6%、および21.5%）を有しており、N75上のオリゴ糖モル当たりのシアル酸モル比は同様であった（1.99、1.88、および1.96）（表18）。ポリアクリルアミド電気泳動ゲル上の可動性シフトの程度は、3つの高グリコシル化バリアントに対するN75上のグリカン占有率と一致した（図5Aおよび表18）。野生型、HBSバリアント、および10個のすべての設計グリカンバリアントは、天然FSグリカン部位N112およびN259上で類似のグリカン占有率およびシアル酸含有量を有したが、N95上の占有率はかなり変動していた（表18）。

10

20

## 【表18】

【表18】内因性および高グリコシル化N-結合型グリコシル化部位の特徴付け。グリカン占有率およびシアル酸含有量のパーセントが示されている。

F S 3 1 5 - h F c バリアント	高グリコシル化部位		N 9 5		N 1 1 2		N 2 5 9	
	場所	占有率	シアル 酸含有 量 <sup>a</sup>	占有率	シアル酸 含有量 <sup>a</sup>	占有率	シアル 酸含有 量 <sup>a</sup>	占有率
野生型				14.7%	2.27	13.6%	0.93	96.0%
Δ H B S				22.72%	1.83	20.2%	1.68	98.8%
K 8 2 T	N80	不検出	不検出	49.7%	1.69	16.2%	0.84	97.1%
P 8 5 T	N83	不検出	不検出	9.3%	2.40	18.6%	1.14	97.0%
R 7 8 N / N 8 0 T	N78	不検出	不検出	31.3%	2.37	17.7%	1.02	97.0%
R 8 6 N / V 8 8 T	N86	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	21.0% <sup>b</sup>	1.05 <sup>b</sup>	15.1%	1.02	96.7%
G 7 4 N / K 7 6 T / P 8 5 T	N74: N83:	不検出 不検出	不検出 不検出	15.0%	2.21	23.1%	1.29	95.4%
K 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T	N75 N80	69.7% 不検出	1.96 不検出	47.9%	2.34	16.9%	1.52	97.0%
C 6 6 A / K 7 5 N / C 7 7 T	N75	39.6%	1.88	32.8%	2.27	17.8%	1.44	94.9%
C 6 6 S / K 7 5 N / C 7 7 T	N75	21.5%	1.96	32.9%	2.36	19.7%	1.44	95.1%

<sup>a</sup> オリゴ糖モル当たりのシアル酸モル

<sup>b</sup> 結果はN 8 6 またはN 9 5 におけるグリコシル化を区別しない

## 【0233】

30

実施例10：高グリコシル化バリアントのIn Vitroでの結合の特徴およびIn Vivoでの薬物動態特性

H B S 領域内で新しい高グリコシル化部位を設計する一つの設定根拠は、負に荷電した嵩高なグリカン構造を導入することによってヘパリン結合を阻害する試みであった。N 7 5 上のグリカン占有を有する3つの高グリコシル化バリアントについては、in vitroのヘパリン結合親和性の低減（野生型と比較して約15分の1）は、N 7 5 上で最も高いグリカン占有率を有するだけでなく第二のB B X B モチーフにK 8 2 T 突然変異も有するバリアントK 7 5 N / C 7 7 T / K 8 2 T でのみ観察され（表19）、N 7 5 上の炭水化物のヘパリン結合活性に対する効果は中等度であり得ることを示す。3つの高グリコシル化バリアントは、S P R によって測定した場合、野生型と比較してわずかまたは中等度のミオスタチン結合低減を示した（表19）。A 2 0 4 細胞ベースのレポーターアッセイでは、3つの高グリコシル化バリアントは、野生型および他の非高グリコシル化バリアントと比較してミオスタチン阻害が2~3分の1に低減し、かつアクチビンA阻害が2~4分の1に低減しており（表19および図2のパネルB）、さらなる炭水化物による効力のわずかな阻害を示す。表19は、N-グリコシル化のために新たに設計された1つまたは2つのコンセンサス配列（A s n - X - T h r / S e r ）を有する組み換えF S 3 1 5 - h F c バリアントを示す。ヘパリン、ミオスタチンまたはF c R nへのバリアントの結合は、表面プラズモン共鳴（S P R ）によって決定された。結合親和性を測定し、平衡解離定数（K D ）によって報告した。バリアントの電荷不均一性は、毛管等電点電気泳動（c I E F ）によって決定され、等電点（p I ）の範囲として示されている。

40

50

## 【表19】

【表19】FS-315の高グリコシル化バリアントのIn vitro分析データ。

FS 315-hFcバリアント	ヘパリン結合K <sub>D</sub> (nM)	ミオスタチン結合K <sub>D</sub> (pM)	FcRn結合K <sub>D</sub> (nM)	cIEF (pI)
野生型	0.2	20.2	28.3	5.07~5.89
K82T	1.4	15.0	13.8	5.29~5.93
P85T	0.4	12.4	20.1	5.51~6.09
R78N/N80T	0.9	13.0	20.1	5.47~6.09
R86N/V88T	1.5	12.7	10.8	5.49~6.08
G74N/K76S	0.3	11.6	72.8	5.06~5.88
G74N/K76T	0.5	11.1	43.0	5.06~5.99
G74N/K76T/P85T	0.3	11.6	29.6	4.86~5.87
K75N/C77T/K82T	3.5	40.3	36.2	4.72~5.88
C66A/K75N/C77T	0.3	24.4	27.5	4.81~6.47
C66S/K75N/C77T	0.4	26.0	82.8	4.86~6.47

10

## 【0234】

薬物動態プロファイルへの高グリコシル化の効果を決定するために、野生型、HBS、非高グリコシル化バリアントK82T、および2つの高グリコシル化バリアントK75N/C77T/K82TおよびC66A/K75N/C77Tを使用して、マウスPK研究を実施した。非高グリコシル化変異体K82Tは、野生型と比較してわずかに改善されたPKの特徴を有したが、2つの高グリコシル化バリアントは、野生型と比較して著しく改善されたPKプロファイルを有した（図6および表11）。バリアントC66A/K75N/C77Tは、野生型と比較して約10倍高い曝露を示し、バリアントK75N/C77T/K82Tは、約17倍高い曝露を示し、これはHBSバリアントと類似していた（表11）。K75N/C77T/K82TバリアントはC66A/K75N/C77Tより高いグリカン含有量および低いin vitroヘパリン結合を有し、ヘパリン結合活性およびグリコシル化含有量の両方を調節することが、望ましいFS治療分子を設計するための魅力的なアプローチとなり得ることを示した。

20

実施例11：FS-EEEE-mFcの投与は、用量に依存した様式で体重増加をもたらす操作されたフォリスタチンおよび全身送達は、野生型マウスの筋肥大をもたらす

30

## 【0235】

野生型C57BL/6マウスおよび4週間の投与を使用した研究において、2つの操作されたフォリスタチン分子を用いた。一つの研究では、FS-EEEE-mFc（K76、K81、K82～グルタミン酸）を1～50mg/kgで静脈内で投与した。FS-EEEE-mFcの投与に伴い、体重は用量に依存する様式で増加し（図9-1、パネルA）、これは骨格筋量の増加と関連した（図9-1、パネルB）。FS-EEEE-mFcの血清中濃度を電気化学発光免疫測定法を使用して測定し、図9-1のパネルCに示すように、FS-EEEE-mFcのトラフレベルは1mg/kgから50mg/kgまで用量に比例した。FS-EEEE-hFc分子を、皮下および静脈内投与後に評価した。FS-EEEE-hFcを10mg/kgをIVで、または20mg/kgをSCで投与し、20%の増加で体重に類似した影響をもたらし、個々の筋肉量の増加は28%～44%の範囲であった。50mg/kgをIVで、または100mg/kgをSCで投与されたFS-EEEE-hFcは、26%増加して体重に類似した影響をもたらし、個々の筋肉量の増加は46%～69%の範囲であった（図9-1、パネルDおよび図9-2、パネルE）。心重量を脛骨の長さに対して正規化すると、心臓/脛骨の比の増加がFS-EEEE-hFcの高用量で見られた。溶媒治療からの形態学的差異について、四頭筋組織試料を調べた。免疫蛍光顕微鏡を使用して、FS-EEEE-hFc投与（図9-3、パネルF）では、溶媒投与された動物と比較して、より大きい筋線維サイズが観察された。平均筋線維直径は、両方の用量レベルにて、溶媒と比較して、FS-EEEE-hFcで増加した（図9-3、パネルG）。

40

50

ルG)。

m d ×マウスのフォリスタチン治療は、筋肉肥大および筋機能の改善をもたらす

#### 【0236】

ジストロフィー病に対する効果を評価するために、組織壊死、炎症、および線維症のマーカーに対する免疫組織化学全スライド解析により、四頭筋組織および横隔膜組織の両方を分析した。壊死のマーカーとして、抗マウス Ig G を用いて内因性マウス Ig G を検出する IHC 方法が開発され、これはヒスチジンに富んだ糖タンパク質 (HGP) に結合して壊死細胞クリアランスを促進する HGP - Ig G 複合体を形成する、壊死エリア Ig G 蓄積を利用している。m d ×筋肉では、総 Ig G 検出によって評価した時、マウス Ig G IHC は壊死細胞を正確に標識したが、壊死面積は組織切片 (図 10-1A) および動物にわたって変動した (図 10-1B)。変動性を最大限に考慮するために、スライド画像全体を定量のために分析し、コホート動物数を各群 (n = 15) について多くした。四頭筋の全スライド解析において、壊死組織面積の統計学的に有意な低減は、FSEEE-mFc の 10 および 30 mg / kg の用量で達成されたが、ActRIIB-mFc の 3 mg / kg 用量では達成されなかった。壊死の面積に対する所見と同様に、炎症促進性 M1 タイプのマクロファージのマーカーである CD68 の染色で、むらのある陽性染色面積が明らかになった (図 10-1C)。検出可能なマクロファージ浸潤の全体的なレベルが低いため、スライド画像全体を CD68 陽性面積について定量化したとき、薬物治療効果は有意性に達しなかった (図 10-1D)。コラーゲン I 検出では、溶媒対照において 4 % の陽性染色面積を特定することができたが、これは 10 mg / kg および 30 mg / kg 両方の FSEEE-mFc ならびに 3 mg / kg の ActRIIB で著しく低減した (図 10-2E および図 10-2F)。m d × の四頭筋における FSEEE-mFc 治療の全体的パターンは、既存の中心核化された、再生筋線維の肥大と一致する。再生細胞の拡大により、変性の低減が生じ、細胞外基質内でコラーゲンの堆積を促進する損傷した壊死組織が低減し、FSEEE-mFc は線維症を低減させた。

#### 【0237】

ジストロフィー筋への影響を評価するために、フォリスタチン FSEEE-mFc 分子を 3 週齢の m d × マウスに 12 週間皮下投与した。FSEEE-mFc の 3 用量を 3 ~ 30 mg / kg の範囲から選択し、3 mg / kg で投与された組み換えアクチビン II B 型受容体 (ActRIIB-mFc) の Fc 融合と比較した。マウスは定期的な運動を行わず、研究の 10 週目に前肢の握力について評価した。図 11-1A に示されるように、FSEEE-mFc については用量にわたって体重が増加し、その範囲は 9 % ~ 25 % であったのに対し、ActRIIB-mFc では 14 % であった。骨格四肢筋の増加は、3 mg / kg FSEEE-mFc では 12 % ~ 27 %、30 mg / kg FSEEE-mFc では 46 % ~ 59 % の範囲であった (図 11-1B)。心臓および横隔膜の重量の増加は四肢筋よりも小さく、PBS 溶媒治療と有意に異ならなかった。四頭筋から、大腿直筋の面積が定量化され、すべての薬物治療群で有意な増加が観察された (図 11-1C)。さらに、筋線維サイズを定量し、平均筋線維直径は溶媒対照と比較して FSEEE-mFc 治療により増加した (図 11-1D および図 11-1E)。

#### 【0238】

FSEEE-mFc のすべての用量は、C57BL/10 野生型マウスのレベルよりも高いレベルまで絶対的前肢握力を回復させ、10 mg / kg FSEEE-mFc で最大効果を有した (図 11-2F)。体重に対して正規化した場合、3 mg / kg および 10 mg / kg FSEEE-mFc の両方が、m d × 溶媒対照よりも高いレベル、および野生型と同様のレベルまで握力を増加させた。筋肉損傷の循環マーカーに対する効果を測定した。血清クレアチニーゼ活性は変動性が高く、FSEEE-mFc の最高用量が、溶媒治療と比較して最大の低減をもたらした (図 11-2G)。骨格トロポニン I レベルは最高の FSEEE-mFc 用量では低減されたが、心筋トロポニン I レベルは変化せず、心臓と比較してより大きな四肢筋の肥大が観察されたことと一致した。

#### 【0239】

10

20

30

40

50

病理組織学的結果を確証するために、線維症に対する遺伝子マーカーを四頭筋組織のホモジネートから測定した。図10-2Gに示されるように、F S - E E E - m F c の3つのすべての用量は、コラーゲン、c o l 1 A 1、l o x、c t h r c 1、およびa c t a 2 の堆積および架橋に関連する遺伝子の発現を低減させた。転写レベルはC D 6 8 またはs p p 1 に対して低減しなかった。これは、m d x モデルにおける線維症の発症およびD M D 疾患の重症度と遺伝的関連性を持つ、ジストロフィー筋内の高度に発現された細胞外タンパク質、オステオポンチンをコードする。m R N A 解析では、A c t R I I B - m F c 群は低減を示さず、一部の事例では、線維症および炎症に対する遺伝子マーカーのレベルが増加した。

## 【0240】

横隔膜組織において、C D 6 8 陽性マクロファージ浸潤のベースラインレベルは四頭筋よりも高く、1 0 m g / k g および3 0 m g / k g のF S - E E E - m F c ならびに3 m g / k g のA c t R I I B - m F c でも低減が観察された（図12-1Aおよび図12-1C）。コラーゲンI免疫組織化学法では、横隔膜では四頭筋と比較して線維症のレベルが高く、両方の筋肉における溶媒対照については1 2 % 対4 % であった（図12-1Bと図10-2F）。四頭筋とは異なり、横隔膜コラーゲンI含有量は、薬物治療に伴い著しく変化しなかった。線維症および炎症に関する遺伝子の定量的R T - P C R は、F S - E E E - m F c の1 0 および3 0 m g / k g 用量で、R N A 発現の低減を示した（図12-2D）。四頭筋と同様に、A c t R I I B - m f C グループの遺伝子転写物応答は線維症のマーカーに対して増加した。

## 【0241】

実施例12：m d x マウスのフォリスタチン治療は、ミオスタチン拮抗薬を用いた治療より大きい筋機能および病理学の改善をもたらす

操作されたフォリスタチンのミオスタチン拮抗作用に特異的な薬剤に対する効果を比較するために、ミオスタチンに特異的に結合するように設計されたモノクローナル抗体を調製した。結果として得られるマウスI g G F c 含有抗体を、表面プラズモン共鳴法を使用して、リガンドのミオスタチンおよびアクチビンAに結合する能力についてF S - E E E - m F c と比較した。F S - E E E - m F c および抗M S T 抗体の両方がミオスタチンにしっかりと結合し、K D 値はそれぞれ7 . 5 および1 5 p M であったのに対し、アクチビンA F S - E E E - m F c は6 . 1 p M のK D を示し、抗M S T 抗体は検出可能な結合を示さなかった。

## 【0242】

次に、両分子を、マウスのジストロフィー筋に対する効果について比較した。この研究では、5週齢であり、定期的な運動レジメンを受けたm d x マウスに、1 2週間皮下投与を行った。各分子の2用量は3 m g / k g および3 0 m g / k g を選択したが、抗体の予測半減期が長いことに基づき、抗ミオスタチン抗体の週1回に対して、F S - E E E - m F c 投与の頻度は週2回に設定した。

## 【0243】

両方の薬剤の両方の用量で体重および筋肉質量の増加が見られた（図13-1Aおよび13-1B）。体重および筋肉質量の増加の度合いは、3 0 m g / k g のF S - E E E - m F c の方が、3 0 m g / k g の抗M S T 抗体よりも大きかった。3 m g / k g 投与量で、体重および筋肉量の増加は3 0 m g / k g に比べて大幅に低減し、両方の薬剤について効果の度合いは同等であった。抗M S T 抗体のより高い用量での脾臓重量の増加を除いて、心臓、肝臓、および脾臓重量は、絶対的な重量および体重に対して正規化された重量の両方とも変化しなかった（図13-1C）。

## 【0244】

機能的および行動測定値を、m d x 研究に対して推奨される計測に対する動物順化に従って記録した。前肢の握力では、両方の薬剤の両方の用量が上記の溶媒治療の増加をもたらした（図13-2D）。F S - E E - m F c の3 0 m g / k g 用量は、抗M S T 抗体の3 0 m g / k g よりも大きな増加を生じた。体重に対して正規化した後、握力の増加は溶

10

20

30

40

50

媒治療と区別されなかった。E D L 筋の単独強縮力を研究終了時に測定した(図13-2E)。両方の薬剤の30mg/kg用量のみが強縮力の増加をもたらし、F S - E E E - m F c の増加は抗M S T抗体の増加よりも大きかった。E D L 断面積に対して正規化した場合、比力はm d x溶媒投与群と区別できなかった。強制トレッドミーリングを調べたところ、F S - E E E - m F c の30mg/kg群だけでなく、抗M S T抗体の両方の用量でも走行距離の低減が見られた(図13-2F)。体重に対して正規化した場合、溶媒と比較したこれらの低減が維持された。

#### 【0245】

血清C K分析は、高いレベルの群内変動性を示し、群間の有意差を見出すことは不可能であった(図13-3G)。研究の第8週の間に薬物濃度についても、血清を分析した。図13-3Hに示されるように、用量比例性は両方の薬剤について明らかであり、30mg/kg用量では3mg/kg用量よりもおよそ10倍高い濃度をもたらした。投与頻繁はより低かったが、抗M S T抗体濃度はF S - E E E - m F c よりも約4倍高かった。肥大性効果に対する血清濃度を比較すると、3mg/kg用量では、F S - E E E - m F c は抗M S T抗体の4分の1の血清濃度で類似の筋肉質量効果を生じた。この傾向は30mg/kgの用量でより顕著であり、循環血中のF S - E E E - m F c 薬は4分の1であるにもかかわらず、抗M S T抗体と比較するとF S - E E E - m F c に対してより大きな筋肉質量、前肢の握力、およびE D L 強縮力の増加が見られた。

#### 【0246】

四頭筋組織および横隔膜組織を、ジストロフィー病理の変化について免疫組織化学およびq P C Rで解析した。運動をしなかった研究と比較して、運動をした研究では、溶媒対照群において四頭筋および横隔膜筋の損傷の類似のバックグラウンドレベルが観察された。運動をしたm d xと運動をしなかったm d xとの比較で、四肢筋壊死の悪化および横隔膜線維症を記録した報告書を考慮すると、これは驚きであった。我々の研究について考えられる説明の一つは、動物の開始年齢の差である可能性がある(運動をしなかったものは3週齢、運動をしたものは5週齢)。

#### 【0247】

図14-1A~Cに示されるように、四頭筋の溶媒治療と比較して、両方の薬剤の3mg/kg用量は、筋壊死および線維症の小さな低減をもたらした。30mg/kgでは、F S - E E E - m F c については壊死および線維症の大幅な低減が見られたのに対し、抗M S T抗体では低減が小さかった。C D 6 8陽性マクロファージ染色は、溶媒対照からの治療群を区別できなかったが、これはこのマーカーのベースライン染色のレベルが低いことにより制限された可能性がある。線維症および炎症のマーカーについての対側四頭筋のm R N A解析が図14-2Dに示されている。ここでは、転写レベルの低減はいずれの薬剤または用量に対しても観察されず、実際にいくつかのマーカーは、低用量抗M S T抗体(c o l 1 A 1、c t h r c 1、C D 6 8)および高用量のF S E E E - m F c (C D 6 8)についてレベルのわずかな増加を示していた。線維症遺伝子マーカーについては、コラーゲンI I H Cとc o l 1 A 1遺伝子発現の違いについて考えられる一つの説明は、動物の年齢である。m d xでは、およそ3週齢で始まる四肢筋の重度の筋壊死の期間は、第8週までに回復して活性の低い損傷の状態になる。動物は、研究の終了時に月齢4カ月を超えており、結合組織の堆積を促進するために必要な炎症促進性、線維症促進性のシグナル伝達を生成することになる活動的な四肢の筋肉変性の時間枠を超える年齢であった。結果として、研究の初期段階で最も活動的であった線維症の遺伝子経路が試験終了時に静止したため、タンパク質レベルでF S - E E E - m F c の抗線維症作用が発現した。

#### 【0248】

横隔膜では、四頭筋と比較して全体的に高いレベルのベースライン組織損傷がI H Cによって観察された(図15-1A~図15-1C、図15-2Dも参照)。抗M S T抗体の両方の用量は、C D 6 8またはコラーゲンI染色に効果を示さなかった。F S - E E E - m F c については、30mg/kgでC D 6 8マクロファージ浸潤の定性的低減が観察されたが、コラーゲンI染色では有意な変化は見られなかった。m R N A解析は、3

10

20

30

40

50

0 mg / kg の F S - E E E - m F c 用量を溶媒治療と比較した場合、いくつかの炎症および線維症マーカーの転写レベルの低下を示した。オステオポンチンをコードする s p p 1 について最大の低減が見られた。オステオポンチンレベルを低減させると、再生促進性マクロファージに有利となるように、炎症促進性マクロファージ集団が低減することが示されている。このパターンに一致して、C D 6 8 に対するm R N A も、s p p 1とともに、30 mg / kg F S - E E E - m F c 用量で低下した。

### 【0249】

#### 同等物および範囲

当業者であれば、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多数の均等物を日常的なものを超えない実験を使用して認識し、または確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記の説明に限定されることは意図されず、むしろ以下の請求項に記載される。

【図 1】

【図1】

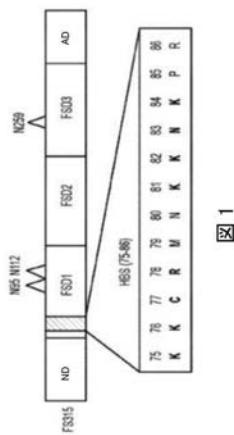


図 1

【図 2】

【図2】

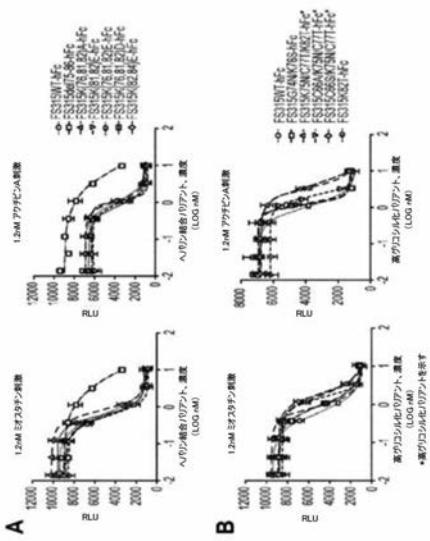
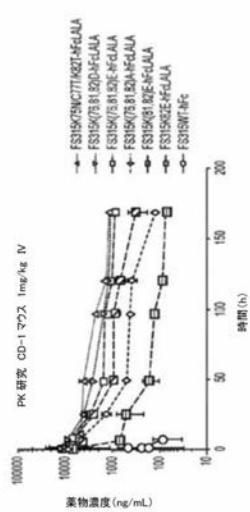


図 2

\*複数のコントロールリコートを示す

【図3A】

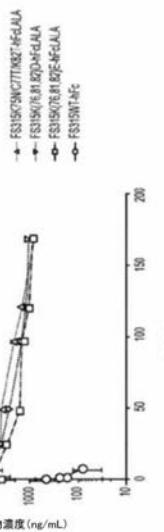
【図3A】



3A

【 図 3 B 】

【図3B】



3B

【図4A】

[図4A]

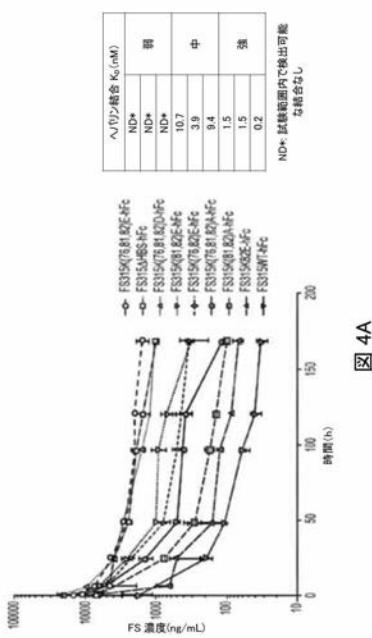


图 4A

【 図 4 B 】

【図4B】

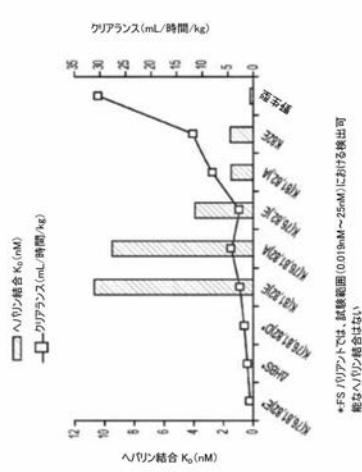


图 4B

【図5A】

【図5A】

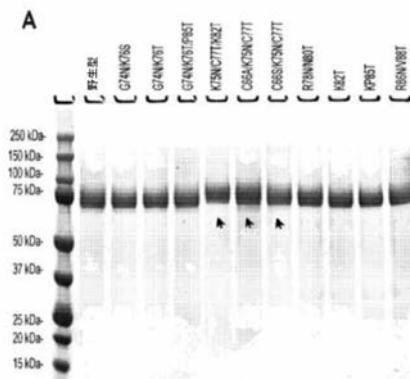
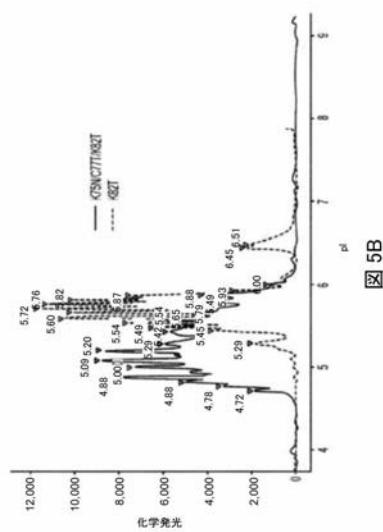


図 5A

【 図 5 B 】

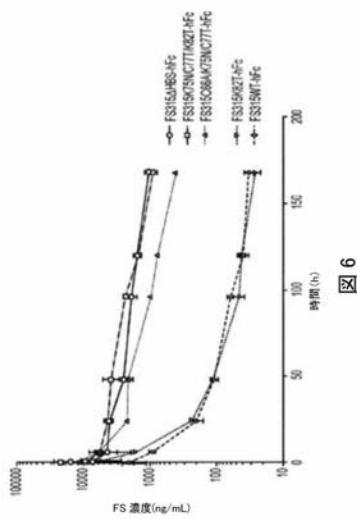
[図5B]



5B

【 図 6 】

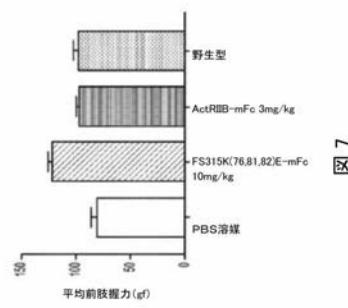
【图6】



6

【 四 7 】

【図7】



7

【図 8 A】

【図 8 A】

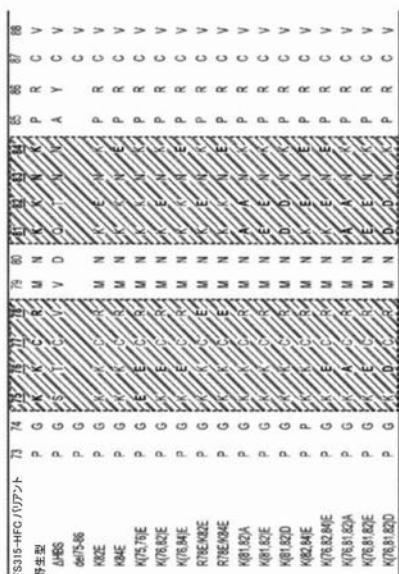


図 8A

【図 8 B】

【図 8 B】



図 8B

【図 9 - 1】

【図 9-1】

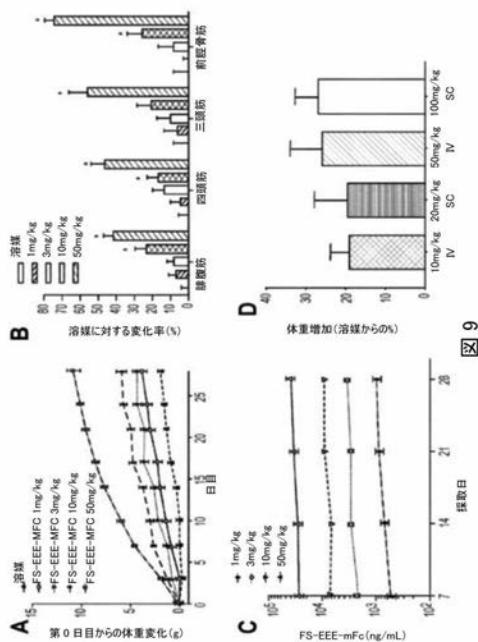


図 9

【図 9 - 2】

【図 9-2】

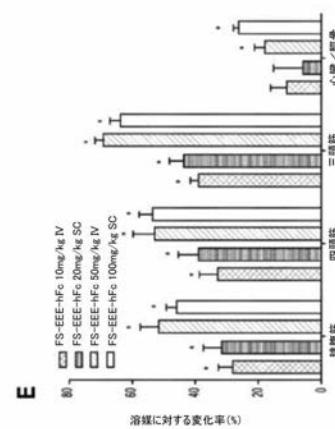
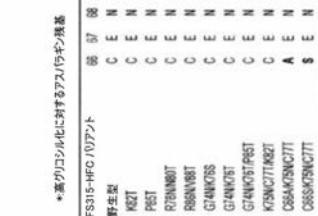


図 9(続き)



\*高カリコシル化に対するアミノ酸挿入基

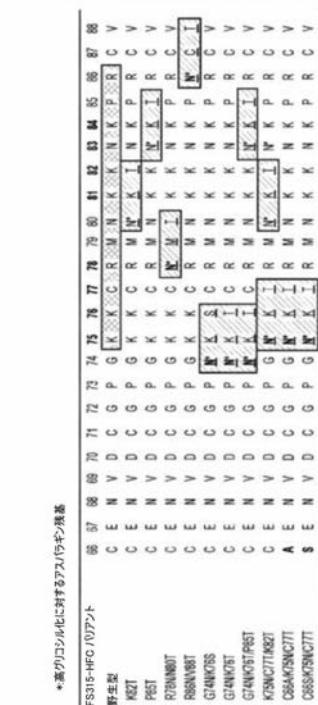


図 8B

【図 9 - 3】

【図 9-3】

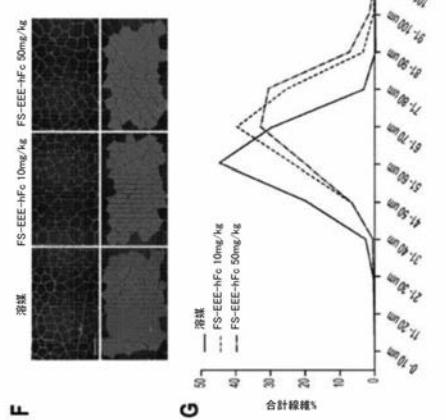


図 9(続き)

【図 10 - 1】

【図 10-1】

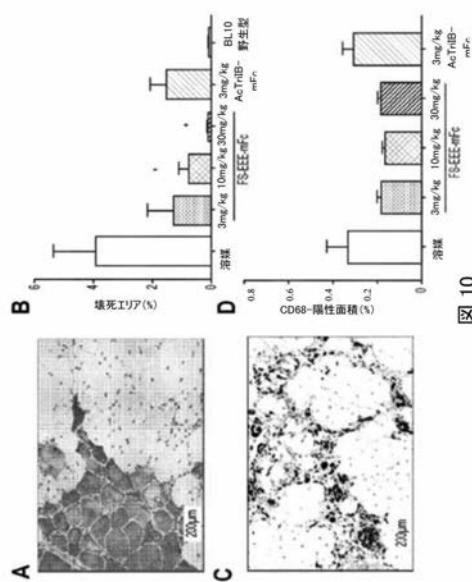


図 10

【図 10 - 2】

【図 10-2】

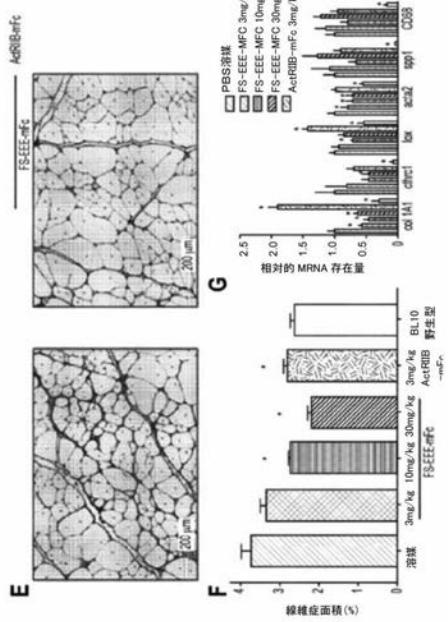


図 10(続き)

【図 11 - 1】

【図 11-1】

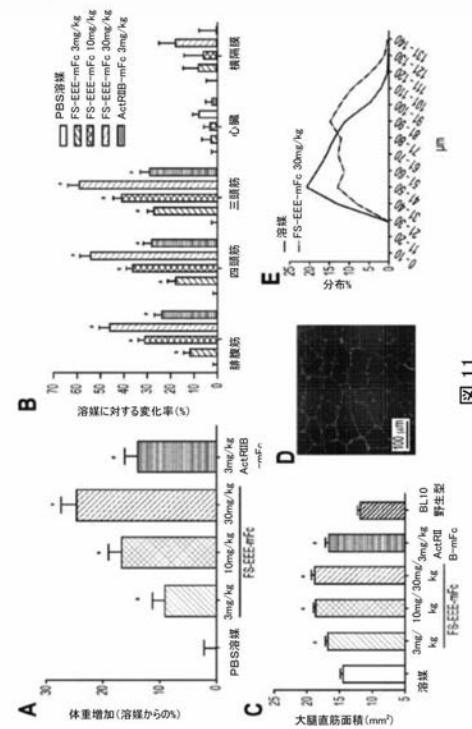


図 11

【 図 1 1 - 2 】

【图 1-1-2】

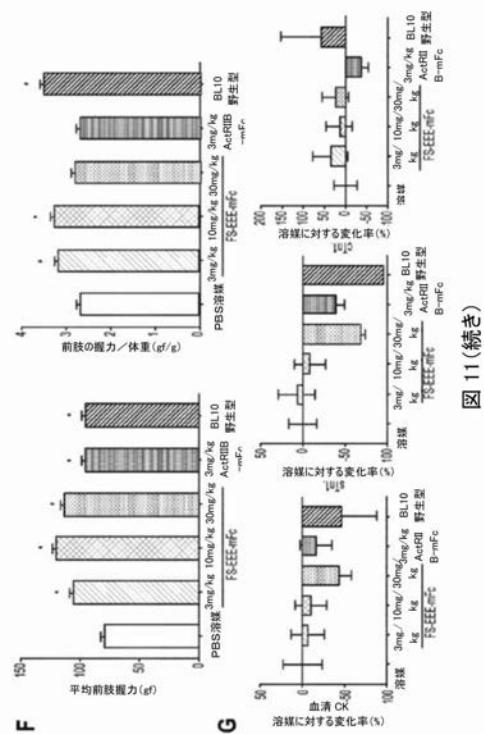


図 11(続)

【 図 1-2 - 1 】

【図1.2-1】

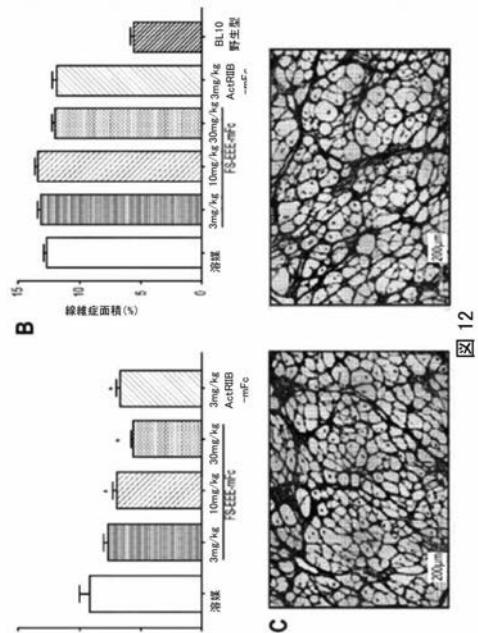


图 12

## 【図 12 - 2】

【図1-2-2】

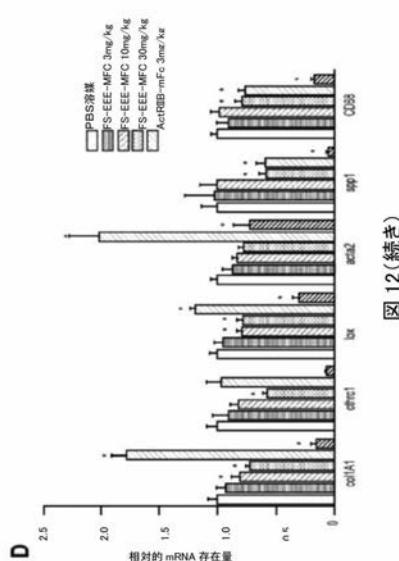
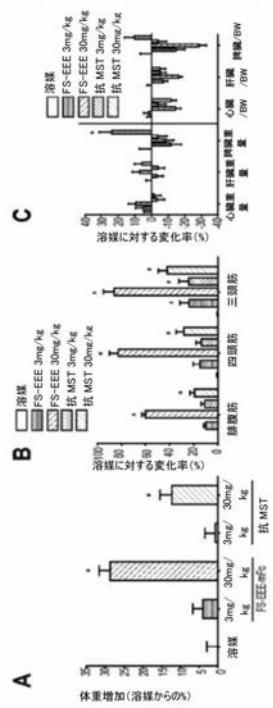


図 12(続き)

### 【図 13-1】

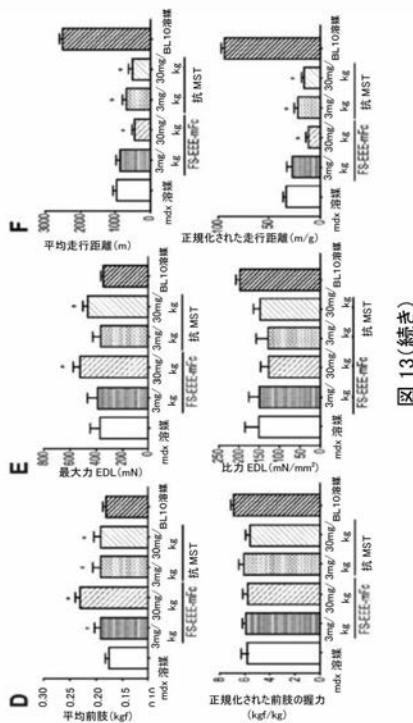
【图 1.3-1】



13

【図 13 - 2】

【図 13-2】



【図 13 - 3】

【図 13-3】

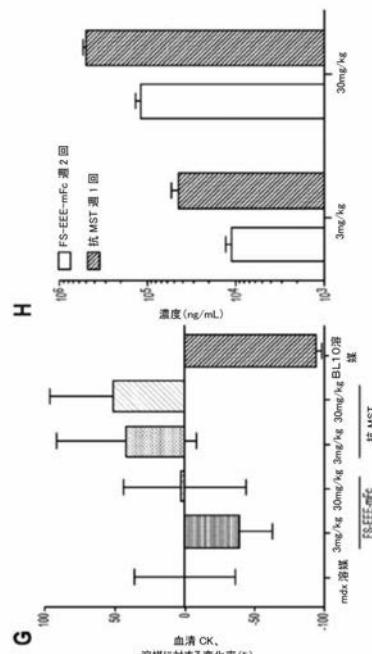
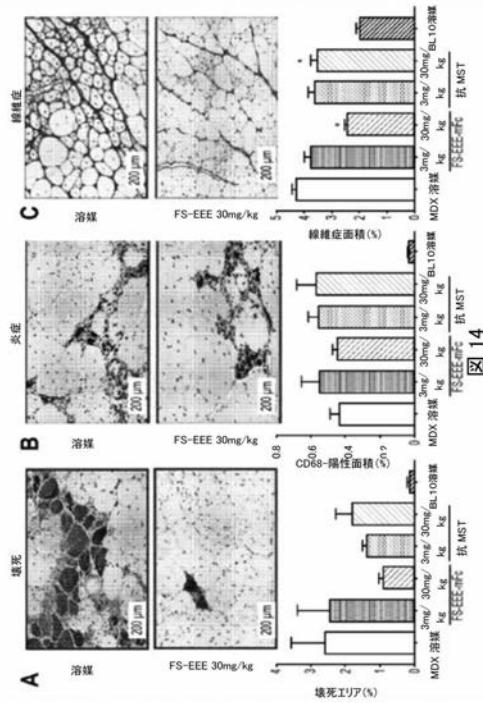


図 13(続き)

【図 14 - 1】

【図 14-1】



【図 14 - 2】

【図 14-2】

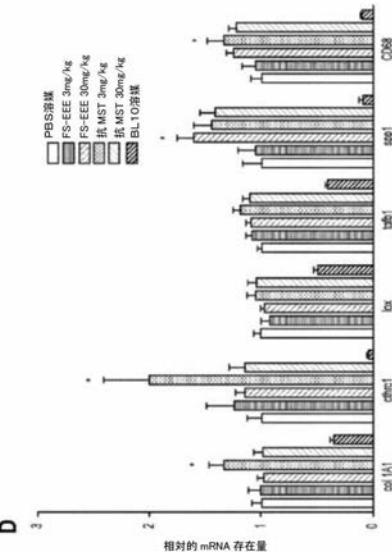
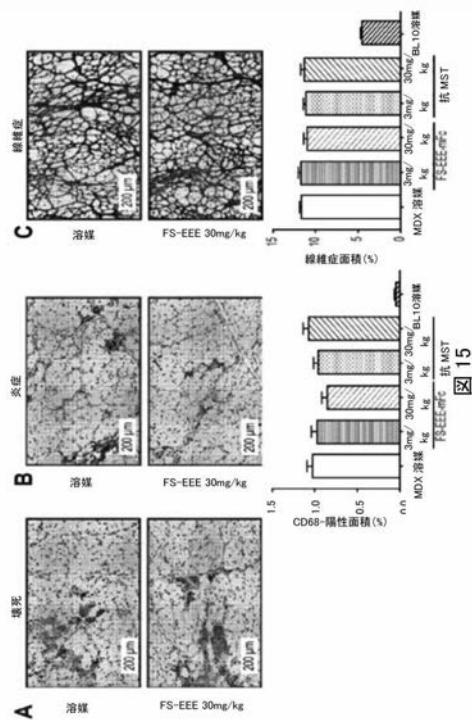


図 14(続き)

【図 15 - 1】

【図 15-1】



【図 15 - 2】

【図 15-2】

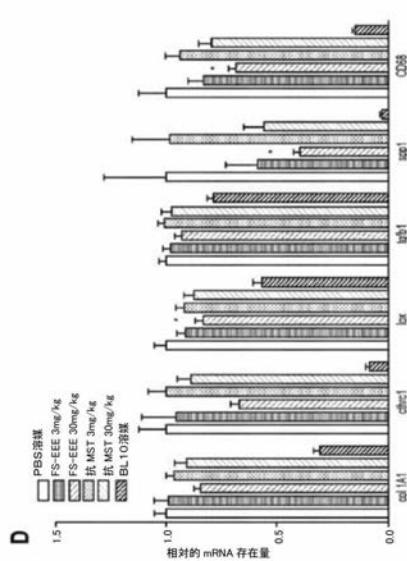


図 15(続き)

## 【配列表】

2020519291000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2018/032332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K14/47 A61K38/17  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/187807 A1 (ARCARIOS B V [NL]) 27 November 2014 (2014-11-27) page 3 - page 4; figures 1,2 aa 75-86 SEQ ID NO: 6 replaced by aa 148-157 of SEQ ID NO 7; figures 1-11; examples 1-4; sequences 1, 2, 5-7 -----	1-52
X	Y. SIDIS ET AL: "Heparin and Activin-Binding Determinants in Follistatin and FSTL3", ENDOCRINOLOGY, vol. 146, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 130-136, XP055073187, ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/en.2004-1041 Also see whole document.; page 133; figures 1, 4A, 4B; table 1 -----	1-9, 11-16
Y	----- -/-	10,51-96

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 August 2018

29/10/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bretherick, James

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/032332
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. SUMITOMO ET AL: "The Heparin Binding Site of Follistatin Is Involved in Its Interaction with Activin", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 208, no. 1, 1 March 1995 (1995-03-01), pages 1-9, XP055378106, AMSTERDAM, NL ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1006/bbrc.1995.1297 abstract Introduction, Materials and methods section, Results and discussion section.; page 2 - page 8; figures 1-4 -----	1-4,6-8, 11-16, 18-23
Y	DATTA-MANNAN AMITA ET AL: "An engineered human follistatin variant: insights into the pharmacokinetic and pharmacodynamic relationships of a novel molecule with broad therapeutic potential", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEU, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 344, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 616-623, XP009171518, ISSN: 1521-0103, DOI: 10.1124/JPET.112.201491 [retrieved on 2012-12-17] cited in the application abstract Especially Results, pp. 618-620; page 617, column 1 - page 620; figure 1; tables 1,2 Discussion pp. 621-622; page 621, paragraph 1 - page 622, paragraph 4; figures 1-5 -----	5,9,10, 17,24, 26-44, 51-96
A	A Datta-Mannan: "Addendum to: "An Engineered Human Follistatin Variant: Insights into the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Relationships of a Novel Molecule with Broad Therapeutic Potential"", at ASPET Journals on June, 1 August 2015 (2015-08-01), XP055378429, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://jpet.aspетjournals.org/content/354/2/238.full.pdf">http://jpet.aspетjournals.org/content/354/2/238.full.pdf</a> [retrieved on 2017-06-02] the whole document -----	1-96
1		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2018/032332
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. DATTA-MANNAN ET AL: "Insights into the Impact of Heterogeneous Glycosylation on the Pharmacokinetic Behavior of Follistatin-Fc-Based Biotherapeutics", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 43, no. 12, 9 September 2015 (2015-09-09), pages 1882-1890, XP055378136, DOI: 10.1124/dmd.115.064519 abstract Introduction,; page 1182 - page 1883, column 2; figures 1,2; table 1 Discussion,; page 1187, column 1 - page 1889, column 2; figures 3-8; tables 3,4 -----	1-4,6-8, 11-16, 18-23, 25,45-50
Y	WO 2014/116981 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES [US]) 31 July 2014 (2014-07-31) The whole document, especially paragraph [0125]-[0141] (Fc. fusion proteins) [0144]-[0164] (recombinant production methods, dosage regimen); claims 1-58; figures 1-3; examples 1-8 -----	5,9,10, 17,24, 26-44, 51-96
Y	-----	5,9,10, 17,24, 26-44, 51-96
X,P	WO 2017/152090 A2 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES [US]) 8 September 2017 (2017-09-08) Whole document, especially paragraphs [0002]-[0031]; claims 1-62; figures 1-3 Detailed description; paragraph [[0076]] - paragraph [[0092]]; table 1 Recombinant follistatins and follistatin-Fc fusion proteins, dosage.; paragraph [[0098]] - paragraph [[0132]]; tables 3,4 examples 1-5 -----	1-58,65, 75-83
1		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2018/032332

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-96 (partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2018/ 032332

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-96(partially)

A recombinant follistatin polypeptide comprising an amino acid sequence at least 80% identical to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 5, wherein the recombinant follistatin protein has a modified heparin binding sequence (HBS), and wherein one or more amino acids within the HBS is substituted with an amino acid having a less positive charge in comparison to the substituted amino acid; said recombinant follistatin fused to an IgG Fc domain, pharmaceutical compositions comprising said protein or Fc fusion, polynucleotides encoding said follistatins or fusions, expression vectors, host cells, methods of making said follistatins or fusions, hybridoma cells producing said follistatins or fusions, uses thereof in treatment of Duchenne Muscular Dystrophy, methods to inhibit myostatin using said follistatins or fusions; all of these wherein the recombinant follistatin has the HBS of SEQ ID NO: 42, and including SEQ ID NO: 15, 16, 43, 75 and 76.

---

2-33. claims: 1-96(partially)

As invention 1 but wherein the recombinant follistatin has the HBS of SEQ ID NO: 44-67 and 111-116, respectively.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/032332

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2014187807	A1	27-11-2014	NONE			
WO 2014116981	A1	31-07-2014	AU CA CN EA EP HK HK JP KR US WO	2014209178 A1 2898121 A1 104902915 A 201590719 A1 2948161 A1 1213804 A1 1217637 A1 2016511751 A 20150111347 A 2016083440 A1 2014116981 A1	21-05-2015 31-07-2014 09-09-2015 30-12-2015 02-12-2015 15-07-2016 20-01-2017 21-04-2016 05-10-2015 24-03-2016 31-07-2014	
WO 2017152090	A2	08-09-2017	AU CA SG WO	2017228475 A1 3016576 A1 11201807400T A 2017152090 A2	13-09-2018 08-09-2017 27-09-2018 08-09-2017	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	21/06	(2006.01)	A 6 1 P	21/06
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ロン , ハオジン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421 , レキシントン , シャイアー ウェイ 300 , シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 イスケンデリアン , アンドレア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421 , レキシントン , シャイアー ウェイ 300 , シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ノートン , アンジェラ ダブリュー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421 , レキシントン , シャイアー ウェイ 300 , シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 シエン , チュアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421 , レキシントン , シャイアー ウェイ 300 , シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 パン , クラーク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421 , レキシントン , シャイアー ウェイ 300 , シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ , インコーポレイテッド 気付

F ターΔ(参考) 4B064 AG01 AG26 AG27 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AB01 AB04 AC14 BA02 CA24 CA25  
CA44  
4C076 AA95 CC41 EE41 EE59 FF31 FF63 FF68  
4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA22 CA53 DB70 MA13 MA55 MA56  
MA58 MA63 MA66 NA14 ZA15 ZA151 ZA152 ZA18 ZA181 ZA182  
ZA36 ZA361 ZA362 ZA66 ZA661 ZA662 ZA81 ZA811 ZA812 ZA94  
ZA941 ZA942 ZB11 ZB111 ZB112 ZC21 ZC211 ZC212  
4C085 AA35 BB42 CC22 DD62 EE01 EE05 GG01 GG02 GG04  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74