

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7046903号  
(P7046903)

(45)発行日 令和4年4月4日(2022.4.4)

(24)登録日 令和4年3月25日(2022.3.25)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	14/71 (2006.01)	C 0 7 K	14/71	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
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	

請求項の数 31 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-500261(P2019-500261)  
 (86)(22)出願日 平成29年7月7日(2017.7.7)  
 (65)公表番号 特表2019-527053(P2019-527053  
 A)  
 (43)公表日 令和1年9月26日(2019.9.26)  
 (86)国際出願番号 PCT/EP2017/067119  
 (87)国際公開番号 WO2018/007597  
 (87)国際公開日 平成30年1月11日(2018.1.11)  
 審査請求日 令和2年7月7日(2020.7.7)  
 (31)優先権主張番号 62/359,607  
 (32)優先日 平成28年7月7日(2016.7.7)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/467,478  
 (32)優先日 平成29年3月6日(2017.3.6)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 593141953  
 ファイザー・インク  
 アメリカ合衆国 1 0 0 1 7 ニューヨーク  
 州ニューヨーク市イースト・フォーティ  
 ーセカンド・ストリート 2 3 5  
 (73)特許権者 591049848  
 アンセルム  
 I N S E R M  
 フランス 7 5 6 5 4 パリ・セデックス 1  
 3、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1 番  
 (73)特許権者 520100435  
 ユニヴェルシテ・コート・ダジュール  
 U n i v e r s i t e C o t e d ' A z  
 u r  
 フランス 0 6 1 0 3 ニース・セデックス  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 可溶性線維芽細胞成長因子受容体3 (s F G F R 3) ポリペプチドおよびその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号33のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む可溶性線維芽細胞成長因子受容体3 (s F G F R 3) ポリペプチド。

## 【請求項2】

配列番号33のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のs F G F R 3 ポリペプチド。

## 【請求項3】

350個までのアミノ酸を含む、請求項1または2に記載のs F G F R 3 ポリペプチド。

## 【請求項4】

s F G F R 3 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号33のアミノ酸配列からなる、請求項1から3のいずれか一項に記載のs F G F R 3 ポリペプチド。

## 【請求項5】

線維芽細胞成長因子1 (F G F 1)、線維芽細胞成長因子2 (F G F 2)、線維芽細胞成長因子9 (F G F 9)、線維芽細胞成長因子18 (F G F 18)、線維芽細胞成長因子19 (F G F 19) または線維芽細胞成長因子21 (F G F 21) の少なくとも1つに結合する、請求項1から4のいずれか一項に記載のs F G F R 3 ポリペプチド。

## 【請求項6】

線維芽細胞成長因子1 (F G F 1)、線維芽細胞成長因子2 (F G F 2)、線維芽細胞成長因子9 (F G F 9) および線維芽細胞成長因子18 (F G F 18) に結合する、請求項1から4のいずれか一項に記載のs F G F R 3 ポリペプチド。

**【請求項 7】**

前記結合が、約 0 . 2 nM ~ 約 2 0 nM の平衡解離定数 (K<sub>d</sub>) により特徴付けられる、請求項5または6に記載の sFGFR3 ポリペプチド。

**【請求項 8】**

前記結合が、約 1 nM ~ 約 1 0 nM の K<sub>d</sub> により特徴付けられる、請求項5または6に記載の sFGFR3 ポリペプチド。

**【請求項 9】**

sFGFR3 ポリペプチドが、配列番号 21 の核酸 52 ~ 1098 によりコードされる、請求項 1 から8のいずれか一項に記載の sFGFR3 ポリペプチド。

**【請求項 10】**

請求項 1 から9のいずれか一項に記載の sFGFR3 ポリペプチドを含む、医薬組成物。

**【請求項 11】**

sFGFR3 ポリペプチドの凝集が 2 % 未満である、請求項10に記載の医薬組成物。

**【請求項 12】**

治療に用いるための、請求項10または11に記載の医薬組成物。

**【請求項 13】**

対象における FGFR3 関連骨格成長遅滞障害の治療に用いるための、請求項10または11に記載の医薬組成物。

**【請求項 14】**

前記 FGFR3 関連骨格成長遅滞障害が、軟骨無形成症、タナトフォリック骨異形成症 I 型 (TDI) 、タナトフォリック骨異形成症 II 型 (TDII) 、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症 (SADDAN) 、軟骨低形成症、頭蓋骨縫合早期癒合症候群、または屈指・高身長・難聴症候群 (CATSHL) である、請求項13に記載の医薬組成物。

**【請求項 15】**

前記 FGFR3 関連骨格成長遅滞障害が、軟骨無形成症である、請求項14に記載の医薬組成物。

**【請求項 16】**

前記 sFGFR3 ポリペプチドまたは組成物が、対象における 1 つ以上の症状を改善する、請求項12から15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 17】**

前記 sFGFR3 ポリペプチドが、対象に約 0 . 0 0 0 2 mg / kg ~ 約 3 0 mg / kg の用量で投与される、請求項12から16のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 18】**

前記 sFGFR3 ポリペプチドまたは組成物の投与が、

a ) 対象の生存率を増加させる；

b ) 対象の口コモーションを改善する；

c ) 対象における腹式呼吸を改善する；

d ) 対象の体長および / または骨長を増加させる；または、

e ) 対象における頭蓋比を改善し、および / または大後頭孔形状を回復させる、

請求項12から17のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 19】**

前記 sFGFR3 または組成物が皮下投与される、請求項12から18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 20】**

前記 sFGFR3 または組成物が静脈内投与される、請求項12から18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 21】**

配列番号 33 のアミノ酸配列を含む可溶性線維芽細胞成長因子受容体 3 (sFGFR3) ポリペプチドおよび薬学的に許容可能な賦形剤を含む、ヒト対象における軟骨無形成症の

10

20

30

40

50

治療に用いるための、医薬組成物。

【請求項 2 2】

( i ) 請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の s F G F R 3 ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養培地内で前記ポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を培養し、  
( i i ) 前記培養培地から前記 s F G F R 3 ポリペプチドを回収することを含む、  
請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の s F G F R 3 ポリペプチドの產生方法。

【請求項 2 3】

( i i i ) イオン交換クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーにより前記 s F G F R 3 ポリペプチドを精製する工程をさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記宿主細胞が H E K 2 9 3 細胞である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記宿主細胞が C H O 細胞である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 s F G F R 3 ポリペプチドの凝集が 2 % 未満である、請求項 2 2 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 s F G F R 3 ポリペプチドが約 0 . 9 ~ 約 1 . 1 g / L の濃度で回収される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の s F G F R 3 ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 3 0】

プラスミド、人工染色体、ウイルスベクターまたはファージベクターである、請求項 2 9 に記載のベクター。

【請求項 3 1】

請求項 2 8 に記載の核酸または請求項 2 9 もしくは 3 0 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、可溶性線維芽細胞成長因子受容体 3 ( s F G F R 3 ) ポリペプチドおよびその組成物を特徴とする。本発明はまた、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を治療する方法を特徴とする。

【背景技術】

【0 0 0 2】

線維芽細胞成長因子受容体 3 ( F G F R 3 ) は、ファミリーメンバー間に高いアミノ酸配列保存が存在する線維芽細胞成長因子 ( F G F R ) ファミリーのメンバーである。 F G F R ファミリーのメンバーは、リガンド結合親和性および組織分布の両方により分化される。全長 F G F R ポリペプチドは、細胞外ドメイン ( E C D ) 、疎水性膜貫通ドメイン、および細胞質チロシンキナーゼドメインを含有する。 F G F R ポリペプチドの E C D は、線維芽細胞成長因子 ( F G F ) と相互作用して下流シグナリングを媒介し、それが最終的に細胞分化に影響を与える。特に、 F G F R 3 タンパク質の活性化は、成長板における軟骨増殖を阻害し、骨伸長を制限することにより骨の発育における役割を担う。

【0 0 0 3】

F G F R 3 における機能獲得点突然変異は、いくつかのタイプのヒト骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症、タナトフォリック骨異形成症 I 型 ( T D I ) 、タナトフォリック骨異形成症 I I 型 ( T D I I ) 、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症 ( S A D D A N ) 、軟骨低形成症、および頭蓋骨縫合早期癒合症候群 ( 例えば、 M u e n k )

10

20

30

40

50

e症候群、クルーゾン症候群、およびクルーゾン皮膚骨格症候群 (Crouzon syndrome) を引き起こすことが公知である。FGFR3における機能損失点突然変異も、骨格成長遅滞障害、例えば、屈指・高身長・難聴症候群 (CATSHL) を引き起こすことが公知である。軟骨無形成症は四肢短縮小人症の最も一般的な形態であり、不均衡な四肢の短さおよび相対的巨頭頭蓋により特徴付けられる。軟骨無形成症の約97%は、FGFR3をコードする遺伝子中の単一点突然変異により引き起こされ、FGFR3アミノ酸配列の380位においてグリシン残基がアルギニン残基により置換されている。リガンド結合時、突然変異は、受容体/リガンド複合体の排除を減少させ、長期の細胞内シグナリングをもたらす。この長期のFGFR3シグナリングは、軟骨成長板の増殖および分化を阻害し、結果的に軟骨内骨成長を損傷する。

10

#### 【0004】

骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を治療するために機能不全FGFR3を標的化する改善された治療法が必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

本発明は、可溶性線維芽細胞成長因子受容体3 (sFGFR3) ポリペプチドおよびその使用、例として、患者（例えば、ヒト、特に、幼児、小児、または若年者）における骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）の治療のためのsFGFR3ポリペプチドの使用を特徴とする。特に、本発明のsFGFR3ポリペプチドは、以下のsFGFR3ポリペプチドを提供するために、例えば、野生型FGFR3ポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸289～400の欠失を特徴とする（例えば、配列番号5または32のアミノ酸配列を有するポリペプチド）：253位におけるセリン残基によるシスティン残基のアミノ酸置換を含むsFGFR3\_Del4 (sFGFR3\_Del4 - C253S；配列番号2) および拡張Ig様C2型ドメイン3を含むsFGFR3\_Del4 (sFGFR3\_Del4 - D3；配列番号33) ならびにそれらのバリエント、例えば、配列番号4のアミノ酸配列を有するsFGFR3ポリペプチド。さらに、本発明のsFGFR3ポリペプチドは、シグナルペプチドを含み得、例えば、配列番号18または34のアミノ酸配列を有するsFGFR3ポリペプチドである。

20

#### 【0006】

本発明の第1の態様は、配列番号32のアミノ酸残基23～357と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上（例えば、100%）の配列同一性）を有するポリペプチド配列を含む可溶性線維芽細胞成長因子受容体3 (sFGFR3) ポリペプチドを特徴とする。特に、ポリペプチドは、FGFR3のシグナルペプチド（例えば、配列番号32のアミノ酸1～22）および膜貫通ドメイン（例えば、配列番号32の367～399のアミノ酸）を欠き、（i）500アミノ酸長未満（例えば、475、450、425、400、375、または350アミノ酸長未満）であり；（ii）200個以下の連続アミノ酸（例えば、175、150、125、100、75、50、40、30、20、15個以下の連続アミノ酸）のFGFR3の細胞内ドメインを含み；および/または（iii）FGFR3のチロシンキナーゼドメインを欠く。sFGFR3ポリペプチドは、FGFR3の細胞内ドメイン、例えば、配列番号32のアミノ酸残基423～435または配列番号32のアミノ酸残基423～435と少なくとも90%、92%、95%、97%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列も含み得る。特に、ポリペプチドは、配列番号33と少なくとも92%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば、ポリペプチドは、配列番号33を含む、またはそれからなる）。sFGFR3ポリペプチドは、シグナルペプチドも含み得る（例えば、シグナルペプチドは、配列番号6もしくは35のアミノ酸配列または配列番号6もしくは35と少なくとも92%、95%、97%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る）。例えば、sFGFR3ポリペプチドは、配列番号34と少なくとも92%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る（

30

40

50

例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 3 4 を含む、またはそれからなる)。s F G F R 3 ポリペプチドは、異種シグナルペプチドも有し得る(例えば、ポリペプチドは、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有する異種シグナルペプチドを含む)。

【 0 0 0 7 】

本発明の第 2 の態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性(例えば、少なくとも 8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含む s F G F R 3 ポリペプチドであって、配列番号 1 の 2 5 3 位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換をさらに含む s F G F R 3 ポリペプチドを特徴とする。例えば、2 5 3 位におけるシステイン残基は、セリン残基または例えば、別の保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンにより置換されている。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、単離 s F G F R 3 ポリペプチドであり得る。s F G F R 3 ポリペプチドは、シグナルペプチドも含み得る(例えば、シグナルペプチドは、配列番号 6 もしくは 3 5 のアミノ酸配列または配列番号 6 もしくは 3 5 と少なくとも 9 2 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る)。例えば、s F G F R 3 は、配列番号 1 8 と少なくとも 9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る(例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 1 8 を含む、またはそれからなる)。s F G F R 3 ポリペプチドは、異種シグナルペプチドも有し得る(例えば、ポリペプチドは、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有する異種シグナルペプチドを含む)。

10

【 0 0 0 8 】

本発明の第 3 の態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性(例えば、少なくとも 8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含む s F G F R 3 ポリペプチドであって、配列番号 3 のアミノ酸配列の全てまたは断片(例えば、配列番号 3 の少なくとも 1 0 、2 0 、3 0 、4 0 、4 5 個以上の連続アミノ酸)と少なくとも 8 5 % の配列同一性(例えば、少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含むドメインをさらに含み、ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸残基 2 8 8 および 2 8 9 間に挿入されている s F G F R 3 ポリペプチドを特徴とする。例えば、ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る(例えば、ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み得、またはそれからなる)。場合により、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 1 の 2 5 3 位および / または配列番号 3 の 2 8 位における、セリン残基または例えば、別の保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンによるシステイン残基のアミノ酸置換を含む。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、単離 s F G F R 3 ポリペプチドであり得る。

30

【 0 0 0 9 】

配列番号 2 0 、2 1 、3 6 、または 3 7 の核酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列を含む本発明の第 1 、第 2 、または第 3 の態様の s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、単離ポリヌクレオチド)も特徴とされる(例えば、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 0 、2 1 、3 6 、または 3 7 の核酸を含む、またはそれからなる)。本発明はまた、ポリヌクレオチドを含むベクター(例えば、単離ベクター)、例えば、プラスミド、人工染色体、ウイルスベクター、またはファージベクターを特徴とする。さらに、本発明は、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞(例えば、単離宿主細胞)、例えば、H E K 2 9 3 細胞または C H O 細胞を特徴とする。

40

50

## 【0010】

本発明は、本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のsFGFR3ポリペプチドまたは本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のsFGFR3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を特徴とする。さらに、sFGFR3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターまたは宿主細胞は、組成物中で配合することができる。組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤をさらに含み得る。sFGFR3ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターを含む組成物は、約0.002mg/kg～約30mg/kg、例えば、約0.001mg/kg～約10mg/kgの用量における投与のために配合することができる。宿主細胞を含む組成物は、約1×10<sup>3</sup>個の細胞/mL～約1×10<sup>12</sup>個の細胞/mLの用量における投与のために配合することができる。組成物は、1日1回、週1回、または月1回の投与、例えば、週7回、週6回、週5回、週4回、週3回、週2回、週1回、2週間に1回、または月1回の投与のために配合することができる。例えば、sFGFR3ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターを含む組成物は、約0.25mg/kg～約10mg/kgの用量における週1回または2回の投与のために配合される。組成物は、非経口投与（例えば、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、髄腔内投与、または腹腔内投与）、腸内投与、または局所投与のために配合することができる。好ましくは、組成物は、皮下投与のために配合される。本発明はまた、上記組成物の1つ以上を含む医薬品を特徴とする。

10

## 【0011】

本発明はまた、患者に有効量の本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のsFGFR3ポリペプチド、sFGFR3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物を投与することを含む、骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を有する患者（例えば、ヒト）における組織（例えば、骨格組織）にsFGFR3ポリペプチドを送達する方法を特徴とする。

20

## 【0012】

本発明の第4の態様は、本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物を投与することを含む、患者（例えば、ヒト）における骨格成長遅滞障害（例えば、FGFR3関連骨格疾患）を治療する方法を特徴とする。FGFR3関連骨格疾患は、軟骨無形成症、タナトフォリック骨異形成症I型（TDI）、タナトフォリック骨異形成症II型（TDII）、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症（SADDEN）、軟骨低形成症、頭蓋骨縫合早期癒合症候群（例えば、Muenke症候群、クルーゾン症候群、およびクルーゾン皮膚骨格症候群）、および屈指・高身長・難聴症候群（CATSHL）からなる群より選択される。特に、骨格成長遅滞障害は、軟骨無形成症である。

30

## 【0013】

FGFR3関連骨格疾患は、構成的に活性なFGFR3の患者における発現、例えば、配列番号5または32の380位におけるアルギニン残基によるグリシン残基のアミノ酸置換により引き起こされ得る。特に、患者は、骨格成長遅滞障害と診断されていてよい（例えば、治療前）。例えば、患者は、四肢短縮、短い胴体、O脚、動搖性歩行、頭蓋異形、クローバー葉頭蓋、頭蓋骨縫合早期癒合症、ウォルム骨、手の奇形、足の奇形、ヒッチハイカーの親指、および胸部奇形からなる群より選択される骨格成長遅滞障害の1つ以上の症状を呈し、その結果、患者は、sFGFR3ポリペプチド（またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物）の投与後に骨格成長遅滞障害の1つ以上の症状の改善を呈する。さらに、患者は、sFGFR3ポリペプチドを予め投与されていなくてよい

40

50

。例えば、患者は、幼児、小児、若年者、成人であり得る。

【0014】

例えば、ポリペプチドは、患者に約0.002mg/kg～約30mg/kg（例えば、約0.001mg/kg～約10mg/kgの用量）の用量において投与される。ポリペプチドは、患者に1日1回以上、週1回以上（例えば、週2回、週3回、週4回、週5回、週6回、または週7回）、2週間に1回以上、月1回以上、または年1回以上投与することができる。例えば、ポリペプチドは、患者に約0.25mg/kg～約30mg/kgの用量において少なくとも約週1回または2回以上投与される（例えば、ポリペプチドは、患者に約2.5mg/kgまたは約10mg/kgの用量において週1回または2回投与される）。ポリペプチドは、患者に薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤を含む組成物中で投与することができる。ポリペプチドは、患者に非経口（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、または腹腔内）、腸内、または局所投与することができる。好ましくは、組成物は、患者に皮下注射により投与される。さらに、ポリペプチドは、線維芽細胞成長因子1（FGF1）、線維芽細胞成長因子2（FGF2）、線維芽細胞成長因子9（FGF9）、線維芽細胞成長因子18（FGF18）、線維芽細胞成長因子19（FGF19）、または線維芽細胞成長因子21（FGF21）に結合し得る。特に、結合は、約0.2nM～約20nMの平衡解離定数（K<sub>d</sub>）により特徴付けることができ、例えば、結合は、約1nM～約10nM（例えば、約1nm、約2nm、約3nm、約4nm、約5nm、約6nm、約7nm、約8nm、約9nm、または約10nm）のK<sub>d</sub>により特徴付けられる。ポリペプチドは、FGF19およびFGF21に対するポリペプチドの結合親和性に対してFGF1、FGF2、FGF9、およびFGF18に対する大きな結合親和性を示し得る。

10

20

30

【0015】

ポリペプチドは、約2時間～約25時間（例えば、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、または25時間）のインビボ半減期を有し得る。好ましくは、ポリペプチドの投与は、以下の1つ以上、または全て：患者の生存率の増加、患者の口コモーションの改善、患者における腹部呼吸の改善、患者の体長および／もしくは骨長の増加、患者の頭蓋比の改善、ならびに／または例えば、非治療患者（例えば、非治療軟骨無形成症患者）に対する患者における大後頭孔形状の回復を提供する。

【0016】

本発明はまた、sFGR3ポリペプチドの発現を生じさせるために好適な条件下で培養培地で上記宿主細胞（例えば、CHO細胞またはHEK293細胞）を培養し、培養培地からsFGR3ポリペプチドを回収することを含む、本発明の第1、第2、または第3の態様のsFGR3ポリペプチドを產生する方法を特徴とする。特に、回収は、クロマトグラフィー、例えば、親和性クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたは抗FLAGクロマトグラフィー、例えば、免疫沈降）またはサイズ排除クロマトグラフィーを含む。

40

【0017】

本発明の第5の態様は、患者における骨格成長遅滞障害を治療するための本発明の第1、第2、または第3の態様のポリペプチド（またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物）を特徴とする。特に、sFGR3ポリペプチドは、線維芽細胞成長因子1（FGF1）、線維芽細胞成長因子2（FGF2）、線維芽細胞成長因子9（FGF9）、線維芽細胞成長因子18（FGF18）、線維芽細胞成長因子19（FGF19）、または線維芽細胞成長因子21（FGF21）に結合し得る。

【0018】

本発明の第6の態様は、患者（例えば、ヒト）における骨格成長遅滞障害を治療するため

50

の、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % の配列同一性（例えば、少なくとも 86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む sFGFR3 ポリペプチド（またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物）であって、配列番号 1 の 253 位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換をさらに含む sFGFR3 ポリペプチドを特徴とする。例えば、253 位におけるシステイン残基は、セリン残基、または例えば、別の保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンにより置換されている。特に、sFGFR3 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。例えば、sFGFR3 ポリペプチドは、単離 sFGFR3 ポリペプチドであり得る。さらに、sFGFR3 ポリペプチドは、線維芽細胞成長因子 1 (FGF1)、線維芽細胞成長因子 2 (FGF2)、線維芽細胞成長因子 9 (FGF9)、線維芽細胞成長因子 18 (FGF18)、線維芽細胞成長因子 19 (FGF19)、または線維芽細胞成長因子 21 (FGF21) に結合し得る。

#### 【0019】

本発明の第 7 の態様は、患者（例えば、ヒト）における骨格成長遅滞障害を治療するための、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % の配列同一性（例えば、少なくとも 86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む sFGFR3 ポリペプチド（またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物）であって、配列番号 3 のアミノ酸配列の全てまたは断片（例えば、配列番号 3 の少なくとも 10、20、30、40、45 個以上の連続アミノ酸）と少なくとも 85 % の配列同一性（例えば、少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むドメインをさらに含み、ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸残基 288 および 289 間に挿入されている sFGFR3 ポリペプチドを特徴とする。例えば、ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 85 %、90 %、92 %、95 %、97 % または 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る（例えば、ドメインは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含み得、またはそれからなる）。場合により、sFGFR3 ポリペプチドは、配列番号 1 の 253 位および / または配列番号 3 の 28 位におけるセリン残基または例えば、別の保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンによるシステイン残基のアミノ酸置換を含む。特に、sFGFR3 ポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。例えば、sFGFR3 ポリペプチドは、単離 sFGFR3 ポリペプチドであり得る。さらに、sFGFR3 ポリペプチドは、線維芽細胞成長因子 1 (FGF1)、線維芽細胞成長因子 2 (FGF2)、線維芽細胞成長因子 9 (FGF9)、線維芽細胞成長因子 18 (FGF18)、線維芽細胞成長因子 19 (FGF19)、または線維芽細胞成長因子 21 (FGF21) に結合し得る。

#### 【0020】

第 5、第 6、または第 7 の態様の使用はまた、本発明の第 1、第 2、または第 3 の態様のポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、または組成物の投与を特徴とする。本発明の第 6 の態様の sFGFR3 ポリペプチドは、配列番号 20 または 36 の核酸配列と少なくとも 85 %、90 %、92 %、95 %、97 % または 99 % の配列同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドによりコードされ得る（例えば、ポリヌクレオチドは、配列番号 20 または 36 の核酸を含む、またはそれからなる）。本発明の第 5 または第 7 の態様の sFGFR3 ポリペプチドは、配列番号 21 または 37 の核酸配列と少なくとも 85 %、90 %、92 %、95 %、97 % または 99 % の配列同一性を有する核酸配列を含むポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドによりコードされ得る（例えば、ポリヌクレオチドは、配列番号 21 または 37 の核酸を含む、またはそれからなる）。

【0021】

本発明の第 5、第 6、または第 7 の態様の骨格成長遅滞障害は、任意の F G F R 3 関連骨格疾患、例えば、軟骨無形成症、T D I、T D I I、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症（SADDEN）、軟骨低形成症、頭蓋骨縫合早期癒合症候群（例えば、Muenke 症候群、クルーゾン症候群、およびクルーゾン皮膚骨格症候群）、または C A T S H L であり得る。特に、骨格成長遅滞障害は、軟骨無形成症である。F G F R 3 関連骨格疾患は、構成的に活性な F G F R 3 の患者における発現により引き起こされ得、例えば、構成的に活性な F G F R 3 は、配列番号 5 の 380 位におけるアルギニン残基によるグリシン残基のアミノ酸置換を含む。

10

【0022】

本発明の第 5、第 6、または第 7 の態様の患者（例えば、ヒト）は、骨格成長遅滞障害と診断されている者（例えば、治療前）であり得る。患者は、四肢短縮、短い胴体、O 脚、動搖性歩行、頭蓋異形、クローバー葉頭蓋、頭蓋骨縫合早期癒合症、ウォルム骨、手の奇形、足の奇形、ヒッチハイカーの親指、および胸部奇形からなる群より選択される骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）の 1 つ以上の症状を呈し得る。本方法の結果として、患者は、s F G F R 3 ポリペプチドの投与後に骨格成長遅滞障害の 1 つ以上の症状の改善を呈し得る。さらに、s F G F R 3 ポリペプチドの投与は、患者の生存率を増加させ、および / または患者の大後頭孔の形状を回復させ得る。患者は、幼児、小児、若年者、または成人であり得る。さらに、患者は、s F G F R 3 ポリペプチド（またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有するベクター、ポリヌクレオチドもしくはベクターを含有する宿主細胞、またはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含有する組成物）を予め投与されていない者であり得る。

20

【0023】

本発明の第 5、第 6、または第 7 の態様の s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターは、患者（例えば、ヒト）に約 0.002 mg / kg ~ 約 30 mg / kg、例えば、約 0.001 mg / kg ~ 約 10 mg / kg の用量において投与することができる。本発明の第 4 または第 5 の態様の宿主細胞を含む組成物は、患者（例えば、ヒト）に約 1 × 10<sup>3</sup> 個の細胞 / mL ~ 約 1 × 10<sup>12</sup> 個の細胞 / mL の用量において投与することができる。例えば、s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞は、患者に 1 日 1 回以上、週 1 回以上、月 1 回以上、または年 1 回以上投与される（例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、患者に週 7 回、週 6 回、週 5 回、週 4 回、週 3 回、週 2 回、2 週間に 1 回、または月 1 回投与される）。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、患者に約 0.25 mg / kg ~ 約 10 mg / kg の用量において週 1 回または 2 回投与される。s F G F R 3 ポリペプチドは、患者に薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤を含む組成物中で投与することができる。例えば、組成物は、患者に非経口（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、または腹腔内）、腸内、または局所投与される。特に、組成物は、患者に皮下注射により投与される。

30

【0024】

本発明は、（例えば、配列番号 33 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを製造するため）F G F R 3 ポリペプチドからシグナルペプチド、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインの一部を欠失させることにより、本発明の第 1 の態様の s F G F R 3 ポリペプチドを製造する方法を特徴とする。特に、細胞内ドメインは、配列番号 32 のアミノ酸残基 436 ~ 806 からなる。本発明はまた、（例えば、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを製造するため）配列番号 1 の 253 位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換を導入することにより、本発明の第 2 の態様の s F G F R 3 ポリペプチドを製造する方法を特徴とする。例えば、253 位におけるシステイン残基は、セリン残基または例えば、別の保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンにより置換される。

40

50

## 【0025】

本発明はまた、本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のs F G F R 3ポリペプチド(例えば、配列番号2、4、または33のアミノ酸配列を有するポリペプチド)、本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のポリヌクレオチド(例えば、配列番号20、21、36、または37の核酸配列を有するポリヌクレオチド)、本発明の第1、第2、もしくは第3の態様のベクター(例えば、プラスミド、人工染色体、ウイルスベクター、またはファージベクター)、または本発明の第1、第2、もしくは第3の態様の宿主細胞(例えば、HEK293細胞またはCHO細胞)を含むキットであって、場合により、キットの使用説明書を含むキットを特徴とする。

## 【0026】

10

## 定義

本明細書において使用される「a」および「a n」は、特に示されない限り、「少なくとも1つ」または「1つ以上」を意味する。さらに、単数形「a」、「a n」、および「the」は、特に文脈が明確に示さない限り、複数の参照対象を含む。

## 【0027】

本明細書において使用される「約」は、引用値の±10%である量を指し、好ましくは、引用値の±5%、より好ましくは、引用値の±2%である。例えば、用語「約」は、本明細書に引用される全ての投与量または範囲を、引用値または範囲終点の±10%だけ改変するために使用することができる。

## 【0028】

20

用語「ドメイン」は、ポリペプチド内の同定可能な構造および/または機能を有するポリペプチド(例えば、FGFR3ポリペプチド)のアミノ酸配列の保存領域を指す。ドメインは、例えば、約20個のアミノ酸～約600個のアミノ酸で長さが変動し得る。例示的なドメインとしては、FGFR3の免疫グロブリンドメイン(例えば、Ig様C2型ドメイン1、Ig様C2型ドメイン2、およびIg様C2型ドメイン3)が挙げられる。

## 【0029】

用語「投与量」は、活性剤が患者(例えば、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有する患者)に投与された場合に所望の治療効果(例えば、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症の治療)をもたらすために計算される活性剤(例えば、s F G F R 3ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号2、4、または33のアミノ酸配列を有するポリペプチド)の所定量を指す。投与量は、活性剤の規定量または特定の投与頻度と結び付く規定量に関して定義することができる。剤形は、s F G F R 3ポリペプチドまたはその断片を任意の好適な医薬賦形剤、担体、または希釈剤との会合で含む。

30

## 【0030】

用語「有効量」、「に有効な量」および「治療有効量」は、所望の結果、例えば、骨格成長遅滞障害(例えば、軟骨無形成症)の治療をもたらすために十分なs F G F R 3ポリペプチド、s F G R 3をコードするベクター、および/またはs F G F R 3組成物の量を指す。

## 【0031】

40

用語「細胞外ドメイン」および「ECD」は、膜貫通ドメインを越えて細胞外空間中に伸びるFGFR3ポリペプチドの一部を指す。ECDは、1つ以上の線維芽細胞成長因子(FGF)へのFGFR3の結合を媒介する。例えば、ECDは、FGFR3ポリペプチドのIg様C2型ドメイン1～3を含む。特に、ECDは、野生型(wt)FGFR3ポリペプチドのIg様C2型ドメイン1(例えば、配列番号5(シグナル配列を有さない成熟FGFR3タンパク質)のアミノ酸配列を有するwtFGFR3ポリペプチドのアミノ酸36～88または配列番号32(シグナル配列を有する前駆体FGFR3タンパク質)のアミノ酸配列を有するwtFGFR3ポリペプチドのアミノ酸57～110)、野生型(wt)FGFR3ポリペプチドのIg様C2型ドメイン2(例えば、配列番号5のアミノ酸配列を有するwtFGFR3ポリペプチドのアミノ酸139～234または配列番号32のアミノ酸配列を有するwtFGFR3ポリペプチドのアミノ酸161～245)、お

50

および w t F G F R 3 ポリペプチドの I g 様 C 2 型ドメイン 3 ( 例えば、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する w t F G F R 3 ポリペプチドのアミノ酸 2 4 7 ~ 3 3 5 または配列番号 3 2 のアミノ酸配列を有する w t F G F R 3 ポリペプチドのアミノ酸 2 6 8 ~ 3 1 0 ) を含む。 F G F R 3 の E C D は、野生型 F G F R 3 I g 様 C 2 型ドメイン 3 の断片、 例えば、配列番号 1 の a a 2 4 7 ~ 2 8 8 も含み得、それは 例えば、配列番号の 2 5 3 位におけるセリン残基または別の保存的アミノ酸置換 ( 例えば、アラニン、グリシン、プロリン、またはトレオニン ) によるシステイン残基のアミノ酸置換をさらに含み得る ( 例えば、配列番号 2 の a a 2 4 7 ~ 2 8 8 ) 。さらに、 E C D は、 例えば、配列番号 4 の a a 2 4 7 ~ 3 3 5 の I g 様 C 2 型ドメイン 3 を含み得る。したがって、 F G F R 3 ポリペプチドの例示的な E C D としては、 例えば、配列番号 1 および 2 の a a 1 ~ 2 8 8 または配列番号 4 および 3 3 の a a 1 ~ 3 3 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。特に、 F G F R 3 ポリペプチドの E C D は、配列番号 3 3 の a a 1 ~ 3 3 5 を含む。

#### 【 0 0 3 2 】

本明細書において使用される用語「 F G F R 3 関連骨格疾患」は、 例えば、 F G F R 3 の機能獲得突然変異体の発現による F G F R 3 の活性化の異常増加により引き起こされる骨格疾患を指す。語句「 F G F R 3 の機能獲得突然変異体」は、 F G F リガンドの存在下で 10 例えば、対応する野生型 F G F R 3 ( 例えば、配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) の生物学的活性よりも高い、下流シグナリングをトリガーする生物学的活性を示す F G F R 3 の突然変異体を指す。 F G F R 3 関連骨格疾患としては、遺伝性または散発性疾患を挙げることができる。例示的な F G F R 3 関連骨格疾患としては、限定されるものではないが、軟骨無形成症、タナトフォリック骨異形成症 I 型 ( T D I ) 、タナトフォリック骨異形成症 I I 型 ( T D I I ) 、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症 ( S A D D A N ) 、軟骨低形成症、および頭蓋骨縫合早期癒合症候群 ( 例えば、 M u e n k e 症候群、クルーゾン症候群、およびクルーゾン皮膚骨格症候群 ) 、ならびに屈指・高身長・難聴症候群 ( C A T S H L ) が挙げられる。

#### 【 0 0 3 3 】

用語「線維芽細胞成長因子」および「 F G F 」は、種々の代謝プロセス、例として、内分泌シグナリング経路、発育、創傷治癒、および血管新生に関する構造的に関連するシグナリング分子が挙げられる F G F ファミリーのメンバーを指す。 F G F は、広範な細胞および組織タイプの増殖および分化における重要な役割を担う。この用語は、好ましくは、 F G F R 3 に結合することが示されている F G F 1 、 F G F 2 、 F G F 9 、 F G F 1 8 、 F G F 1 9 、および F G F 2 1 を指す。 20 例えば、 F G F としては、ヒト F G F 1 ( 例えば、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) 、ヒト F G F 2 ( 例えば、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) 、ヒト F G F 9 ( 例えば、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) 、ヒト F G F 1 8 ( 例えば、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) 、ヒト F G F 1 9 ( 例えば、配列番号 3 8 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) 、およびヒト F G F 2 1 ( 例えば、配列番号 3 9 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) を挙げることができる。

#### 【 0 0 3 4 】

本明細書において使用される用語「線維芽細胞成長因子受容体 3 」、「 F G F R 3 」または「 F G F R 3 受容体」は、 1 つ以上の F G F ( 例えば、 F G F 1 、 F G F 2 、 F G F 9 、 F G F 1 8 、 F G F 1 9 、および / または F G F 2 1 ) に特異的に結合するポリペプチドを指す。ヒト F G F R 3 遺伝子は、第 4 染色体の遠位短腕上に局在し、 1 9 個のエキソンを含有し、シグナルペプチドを含む 8 0 6 アミノ酸タンパク質前駆体 ( 線維芽細胞成長因子受容体 3 アイソフォーム 1 前駆体 ) ( 例えば、配列番号 6 または 3 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) をコードする。骨格成長障害 ( 例えば、軟骨無形成症 ) をもたらす F G F R 3 アミノ酸配列中の突然変異としては、 40 例えば、アルギニン残基による 3 8 0 位におけるグリシン残基の置換 ( すなわち、 G 3 8 0 R ) が挙げられる。天然発生ヒト F G F R 3 遺伝子は G e n b a n k アクセション番号 N M \_ 0 0 0 1 4 2 . 4 に示されるヌクレオチド配列を有し、天然発生ヒト F G F R 3 タンパク質は G e n b a n k アクセッ

10

20

30

40

50

ション番号 N P \_ 0 0 0 1 3 3 に示されるアミノ酸配列を有し、本明細書において配列番号 5 により表される。野生型 F G F R 3 ( 例えば、配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) は、 I g 様 C 2 型ドメイン 1 ~ 3 を含む細胞外免疫グロブリン様膜ドメイン ( アミノ酸残基 1 ~ 3 3 5 ) 、膜貫通ドメイン ( アミノ酸残基 3 4 5 ~ 3 7 7 ) 、および細胞内ドメイン ( アミノ酸残基 3 7 8 ~ 7 8 4 ) からなる。 F G F R 3 としては、全長野生型 F G F R 3 ( 例えば、配列番号 5 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) の断片および / またはバリアント ( 例えば、スプライスバリアント、 例えば、エキソン 9 ではなく代替エキソン 8 を利用するスプライスバリアント ) を挙げることができる。

#### 【 0 0 3 5 】

用語「断片」および「一部」は、全体の一部分、 例えば、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも 1 0 % 、 2 0 % 、 3 0 % 、 4 0 % 、 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 以上を含有するポリペプチドまたは核酸分子を指す。断片または一部は、 例えば、 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 、 1 0 0 、 1 1 0 、 1 2 0 、 1 3 0 、 1 4 0 、 1 5 0 、 1 6 0 、 1 7 0 、 1 8 0 、 1 9 0 、 2 0 0 、 2 1 0 、 2 2 0 、 2 3 0 、 2 4 0 、 2 5 0 、 2 6 0 、 2 7 0 、 2 8 0 、 2 9 0 、 3 0 0 、 3 1 0 、 3 2 0 、 3 3 0 、 3 4 0 、 3 5 0 、 3 6 0 、 3 7 0 、 3 8 0 、 3 9 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、 6 0 0 、 7 0 0 個以上のアミノ酸残基、最大で参照ポリペプチド ( 例えば、配列番号 5 または 3 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) の全長を含有し得る。 例えば、 F G F R 3 断片は、配列番号 1 または 2 の少なくとも 2 0 0 、 2 0 5 、 2 1 0 、 2 1 5 、 2 2 0 、 2 2 5 、 2 3 5 、 2 3 0 、 2 4 0 、 2 4 5 、 2 5 0 、 2 5 5 、 2 6 0 、 2 6 5 、 2 7 5 、 2 8 0 、 2 8 5 、 2 9 0 、 または 3 0 0 個の連続アミノ酸を有する任意のポリペプチドを含み得る。さらに、 F G F R 3 断片は、配列番号 4 または 3 3 の少なくとも 2 0 0 、 2 0 5 、 2 1 0 、 2 1 5 、 2 2 0 、 2 2 5 、 2 3 5 、 2 3 0 、 2 4 0 、 2 4 5 、 2 5 0 、 2 5 5 、 2 6 0 、 2 6 5 、 2 7 5 、 2 8 0 、 2 8 5 、 2 9 0 、 3 0 0 、 3 0 5 、 3 1 0 、 3 1 5 、 3 2 0 、 3 2 5 、 3 3 0 、 3 3 5 、 3 4 5 、 または 3 4 5 個の連続アミノ酸を有する任意のポリペプチドを含み得る。

#### 【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される用語「宿主細胞」は、対応するポリヌクレオチドから s F G F R 3 ポリペプチドを発現させるために必要とされる必須細胞構成成分、 例えば、細胞小器官を含む輸送体を指す。ポリヌクレオチドの核酸配列は、典型的には、当分野における公知の慣用技術 ( 例えば、形質転換、形質移入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、および直接マイクロインジェクション ) により宿主細胞中に導入することができる核酸ベクター ( 例えば、プラスミド、人工染色体、ウイルスベクター、またはファージベクター ) 中に含まれる。宿主細胞は、原核細胞、 例えば、細菌もしくは古細菌細胞、または真核細胞、 例えば、哺乳動物細胞 ( 例えば、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞またはヒト胚性腎 2 9 3 ( H E K 2 9 3 ) ) であり得る。好ましくは、宿主細胞は、哺乳動物細胞、 例えば、 C H O 細胞である。

#### 【 0 0 3 7 】

「単離」は、その天然環境から分離され、回収され、または精製されたものを意味する。 例えば、単離 s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えば、 s F G F R 3 ポリペプチドまたはそのバリアント、 例えば、配列番号 2 または 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) は、 例えば、細胞培養培地から s F G F R 3 ポリペプチドを単離した後のある程度の純度により特徴付けることができる。単離 s F G F R 3 ポリペプチドは、 s F G F R 3 ポリペプチドが調製物中に存在する総材料 ( 例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、細胞残屑、および環境汚染物 ) の少なくとも 7 5 重量 % ( 例えば、調製物中に存在する総材料の少なくとも 8 0 重量 % 、少なくとも 8 5 重量 % 、少なくとも 9 0 重量 % 、少なくとも 9 5 重量 % 、少なくとも 9 6 重量 % 、少なくとも 9 7 重量 % 、少なくとも 9 9 重量 % または少なくとも 9 9 . 5 重量 % ) を構成するように少なくとも 7 5 % 純粋であり得る。同様に、 s F G F R 3 ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド ( 例えば、配列番号 2 0 、 2 1 、

10

20

30

40

50

36、または37の核酸配列を有するポリヌクレオチド)、または単離宿主細胞(例えば、CHO細胞、HEK293細胞、L細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、またはCOS-7細胞)は、ポリヌクレオチドまたは宿主細胞が調製物中に存在する総材料(例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、細胞残屑、および環境汚染物)の少なくとも75重量%(例えば、調製物中に存在する総材料の少なくとも80重量%、少なくとも85重量%、少なくとも90重量%、少なくとも95重量%、少なくとも96重量%、少なくとも97重量%、少なくとも99重量%または少なくとも99.5重量%)を構成するように少なくとも75%純粋であり得る。

【0038】

「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」は、本明細書において互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、それとしてはDNAおよびRNAが挙げられる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変ヌクレオチドもしくは塩基、および/またはそれらの類似体、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびその類似体を含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造の改変は、ポリマーの集合前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成成分により中断されていてよい。ポリヌクレオチドは、例えば、標識とのコンジュゲーションにより合成後にさらに改変することができる。

【0039】

用語「患者」および「対象」は、哺乳動物、例として、限定されるものではないが、ヒト(例えば、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有するヒト)または非ヒト哺乳動物(例えば、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有する非ヒト哺乳動物)、例えば、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、またはネコを指す。好ましくは、患者は、骨格成長遅滞障害(例えば、軟骨無形成症)を有するヒト、特に、骨格成長遅滞障害(例えば、軟骨無形成症)を有する幼児、小児、または若年者である。

【0040】

本明細書において使用される用語「非経口投与」、「非経口投与する」および他の文法的に同等の語句は、通常、注射による腸内および局所投与以外の、sFGFR3ポリペプチド(例えば、sFGFR3ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド、例えば、配列番号18もしくは34のアミノ酸配列を有するポリペプチド)を含む組成物の投与方式を指し、それとしては、限定されるものではないが、皮下、皮内、静脈内、鼻腔内、眼内、経肺、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、肺内、腹腔内、経気管、表皮下、関節内、囊下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、脳内、頭蓋内、頸動脈内、および胸骨内注射および注入が挙げられる。

【0041】

「薬学的に許容可能な賦形剤、担体、またはアジュバント」は、それぞれ、対象(例えば、ヒト)に対して生理学的に許容可能である一方、それとともに投与される医薬組成物(例えば、sFGFR3ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド、例えば、配列番号18もしくは34のアミノ酸配列を有するポリペプチド)の治療特性を保持する希釈剤、賦形剤、担体、またはアジュバントを意味する。1つの例示的な薬学的に許容可能な担体は、生理食塩水である。他の生理学的に許容可能な希釈剤、賦形剤、担体、またはアジュバントおよびそれらの配合物は、当業者に公知である。

【0042】

「医薬組成物」は、活性剤、例えば、sFGFR3(例えば、sFGFR3ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド、例えば、配列

10

20

30

40

50

番号 1 8 もしくは 3 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド)を、少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤との配合で含有する組成物を意味する。医薬組成物は、患者(例えば、骨格成長遅滞障害を有する患者、例えば、軟骨無形成症を有する患者)における疾患またはイベント(例えば、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症)の治療のための治療レジメンの一部として政府規制機関の承認を受けて製造し、または販売することができる。医薬組成物は、例えば、非経口投与のために、例えば、皮下投与(例えば、皮下注射による)もしくは静脈内投与(例えば、粒子状塞栓物質を有さない、静脈内使用に好適な溶媒系中の無菌液剤として)のために、または経口投与(例えば、錠剤、カプセル剤、カプレット剤、ゲルキャップ剤、またはシロップ剤として)のために配合することができる。

10

#### 【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される用語「配列同一性」は、配列をアラインし、必要によりギャップを導入して最大同一性パーセントを達成した後の、参照配列、例えば、野生型 s F G F R 3 ポリペプチド(例えば、配列番号 5 または 3 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド)または s F G F R 3 ポリペプチド(例えば、s F G F R 3 ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号 2、4、もしくは 3 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド、例えば、配列番号 1 8 もしくは 3 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド)のアミノ酸(または核酸)残基と同一である候補配列、例えば、F G F R 3 ポリペプチドのアミノ酸(または核酸)残基の割合を指す(例えば、ギャップは、最適なアラインメントのために候補および参照配列の一方または両方に導入することができ、非相同配列は、比較目的のために無視することができる)。同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技能の範囲内の種々の手法で、例えば、公的に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、B L A S T、B L A S T - 2、B L A S T - P、B L A S T - N、B L A S T - X、W U - B L A S T - 2、A L I G N、A L I G N - 2、C L U S T A L、またはM e g a l i g n (D N A S T A R)ソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、アラインメントの計測に適切なパラメータ、例として、比較される配列の全長にわたり最大アラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを決定することができる。例えば、所与の参照配列との、それについての、またはそれに対する所与の候補配列のアミノ酸(または核酸)配列同一性パーセント(所与の参照配列との、それについての、またはそれに対するあるアミノ酸(または核酸)配列同一性パーセントを有し、または含む所与の候補配列と代替的に表現することができる)は、以下のとおり計算される:

20

$$100 \times (A / B \text{ の率})$$

(式中、A は、候補配列および参照配列のアラインメントにおいて同一とスコアリングされるアミノ酸(または核酸)残基の数であり、B は、参照配列中のアミノ酸(または核酸)残基の総数である)。特に、候補配列との比較のためにアラインされる参照配列は、候補配列が例えば、候補配列の全長または候補配列の連続アミノ酸(または核酸)残基の選択部分にわたり 50% ~ 100% の同一性を示すことを示し得る。比較目的のためにアラインされる候補配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも 30%、例えば、少なくとも 40%、例えば、少なくとも 50%、60%、70%、80%、90% または 100% である。候補配列中の位置が、参照配列中の対応位置と同一のアミノ酸(または核酸)残基により占有される場合、その分子はその位置において同一である。

30

#### 【 0 0 4 4 】

「シグナルペプチド」は、ポリペプチドを分泌経路(例えば、細胞外空間)に指向するポリペプチドの N 末端における短鎖ペプチド(例えば、5 ~ 30 アミノ酸長、例えば、22 アミノ酸長)を意味する。シグナルペプチドは、典型的には、ポリペプチドの分泌の間に開裂される。シグナル配列は、ポリペプチドを細胞内コンパートメントまたは細胞小器官、例えば、ゴルジ装置に指向し得る。シグナル配列は、ポリペプチドを細胞の特定の領域に標的化する公知の機能を有するペプチドとの相同性、または生物学的活性により同定することができる。当業者は、容易に利用可能なソフトウェア(例えば、S e q u e n c e

40

50

Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、BLAST、またはPILEUP/PRETTY BOXプログラム)を使用することによりシグナルペプチドを同定することができる。シグナルペプチドは、例えば、配列番号6または35のアミノ酸配列と実質的に同一のものであり得る。

#### 【0045】

本明細書において使用される用語「骨格成長遅滞障害」は、骨の変形および/または異形により特徴付けられる骨格疾患を指す。これらの障害としては、限定されるものではないが、成長板(骨端軟骨)骨折により引き起こされる骨格成長遅滞障害、特発性骨格成長遅滞障害、またはFGFR3関連骨格疾患が挙げられる。特に、骨格成長遅滞障害(例えば、軟骨無形成症)を有する患者は、健常患者の骨よりも短い骨を有し得る。例えば、骨格成長遅滞障害としては、骨異形成症、例えば、軟骨無形成症、ホモ接合性軟骨無形成症、ヘテロ接合性軟骨無形成症、軟骨無発生症、先端骨形成不全症、遠位中間肢異形成症、骨発生不全症、屈曲肢異形成症、点状軟骨異形成症、肢根型点状軟骨異形成症、鎖骨頭蓋骨異形成症、先天性大腿骨短縮症、頭蓋骨縫合早期癒合症(例えば、Muenke症候群、クルーゾン症候群、アペール症候群、Jackson-Weiss症候群、ファイファー症候群、またはクルーゾン皮膚骨格症候群)、指奇形(dactyly)、短指症、屈指症、多指症、合指症、捻曲性骨異形成症、小人症、分節異常骨異形成症、内軟骨腫症、線維性軟骨発生症、線維性骨異形成症、遺伝性多発性外骨腫症、軟骨低形成症、低ホスファターゼ症、低リン血症性くる病、Jaffee-Lichtenstein症候群、クニースト骨異形成症、クニースト症候群、ランガー型中間肢異形成症、マルファン症候群、マッキュー・オルブライト症候群、小肢症、骨幹端異形成症、Janssen型骨幹端異形成症、変容性異形成症、モルキオ症候群、二ベルゲルト型中間肢異形成症、神経線維腫症、変形性関節症、骨軟骨異形成症、骨形成不全症、骨形成不全症周産期致死型、大理石骨病、骨斑紋症、末梢骨形成不全症、Reinhardt症候群、Roberts症候群、ロビノウ症候群、短肋骨多指症候群、低身長、先天性脊椎・骨端骨異形成症、および脊椎・骨端・骨幹端異形成症を挙げることができる。

#### 【0046】

用語「可溶性線維芽細胞成長因子受容体3」、「可溶性FGFR3」、および「sFGFR3」は、膜貫通ドメインおよびFGFR3ポリペプチドを細胞膜に固定する任意のポリペプチド部分(例えば、チロシンキナーゼドメイン)の全てまたは要部の不存在または機能破壊により特徴付けられるFGFR3を指す。sFGFR3ポリペプチドは、FGFR3ポリペプチドの非膜結合形態である。特に、FGFR3の膜貫通ドメインは、野生型FGFR3配列(例えば、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド)のアミノ酸残基345から377またはシグナルペプチドを含む野生型FGFR3配列(例えば、配列番号32のアミノ酸配列を有するポリペプチド)のアミノ酸残基367から399に伸びる。したがって、sFGFR3ポリペプチドは、野生型FGFR3ポリペプチド配列(例えば、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチド)のアミノ酸残基345~377またはシグナルペプチドを含む野生型FGFR3配列(例えば、配列番号32のアミノ酸配列を有するポリペプチド)のアミノ酸残基367~399の一部または全てを欠失し得る。sFGFR3ポリペプチドは、野生型FGFR3ポリペプチド配列の細胞質ドメイン(配列番号5のアミノ酸残基378~784)またはシグナルペプチド配列を含む野生型FGFR3ポリペプチド配列の細胞質ドメイン(配列番号32のアミノ酸残基378~806)をさらに欠失し得る。

#### 【0047】

例示的なsFGFR3ポリペプチドは、限定されるものではないが、配列番号1または2の少なくともアミノ酸1~100、1~125、1~150、1~175、1~200、1~205、1~210、1~215、1~220、1~225、1~230、1~23

10

20

30

40

50

5、1～240、1～245、1～250、1～252、1～255、1～260、1～265、1～270、1～275、1～280、1～285、1～290、1～295、または1～300、または1～301を含み得る。s F G F R 3ポリペプチドとしては、配列番号1または2のそれらのs F G F R 3ポリペプチドのいずれかと少なくとも50%（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列同一性を有する任意のポリペプチドを挙げることができる。さらに、例示的なs F G F R 3ポリペプチドは、限定されるものではないが、配列番号4または33の少なくともアミノ酸1～100、1～125、1～150、1～175、1～200、1～205、1～210、1～215、1～220、1～225、1～230、1～235、1～240、1～245、1～250、1～255、1～260、1～265、1～270、1～275、1～280、1～285、1～290、1～295、1～300、1～305、1～310、1～315、1～320、1～325、1～330、1～335、1～340、1～345、または1～348を含み得る。s F G F R 3ポリペプチドとしては、配列番号4または33のアミノ酸配列を有するそれらのs F G F R 3ポリペプチドのいずれかと少なくとも50%（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列同一性を有する任意のポリペプチドを挙げることができる。上記s F G F R 3ポリペプチドまたはそのバリエントのいずれも、場合により、N末端位置におけるシグナルペプチド、例えば、配列番号6のアミノ酸1～22(M G A P A C A L A L C V A V A I V A G A S S)または配列番号35のアミノ酸1～19（例えば、M M S F V S L L L V G I L F H A T Q A）を含み得る。10

#### 【0048】

「治療すること」および「治療」は、患者（例えば、ヒト、例えば、幼児、小児、または若年者）における骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）の進行もしくは重症度の、または骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）の1つ以上の症状の進行、重症度、もしくは頻度の低減（例えば、少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%またはさらには100%だけ）を意味する。治療は、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有する患者（例えば、ヒト、例えば、幼児、小児、または若年者）を治療するためにs F G F R 3ポリペプチドが一定期間（例えば、数日間、数カ月間、数年間以上）投与される治療期間生じ得る。s F G F R 3（例えば、s F G F R 3ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド、例えば、配列番号18もしくは34のアミノ酸配列を有するポリペプチド）により治療することができる軟骨無形成症の例示的な症状としては、限定されるものではないが、低身長、長い胴体、短縮四肢、約42～約56インチの成人身長、相対的に大きな頭部、隆起した額、未発育の顔面部分、X脚（例えば、「外反膝」）、動搖性歩行、短く太い指、短く太い足指、肘における腕部を伸ばす能力の制限、腰部の過剰な屈曲、歯科疾病（例えば、歯の密集からのもの）、肥満疾病、神経疾病、呼吸器疾病、ならびに/または腰部および/もしくは脊椎における疼痛および無感覚が挙げられる。30

#### 【0049】

ポリペプチドに関する用語「バリエント」は、バリエントが由来するポリペプチド（例えば、親ポリペプチド、例えば、配列番号1または7のアミノ酸配列を有するポリペプチド）とアミノ酸配列中の1つ以上の変化だけ異なるポリペプチド（例えば、s F G F R 3ポリペプチドまたはそのバリエント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド、例えば、配列番号18もしくは34のアミノ酸配列を有するポリペプチド）を指す。ポリヌクレオチドに関する用語「バリエント」は、バリエントが由来するポリヌクレオチド（例40

10

20

30

40

50

えば、親ポリヌクレオチド)と核酸配列中の1つ以上の変化だけ異なるポリヌクレオチド(例えば、s F G F R 3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、配列番号20、21、36、または37の核酸配列を有するポリヌクレオチド)を指す。バリアントのアミノ酸または核酸配列中の変化は、例えば、アミノ酸または核酸置換、挿入、欠失、N末端トランケーション、もしくはC末端トランケーション、またはそれらの任意の組合せであり得る。特に、アミノ酸置換は、保存的および/または非保存的置換であり得る。バリアントは、それぞれ親ポリペプチド(例えば、s F G F R 3ポリペプチドまたはそのバリアント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド、例えば、配列番号18もしくは34のアミノ酸配列を有するポリペプチド)または親ポリヌクレオチド(例えば、s F G F R 3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、配列番号20、21、36、または37の核酸配列を有するポリヌクレオチド)とのアミノ酸配列同一性または核酸配列同一性により特徴付けることができる。例えば、バリアントとしては、配列番号1、2、4、または33のアミノ酸配列を有するポリペプチドと少なくとも50%(例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上)の配列同一性を有する任意のポリペプチドを挙げることができる。バリアントとしては、配列番号20、21、36、または37の核酸配列を有するポリヌクレオチドと少なくとも50%(例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上)の配列同一性を有する任意のポリヌクレオチドを挙げることもできる。10 20

#### 【0050】

「ベクター」は、s F G F R 3ポリペプチド(例えば、s F G F R 3ポリペプチドまたはそのバリアント、例えば、配列番号2、4、もしくは33のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド、例えば、配列番号18もしくは34のアミノ酸配列を有するポリペプチド)をコードする1つ以上のポリヌクレオチド、またはその断片を含むDNA構築物を意味する。ベクターは、s F G F R 3ポリペプチドへのベクターのポリヌクレオチドの翻訳をもたらす細胞(例えば、宿主細胞またはヒト骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有する患者の細胞)に感染させるために使用することができる。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、それは、追加のDNAセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを指す。あるベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自己複製し得る(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込むことができ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、あるベクターは、それらが作動可能に結合している遺伝子の発現を指向し得る。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。30

#### 【0051】

用語「単位剤形」は、それぞれの単位が所望の治療効果をもたらすために計算された所定量の活性材料を、任意の好適な医薬賦形剤、担体、または希釈剤との会合で含有するヒト対象および他の哺乳動物についての単位投与量として好適な物理的に区別される単位を指す。40

#### 【0052】

終点による数値範囲の本明細書における引用は、その範囲内に含まれる全ての数字を含むものとする(例えば、1~5の引用は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、および5を含む)。

#### 【0053】

本発明の他の特徴部および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0054】

【図1A-D】sFGFR3ポリペプチドのセンサーグラムを示すグラフである。センサーグラムを、sFGFR3\_Del1 (配列番号7)、sFGFR3\_Del4 (配列番号1)、およびsFGFR3\_Del14-LK1-LK2 (配列番号10; 図1A) ; sFGFR3\_Del1 (配列番号7) およびsFGFR3\_Del11-D3 (配列番号9; 図1B) ; sFGFR3\_Del14-LK1-LK2 (配列番号10)、sFGFR3\_Del14-LK1-LK2-C253S (配列番号11)、およびsFGFR3\_Del14-LK1-LK2-D3 (配列番号12; 図1C) ; ならびにsFGFR3\_Del4 (配列番号1)、sFGFR3\_Del14-C253S (配列番号2)、およびsFGFR3\_Del14-D3 (配列番号33; 図1D) について示す。

【図2A-C】sFGFR3ポリペプチドのウエスタンプロットの画像である。還元(R)および非還元(NR)条件下のウエスタンプロットを、sFGFR3\_Del1、sFGFR3\_Del1-C253S (配列番号8)、およびsFGFR3\_Del11-D3 (図2A) ; sFGFR3\_Del14-LK1-LK2、sFGFR3\_Del14-LK1-LK2-C253S、およびsFGFR3\_Del14-LK1-LK2-D3 (図2B) ; ならびにsFGFR3\_Del14、sFGFR3\_Del14-C253S、およびsFGFR3\_Del14-D3 (図2C) について示す。

【図3A-B】FGF2の存在下でFgfr3ach/+軟骨細胞を使用したsFGFR3\_Del14、sFGFR3\_Del14-C253S、およびsFGFR3\_Del14-D3のセンサーグラム(図3A)および増殖アッセイ(図3B)を示すグラフである。

【図4】1ng/mlのhFGF2を用いてまたは用いずに0nM、70nM、および280nMにおけるsFGFR3\_Del14-D3とインキュベートしたFGFR3G380Rを発現する血清応答エレメント-ルシフェラーゼ(SRE-Luc)HEK細胞におけるルシフェラーゼシグナリングを示すグラフである(\*は、0nMにおけるsFGFR3\_Del14-D3と比較したp値<0.05を示し；\*\*\*は、p値<0.001を示す)。

【図5】日齢(日数)に対する低用量(0.25mg/kg)のsFGFR3\_Del14-D3による処理3日後の生存動物(野生型(wt)およびFgfr3ach/+マウス)の割合を示すグラフである。ビヒクル(PBS)を受容した生存wtマウスの割合も示す。

【図6】野生型FGFR3ポリペプチド(配列番号5または32)、sFGFR3\_Del14-C253S(配列番号2)、およびsFGFR3\_Del14-D3(配列番号33)のバリエントのIg様C2型ドメイン1(IgI)、2(IgII)、および3(IgIII)に対応するアミノ酸残基を示す画像である。sFGFR3\_Del14-C253Sは、配列番号1の253位におけるセリン残基によるシステイン残基のアミノ酸置換を含む。

【図7A-B】sFGFR3ポリペプチドのウエスタンプロットの画像である。還元(R)および非還元(NR)条件下のウエスタンプロットを、2.3mg/mlおよび23mg/mlのsFGFR3\_Del11-D3(図7A)ならびに1.5mg/mlおよび15mg/mlのsFGFR3\_Del11-C253S(図7B)について示す。

【図8A-B】20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5緩衝液および40mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5緩衝液中のsFGFR3\_Del14-C253Sの融解温度(Tm)(図8A)ならびに20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5緩衝液および20mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5緩衝液中のsFGFR3\_Del14-D3のTm(図8B)を示すグラフである。

【図9A-C】sFGFR3\_Del14-D3の高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)溶出プロファイルを示すグラフである。FPLC溶出プロファイルを、図9A:0分、2時間、および24時間におけるsFGFR3\_Del14-D3、cpm/分画(図9A)；図9B:1分、15分、30分、2時間、および24時間における静脈内

10

20

30

40

50

ボーラスにより投与された s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 、 c p m / 分画および最大ピークに正規化したもの（図 9 B（続き）に示す）；図 9 C：30 分、2 時間、4 時間、および 24 時間ににおける皮下注射により投与された s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 、 c p m / 分画および最大ピークに正規化したもの（図 9 C（続き）に示す）について示す。

【図 10 A - B】s F G F R 3 ポリペプチドの存在下での F g f r 3 a c h / + の軟骨細胞の増殖の割合（%）を示すグラフである。F g f r 3 a c h / + 軟骨細胞増殖を、1 ug / ml、10 ug / ml、および 50 ug / ml の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（図 10 A）ならびに 1 ug / ml、10 ug / ml、および 50 ug / ml の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（図 10 B）について示す。

【図 11】皮下投与された 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および静脈内投与された 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の PK プロファイルを示すグラフである。 10

【図 12】静脈内投与の 30 分、120 分、および 1440 分後における腎臓、肝臓、脾臓、肺、および心臓組織中の 125 I - s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の濃度を示すグラフである。濃度を 1 グラム当たりの注射用量のパーセント（% I D / g）として表現する。

【図 13】皮下投与の 30 分、120 分、240 分、480 分、および 1440 分後における腎臓、肝臓、脾臓、肺、および心臓組織中の 125 I - s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の濃度を示すグラフである。濃度を % I D / g として表現する。

【図 14 A - B】脳組織中の 125 I - s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の濃度（c）および分布容量（Vd）を示すグラフである。静脈内ボーラスの 30 分、2 時間、および 24 時間後における血管含有率および分解についての補正前後の 125 I - s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の c（図 14 A）ならびに静脈内ボーラスの 30 分、2 時間、および 24 時間後における 125 I - s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および RSA の Vd（図 14 B）を示す。 20

【図 15】s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を投与された生存 F g f r 3 a c h / + マウスの割合を示すグラフである。22 日間にわたり、ビヒクルとしての PBS を投与された生存野生型マウス、生存 F g f r 3 a c h / + マウス、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回投与された生存 F g f r 3 a c h / + マウス、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された生存 F g f r 3 a c h / + マウス、および 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された生存 F g f r 3 a c h / + マウスを示す。 30

【図 16】ビヒクルとしての PBS、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回、および 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスにおける口コモーターおよび腹式呼吸合併症の割合（%）を示すグラフである。

【図 17 A - D】s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を投与された F g f r 3 a c h / + マウスの体長を示すグラフおよび x 線写真である。ビヒクルとしての PBS を投与された野生型マウス、ならびにビヒクルとしての PBS、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回、および 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスの軸長（図 17 A）、尾長（図 17 B）、および 脊骨長（図 17 C）を示す。ビヒクルとしての PBS を投与された野生型マウスならびにビヒクルとしての PBS、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回、および 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスの x 線写真（図 17 D）も示す。全ての計測値はミリメートル（mm）におけるものである。 40

【図 18 A - B】それぞれ、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を投与された F g f r 3 a c h / + マウスの頭蓋比を示すグラフおよび頭蓋を示す x 線写真である。グラフ（図 18 A）において、ビヒクルとしての PBS を投与された野生型マウスならびにビヒクルとしての PBS、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回、2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回、および 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスの x 線写真（図 18 B）も示す。 50

e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスの頭蓋比 ( L / W ) を示す。 × 線写真 ( 図 18 B ) において、ビヒクルとしての P B S を投与された野生型マウス、ビヒクルとしての P B S を投与された F g f r 3 a c h / + マウス、 1 0 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された野生型マウス、および 1 0 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスの頭蓋を示す。

【図 19 A - E】固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への異なる濃度の h F G F 1 、 F G F 2 、 h F G F 9 、 h F G F 1 8 、 h F G F 1 9 、および h F G F 2 1 の結合についてのリアルタイムでのカイネティックプロファイルを示すグラフである。固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への 0 . 5 n M ~ 1 2 n M の濃度における h F G F 1 ( 図 19 A ) ；固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への 2 n M ~ 1 0 n M の濃度における h F G F 2 ( 図 19 B ) ；固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への 1 n M ~ 5 n M の濃度における h F G F 9 ( 図 19 C ) ；固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への 1 n M ~ 1 0 n M の濃度における h F G F 1 8 ( 図 19 D ) ；固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への 2 n M ~ 2 0 n M の濃度における h F G F 1 9 ( 図 19 E ) ；および固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への 1 0 0 n M ~ 1 0 0 0 0 n M の濃度における h F G F 2 1 ( 図 19 F ) の結合についてのカイネティックプロファイルを示す。暗色重複線は、 K d 値を生成するために使用された 2 : 1 結合モデルを表す。

【図 20】非誘導野生型 A T D C 5 および F G F R 3 G 3 8 0 R を発現するレトロウイルス感染 A T D C 5 細胞のウエスタンプロットの画像である。

【図 21】3 回の実験についての S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 の存在下での A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞の増殖の誘導を示すグラフである。非処理 A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞を対照として使用した。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【 0 0 5 5 】

本発明者らは、可溶性線維芽細胞成長因子受容体 3 ( s F G F R 3 ) ポリペプチドおよびそのバリエントを使用して患者 ( 例えば、ヒト、特に、幼児、小児、または若年者 ) における骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を治療することができる発見した。特に、本発明の s F G F R 3 ポリペプチドは、以下の例示的な s F G F R 3 ポリペプチド : 2 5 3 位におけるセリン残基によるシステイン残基のアミノ酸置換を含む s F G F R 3 \_ D e 1 4 ( s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ; 配列番号 2 ) および拡張 I g 様 C 2 型ドメイン 3 を含む s F G F R 3 \_ D e 1 4 ( s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ; 配列番号 3 3 ) ならびにそれらのバリエント、例えば、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する s F G F R 3 ポリペプチドを提供するため、例えば、配列番号 5 のアミノ酸 2 8 9 ~ 4 0 0 または配列番号 3 2 のアミノ酸 3 1 1 ~ 4 2 2 の欠失を特徴とする。さらに、 s F G F R 3 ポリペプチドはシグナルペプチドを含み得、例えば、配列番号 1 8 または 3 4 のアミノ酸配列を有する s F G F R 3 ポリペプチドである。 s F G F R 3 \_ D e 1 4 ( 配列番号 1 ) の説明については、米国仮特許出願第 6 2 / 2 7 6 , 2 2 2 号明細書および国際特許出願第 P C T / U S 1 6 / 1 2 5 5 3 号明細書 ( それらのそれぞれは参照により全体として本明細書に組み込まれる ) を参照されたい。

##### 【 0 0 5 6 】

例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性 ( 例えば、少なくとも 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 以上の配列同一性 ) を有する s F G F R 3 ポリペプチドおよびそのバリエントは、配列番号 1 の 2 5 3 位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換を含み得る ( 例えば、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ; 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド ) 。特に、本発明の s F G F R 3 ポリペプチドは、例えば、セリン残基による配列番号 1 の 2 5 3 位におけるシステイン残基の置換を含み得る。例えば、 2 5 3 位におけるシステイン残基は、セリン残基または例えば、別の保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンにより

10

20

30

40

50

置換されている。

【0057】

s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 3 2 のアミノ酸残基 2 3 ~ 3 5 7 と少なくとも 9 0 % ( 例えは、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性 ) のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチド配列も含み得、ポリペプチドは、F G F R 3 のシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインを欠き、( i ) 5 0 0 アミノ酸長未満であり；( i i ) 2 0 0 個以下の連続アミノ酸の F G F R 3 の細胞内ドメインを含み；および / または ( i i i ) F G F R 3 のチロシンキナーゼドメインを欠く ( 例えは、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ; 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド )。本発明の s F G F R 3 ポリペプチドを投与して患者 ( 例えは、ヒト、特に、幼児、小児、または若年者 ) における骨格成長遅滞障害 ( 例えは、軟骨無形成症 ) を治療する方法も記載される。

【0058】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド、產生方法、治療方法、組成物、およびキットが本明細書に記載される。

【0059】

可溶性線維芽細胞成長因子受容体 3 ( s F G F R 3 ) ポリペプチド

本発明は、骨格成長遅滞障害 ( 例えは、軟骨無形成症 ) の治療のために配合される s F G F R 3 ポリペプチドおよびそのバリアントを特徴とする。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性 ( 例えは、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性 ) を有し得、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 1 の 2 5 3 位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換を含む ( 例えは、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ; 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド )。例えば、配列番号 1 の 2 5 3 位におけるシステイン残基は、セリン残基または保存的アミノ酸置換、例えは、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンにより置換されている。

【0060】

s F G F R 3 ポリペプチドおよびそのバリアントとしては、配列番号 2 と少なくとも 5 0 % の配列同一性 ( 例えは、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 上の配列同一性 ) を有する配列番号 2 のアミノ酸配列の断片 ( 例えは、配列番号 2 の少なくともアミノ酸 1 ~ 2 0 0 、1 ~ 2 0 5 、1 ~ 2 1 0 、1 ~ 2 1 5 、1 ~ 2 2 0 、1 ~ 2 2 5 、1 ~ 2 3 5 、1 ~ 2 3 0 、1 ~ 2 4 0 、1 ~ 2 4 5 、1 ~ 2 5 0 、1 ~ 2 5 3 、1 ~ 2 5 5 、1 ~ 2 6 0 、1 ~ 2 6 5 、1 ~ 2 7 5 、1 ~ 2 8 0 、1 ~ 2 8 5 、1 ~ 2 9 0 、または 1 ~ 3 0 0 ) を含み得る。さらに、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 3 0 1 を含み得、s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号 1 の 2 5 3 位におけるセリン残基によるシステイン残基のアミノ酸置換を含む ( 例えは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド )。

【0061】

s F G F R 3 ポリペプチドおよびそのバリアントは、配列番号 3 3 と少なくとも 5 0 % の配列同一性 ( 例えは、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上の配列同一性 ) を有する配列番号 3 3 のアミノ酸配列の断片 ( 例えは、配列番号 3 3 の少なくともアミノ酸 1 ~ 2 0 0 、1 ~ 2 1 0 、1 ~ 2 2 0 、1 ~ 2 3 0 、1 ~ 2 4 0 、1 ~ 2 5 0 、1 ~ 2 6 0 、1 ~ 2 7 0 、1 ~ 2 8 0 、1 ~ 2 9 0 、1 ~ 3 0 0 、1 ~ 3 1 0 、1 ~ 3 2 0 、1 ~ 3 3 0 、1 ~ 3 4 0 、1 ~ 3 4 0 、または 1 ~ 3 4 5 ) も含み得る。さらに、配列番号 4 もしくは 3 3 の 2 5 3 位および / または配列番号 4 の 3 1 6 位におけるシステイン残基は、存在する場合、セリン残基または保存的アミノ酸置換、例えは、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンにより

10

20

30

40

50

置換されていてよい。

【0062】

本明細書に記載の結果を考慮すると、本発明は、特定の s F G F R 3 ポリペプチドにもそのバリエントにも限定されない。上記で考察される例示的な s F G F R 3 ポリペプチドおよびそのバリエントに加え、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリエント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））と類似の結合親和性を有する1つ以上の F G F（例えば、F G F 1（例えば、配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチド）、F G F 2（例えば、配列番号14のアミノ酸配列を有するポリペプチド）、F G F 9（例えば、配列番号15のアミノ酸配列を有するポリペプチド）、F G F 18（例えば、配列番号16のアミノ酸配列を有するポリペプチド）、F G F 19（例えば、配列番号38のアミノ酸配列を有するポリペプチド）、および/またはF G F 21（例えば、配列番号39のアミノ酸配列を有するポリペプチド））に結合する任意のポリペプチドを、例えば、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を治療する方法において使用することができる。s F G F R 3 ポリペプチドは、例えば、Ig様C2型ドメイン3のC末端半分をコードするエキソン8および9ならびに膜貫通ドメインを含むエキソン10を欠くF G F R 3 アイソフォーム2の断片（例えば、配列番号5または32のアミノ酸配列の断片）であり得、それはF G F R 3 転写物バリエント2（アクセシション番号NM\_022965）の断片に対応する。

【0063】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリエント（配列番号4））は、N末端位置におけるシグナルペプチドを含み得る。例示的なシグナルペプチドとしては、限定されるものではないが、配列番号6のアミノ酸1～22（例えば、M G A P A C A L A L C V A V A I V A G A S S）または配列番号35のアミノ酸1～19（例えば、M M S F V S L L L V G I L F H A T Q A）を挙げができる。したがって、s F G F R 3 ポリペプチドとしては、N末端シグナルペプチドを欠く分泌形態、およびN末端シグナルペプチドを含む非分泌形態の両方が挙げられる。例えば、分泌 s F G F R 3 ポリペプチドは、配列番号2、4、または33のアミノ酸配列を含み得る。あるいは、s F G F R 3 ポリペプチドはシグナルペプチドを含み、例えば、配列番号18、19、または34のアミノ酸配列である。当業者は、N末端シグナルペプチドの位置が異なる s F G F R 3 ポリペプチドにおいて変動し、例えば、ポリペプチドのN末端上の最初の5、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、27、30個以上のアミノ酸残基を含み得ることを認識する。当業者は、例えば、適切なコンピュータアルゴリズム、例えば、B e n d t s e n e t a l. (J. M o l. B i o l. 3 4 0 (4) 7 8 3 - 7 9 5, 2 0 0 4) に記載のものおよびc b s . d t u . d k / s e r v i c e s / S i g n a l P / においてウェブ上で利用可能なものによりシグナル配列開裂部位の位置を予測することができる。

【0064】

さらに、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリエント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））は、グリコシル化することができる。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、s F G F R 3 ポリペプチドがグリコシル化される程度を増加させ、または減少させるように変更することができる。s F G F R 3 ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作出され、または除去されるようにアミノ酸配列を変更することにより達成することができる。例えば、オリゴ糖がアスパラギン残基のアミド窒素に付着されるN-結合グリコシル化は、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号4または33）、

10

20

30

40

50

およびそれらのバリアントのアミノ酸配列の Asn 76、Asn 148、Asn 169、Asn 203、Asn 240、Asn 272、および／またはAsn 294の位置において生じ得る。これらのAsn残基の1つ以上は、グリコシル化部位を除去するように置換することもできる。例えば、オリゴ糖がアミノ酸残基の酸素原子に付着されるO-結合グリコシル化は、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33）、それらのバリアント（配列番号4）、およびシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド（配列番号18または34）のアミノ酸配列のSer 109、Thr 126、Ser 199、Ser 274、Thr 281、Ser 298、Ser 299、および／またはThr 301の位置において生じ得る。さらに、O-結合グリコシル化は、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33）およびそれらのバリアント（配列番号4）のSer 310および／またはSer 321の位置において生じ得る。これらのSerまたはThr残基の1つ以上は、グリコシル化部位を除去するように置換することもできる。

#### 【0065】

##### sFGFR3融合ポリペプチド

本発明のsFGFR3ポリペプチド（例えば、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））は、異種ポリペプチドからの機能ドメイン（例えば、免疫グロブリンの断片結晶化可能領域（Fc領域；例えば、配列番号25および26のアミノ酸配列を有するポリペプチド）またはヒト血清アルブミン（HSA；例えば、配列番号27のアミノ酸配列を有するポリペプチド））に融合させてsFGFR3融合ポリペプチドを提供することができる。場合により、フレキシブルリンカー、例えば、セリンまたはグリシンリッチ配列（例えば、ポリ-グリシンまたはポリ-グリシン／セリンリンカー、例えば、配列番号28および29）を、sFGFR3ポリペプチドおよび異種ポリペプチド（例えば、Fc領域またはHSA）間に含めることができる。

#### 【0066】

例えば、sFGFR3ポリペプチド（例えば、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））は、例えば、N末端またはC末端ドメインにおける免疫グロブリンのFc領域を含む融合ポリペプチドであり得る。特に、有用なFc領域としては、任意の哺乳動物（例えば、ヒト）からの任意の免疫グロブリン分子、例として、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgEおよびそれらの種々のサブクラス（例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、IgG-4、IgA-1、IgA-2）のFc断片を挙げることができる。例えば、Fc断片ヒトIgG-1（配列番号25）またはヒトIgG-1のバリアント、例えば、アラニンによる配列番号25の297位におけるアスパラギンの置換を含むバリアント（例えば、配列番号26のアミノ酸配列を有するポリペプチド）である。本発明のFc断片は、例えば、重鎖のCH2およびCH3ドメインならびにヒンジ領域の任意の部分を含み得る。本発明のsFGFR3融合ポリペプチドは、例えば、単量体Fc、例えば、CH2またはCH3ドメインも含み得る。Fc領域は、場合により、当業者に公知の任意の適切な1つ以上のアミノ酸残基においてグリコシル化することができる。本明細書に記載のFc断片は、本明細書に記載のFc断片のいずれかに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50個以上の付加、欠失、または置換を有し得る。

#### 【0067】

さらに、sFGFR3ポリペプチド（例えば、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））は、水溶液中のタンパク質の溶解度および安定性を改善する目的のため

にN末端またはC末端ドメインにおいて他の分子にコンジュゲートすることができる。このような分子の例としては、ヒト血清アルブミン（HSA）、PEG、PSA、およびウシ血清アルブミン（BSA）が挙げられる。例えば、sFGFR3ポリペプチドは、ヒトHSA（例えば、配列番号27のアミノ酸配列を有するポリペプチド）またはその断片にコンジュゲートすることができる。

#### 【0068】

sFGFR3融合ポリペプチドは、sFGFR3ポリペプチド（例えば、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33））、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））と、異種ポリペプチド（例えば、Fc領域またはHSA）との間のペプチドリンカー領域を含み得る。リンカー領域は、sFGFR3が生物学的に活性のままであること、例えば、立体障害を受けないことを可能とする任意の配列および長さのものであり得る。例示的なリンカーの長さは、1～200アミノ酸残基、例えば、1～5、6～10、11～15、16～20、21～25、26～30、31～35、36～40、41～45、46～50、51～55、56～60、61～65、66～70、71～75、76～80、81～85、86～90、91～95、96～100、101～110、111～120、121～130、131～140、141～150、151～160、161～170、171～180、181～190、または191～200アミノ酸残基である。例えば、リンカーは、フレキシブル部分、例えば、顕著な固定二次構造も三次構造も有さない領域を含む、またはそれからなる。好ましい範囲は、5～25および10～20アミノ酸長である。このようなフレキシビリティは、アミノ酸が小さく、アミノ酸鎖の回転または屈曲を妨害するかさ高い側鎖を有さない場合に一般に増加する。したがって、好ましくは、本発明のペプチドリンカーは、小型アミノ酸、特に、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシンおよびイソロイシンの増加した含有率を有する。

#### 【0069】

例示的なフレキシブルリンカーは、例えば、少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらには100%のグリシン残基を含有するグリシンリッチリンカーである。リンカーは、例えば、少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらには100%のセリン残基を含有するセリンリッチリンカーなども含有し得る。一部の場合、リンカーのアミノ酸配列は、グリシンおよびセリン残基のみからなる。例えば、リンカーは、GGGGAGGGG（配列番号28）またはGGGGSGGGGSGGGGS（配列番号29）のアミノ酸配列であり得る。リンカーは、場合により、任意の適切な1つ以上のアミノ酸残基においてグリコシリ化することができる。リンカーは不存在であってもよく、その場合、FGFR3ポリペプチドおよび異種ポリペプチド（例えば、Fc領域またはHSA）は介在残基を有さずに一緒に直接融合している。

#### 【0070】

##### sFGFR3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明はさらに、患者（例えば、ヒト、例えば、幼児、小児、または若年者）における骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を治療するために使用することができるsFGFR3ポリペプチド（例えば、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sFGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsFGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））をコードするポリヌクレオチド、例えば、配列番号20、21、36、または37を含む。例えば、ポリヌクレオチドは、sFGFR3\_De14-C253S（配列番号2）をコードする配列番号20もしくは36の核酸配列、または配列番号20もしくは36の核酸配列と少なくとも85%の配列同一性（例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性）を有するバリアントであり得る。さらに、ポリヌクレオチドは、配列番

10

20

30

40

50

号 21 または 37 の核酸配列と少なくとも 85 % の配列同一性（例えば、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上の配列同一性）を有する s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 (配列番号 33) をコードする配列番号 21 または 37 の核酸配列であり得る。本発明はまた、s F G F R 3 融合ポリペプチド（例えば、異種ポリペプチド、例えば、F c 領域または H S A に融合している s F G F R 3 ポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドおよびシグナルペプチドを有さない s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、配列番号 2、4、および 33 のアミノ酸配列を有するポリペプチド）またはシグナルペプチドを有する s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、配列番号 18、19、および 34 のアミノ酸配列を有するポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを含む。さらに、本発明は、本明細書に記載のグリコシル化部位のいずれかを変更するための 1 つ以上の突然変異を含むポリヌクレオチドを含む。

#### 【 0 0 7 1 】

場合により、本発明の s F G F R 3 ポリヌクレオチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S (配列番号 2)、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 (配列番号 33)、およびそれらのバリアント (配列番号 4) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド (配列番号 18 または 34) ）は、ポリヌクレオチドの核酸配列によりコードされる s F G F R 3 ポリペプチドを変更せずに核酸中のコドンを変更するように、特に、宿主生物（例えば、ヒト）の典型的なコドン使用頻度を反映するようにコドン最適化することができる。コドン最適化ポリヌクレオチド（例えば、配列番号 20、21、36、または 37 の核酸配列を有するポリヌクレオチド）は、例えば、G C 含量を減少させることにより、および / または宿主細胞（例えば、H E K 2 9 3 細胞または C H O 細胞）中での発現のために遺伝子操作を容易にし得る。コドン最適化は、当業者により、例えば、オンラインツール、例えば、J A V A C o d o n A d a p t i o n T o o l (w w w . j c a t . d e ) または I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s T o o l (w w w . e u . i d t d n a . c o m / C o d o n O p t ) を使用することにより、ポリヌクレオチドの核酸配列およびコドンを最適化すべき宿主生物を簡易に入力することにより実施することができる。様々な生物のコドン使用頻度が、オンラインデータベース、例えば、w w w . k a z u s a . o r . j p / c o d o n において利用可能である。

#### 【 0 0 7 2 】

s F G F R 3 ポリペプチドの発現のための宿主細胞

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S (配列番号 2)、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 (配列番号 33)、およびそれらのバリアント (配列番号 4) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド (配列番号 18 または 34) ）の発現のための宿主細胞として哺乳動物細胞を使用することができる。本方法において有用な例示的な哺乳動物細胞タイプとしては、限定されるものではないが、ヒト胚性腎 (H E K ; 例えば、H E K 2 9 3 ) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O ) 細胞、L 細胞、C 1 2 7 細胞、3 T 3 細胞、B H K 細胞、C O S - 7 細胞、H e L a 細胞、P C 3 細胞、ベロ細胞、M C 3 T 3 細胞、N S 0 細胞、S p 2 / 0 細胞、V E R Y 細胞、B H K 、M D C K 細胞、W 1 3 8 細胞、B T 4 8 3 細胞、H s 5 7 8 T 細胞、H T B 2 細胞、B T 2 0 細胞、T 4 7 D 細胞、N S 0 細胞、C R L 7 O 3 O 細胞、および H s S 7 8 B s t 細胞、または当分野における公知の任意の他の好適な哺乳動物宿主細胞が挙げられる。あるいは、s F G F R 3 ポリペプチドの発現のための宿主細胞として大腸菌 (E . c o l i ) 細胞を使用することができる。大腸菌 (E . c o l i ) 株の例としては、限定されるものではないが、大腸菌 (E . c o l i ) 2 9 4 (A T C C (登録商標) 3 1 , 4 4 6 )、大腸菌 (E . c o l i ) 1 7 7 6 (A T C C (登録商標) 3 1 , 5 3 7 )、大腸菌 (E . c o l i ) B L 2 1 (D E 3 ) (A T C C (登録商標) B A A - 1 0 2 5 )、大腸菌 (E . c o l i ) R V 3 0 8 (A T C C (登録商標) 3 1 , 6 0 8 )、または当分野における公知の任意の他の好適な大腸菌 (E . c o l i ) 株が挙げられる。

#### 【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクター

本発明はまた、上記ポリヌクレオチドのいずれか1つ以上を含む組換えベクターを特徴とする。本発明のベクターを使用して本発明のs F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリエント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））をコードするポリヌクレオチドを送達することができ、それとしては、哺乳動物、ウイルス、および細菌発現ベクターを挙げることができる。例えば、ベクターは、プラスミド、人工染色体（例えば、B A G、P A C、およびY A C）、およびウイルスまたはファージベクターであり得、場合により、プロモーター、エンハンサー、またはポリヌクレオチドの発現のための調節因子を含み得る。ベクターは、1つ以上の選択マーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合のアンピシリン、ネオマイシン、および／もしくはカナマイシン耐性遺伝子、または真菌ベクターについての耐性遺伝子も含有し得る。ベクターは、D N A もしくはR N A の產生のためにインビトロで使用することができ、またはそれを使用してベクターによりコードされるs F G F R 3 ポリペプチドの產生のための宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞を形質移入もしくは形質転換することができる。ベクターは、遺伝子療法の方法においてインビオで使用するために適合させることもできる。

#### 【0074】

本発明のs F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリエント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））をコードするポリヌクレオチドを送達するために使用することができる例示的なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス（例えば、A d 2、A d 5、A d 1 1、A d 1 2、A d 2 4、A d 2 6、A d 3 4、A d 3 5、A d 4 0、A d 4 8、A d 4 9、A d 5 0、およびP a n 9（A d C 6 8 としても公知））、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、コロナウイルス、マイナス鎖R N A ウイルス、例えば、オルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病および水疱性口炎ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、麻疹およびセンダイ）、プラス鎖R N A ウイルス、例えば、ピコルナウイルスおよびアルファウイルス、および二本鎖D N A ウイルス、例として、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス1および2型、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス）、およびポックスウイルス（例えば、ワクシニア、変形ワクシニアアンカラ（M V A）、鶏痘およびカナリア痘）が挙げられる。s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを送達するために有用な他のウイルスとしては、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが挙げられる。レトロウイルスの例としては、トリ白血病肉腫、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、H T L V - B L V グループ、レンチウイルス、およびスプマウイルスが挙げられる（C o f f i n , J . M . , R e t r o v i r i d a e : T h e v i r u s e s a n d t h e i r r e p l i c a t i o n , I n F u n d a m e n t a l V i r o l o g y , T h i r d E d i t i o n , B . N . F i e l d s , e t a l . , E d s . , L i p p i n c o t t - R a v e n P u b l i s h e r s , P h i l a d e l p h i a , 1 9 9 6 ）。

#### 【0075】

##### 産生方法

本発明のs F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリエント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））をコードするポリヌクレオチドは、当分野における公知の任意の方法により産生することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、分子クローニング法を使用して生成され、ベクター、例えば、プラスミド、人工染色体、ウイルスベクター、またはフ

アージベクター内に配置される。ベクターは、s F G F R 3 ポリペプチドの発現に適切な宿主細胞中にポリヌクレオチドを形質転換するために使用される。

【 0 0 7 6 】

核酸ベクター構築および宿主細胞

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）、およびそれらのバリエント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号 18 または 34））は、宿主細胞から產生することができる。s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号 20、21、36、または 37 の核酸配列を有するポリヌクレオチドまたはそれらのバリエント）は、当分野における公知の慣用の技術（例えば、形質転換、形質移入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション、または感染）により宿主細胞中に導入することができるベクター中に含めることができる。ベクターの選択は、部分的には、使用すべき宿主細胞に依存する。一般に、宿主細胞は、原核生物（例えば、細菌）または真核生物（例えば、哺乳動物）のいずれかの起源のものであり得る。

10

【 0 0 7 7 】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）、およびそれらのバリエント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号 18 または 34））をコードするポリヌクレオチドは、当分野における公知の種々の方法により調製することができる。これらの方法としては、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介（または部位特異的）突然変異誘発および P C R 突然変異誘発が挙げられる。s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、標準的な技術、例えば、遺伝子合成を使用して得ることができる。あるいは、野生型 s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、配列番号 5 または 32 のアミノ酸配列を有するポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドは、当分野における標準的な技術、例えば、Q u i k C h a n g e（商標）突然変異誘発を使用して規定のアミノ酸置換（例えば、配列番号 33 の 253 位および / または配列番号 4 の 316 位におけるセリン残基または保存的アミノ酸置換、例えば、アラニン、グリシン、プロリン、もしくはトレオニンによるシステイン残基のアミノ酸置換）を含有するように突然変異させることができる。s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、ヌクレオチド合成装置または P C R 技術を使用して合成することができる。

20

【 0 0 7 8 】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）、およびそれらのバリエント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号 18 または 34））をコードするポリヌクレオチドは、原核または真核宿主細胞中で複製し、ポリヌクレオチドを発現し得るベクター中に挿入することができる。本方法において有用な例示的なベクターとしては、限定されるものではないが、プラスミド、人工染色体、ウイルスベクター、およびファージベクターを挙げることができる。例えば、ウイルスベクターとしては、s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの核酸配列を含有する上記ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはポックスウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスベクター、例えば、改変ワクシニアアンカラ（M V A））、アデノ随伴ウイルスベクター、およびアルファウイルスベクター））を挙げることができる。それぞれのベクターは、特定の宿主細胞との適合性のために調整し、最適化することができる種々の構成成分を含有し得る。例えば、ベクター構成成分としては、限定されるものではないが、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位、シグナル配列、s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの核酸配列、および / または転写終結配列を挙げることができる。

30

40

50

## 【0079】

上記ベクターは、当分野における慣用の技術、例えば、形質転換、形質移入、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、および直接マイクロインジェクションを使用して適切な宿主細胞（例えば、HEK293細胞またはCHO細胞）中に導入することができる。本発明のsGFR3ポリペプチド（例えば、sGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））の產生のための宿主細胞中にベクターが導入されたら、宿主細胞は、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、またはsGFR3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号20および21ならびにそれらのバリアント）の増幅のために適宜改変された慣用の栄養培地中で培養される。治療タンパク質、例えば、sGFR3ポリペプチドの発現方法は、当分野において公知であり、例えば、Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2nd ed. 2004 (July 20, 2004) およびVladimir Vynov and Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2nd ed. 2012 (June 28, 2012)（それらのそれぞれは参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。10 20

## 【0080】

## sGFR3ポリペプチド產生、回収、および精製

本発明のsGFR3ポリペプチド（例えば、sGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））を產生するために使用される宿主細胞（例えば、HEK293細胞またはCHO細胞）は、当分野において公知であり、選択宿主細胞の培養に好適な培地中で成長させることができる。哺乳動物宿主細胞に好適な培地の例としては、最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（D MEM）、Expi 293（商標）発現培地、ウシ胎仔血清（FBS）が補給されたD MEM、およびRPMI-1640が挙げられる。細菌宿主細胞に好適な培地の例としては、ルリアプロス（LB）と必須サブリメント、例えば、選択薬剤、例えば、アンピシリンが挙げられる。宿主細胞は、好適な温度、例えば、約20～約39、例えば、約25～約37、好ましくは、37、およびCO<sub>2</sub>レベル、例えば、5～10%（好ましくは、8%）において培養される。培地のpHは、一般に、主に宿主生物に応じて約6.8～7.4、例えば、7.0である。誘導性プロモーターが発現ベクター中に使用される場合、sGFR3ポリペプチド発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。30

## 【0081】

本発明のsGFR3ポリペプチド（例えば、sGFR3\_De14-C253S（配列番号2）、sGFR3\_De14-D3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むsGFR3ポリペプチド（配列番号18または34））は、宿主細胞の上清から回収することができる。あるいは、sGFR3ポリペプチドは、宿主細胞を破壊し（例えば、浸透圧ショック、超音波処理、または溶解を使用）、次いで遠心分離し、または濾過してsGFR3ポリペプチドを取り出すことにより回収することができる。sGFR3ポリペプチドの回収時、sGFR3ポリペプチドをさらに精製することができる。sGFR3ポリペプチドは、タンパク質精製分野における公知の任意の方法、例えば、プロテインA親和性、他のクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の差異により、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的技術（Pr40 50

o c e s s S c a l e P u r i f i c a t i o n o f A n t i b o d i e s , U w e G o t t s c h a l k ( e d . ) J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , 2 0 0 9 ( 参照により全体として本明細書に組み込まれる ) を参照されたい ) により精製することができる。

#### 【 0 0 8 2 】

場合により、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えは、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 3 3 ) 、およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 1 8 または 3 4 ) ) は、精製のための検出可能標識にコンジュゲートすることができる。 s F G F R 3 ポリペプチドの精製において使用される好適な標識の例としては、限定されるものではないが、タンパク質タグ、フルオロフォア、発色団、放射標識、金属コロイド、酵素、または化学発光、もしくは生物発光分子が挙げられる。特に、 s F G F R 3 ポリペプチドの精製に有用なタンパク質タグとしては、限定されるものではないが、クロマトグラフィータグ ( 例えは、ポリアニオン性アミノ酸からなるペプチドタグ、例えは、 F L A G - タグ、またはヘマグルチニン「 H A 」タグ ) 、親和性タグ ( 例えは、ポリ ( H i s ) タグ、キチン結合タンパク質 ( C B P ) 、マルトース結合タンパク質 ( M B P ) 、またはグルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T ) ) 、可溶化タグ ( 例えは、チオレドキシン ( T R X ) およびポリ ( N A N P ) ) 、エピトープタグ ( 例えは、 V 5 - タグ、 M y c - タグ、および H A - タグ ) 、または蛍光タグ ( 例えは、 G F P 、 G F P バリアント、 R F P 、および R F P バリアント ) を挙げることができる。

10

#### 【 0 0 8 3 】

##### 治療方法

本明細書において、患者、例えは、軟骨無形成症を有する患者 ( 例えは、軟骨無形成症を有するヒト ) における骨格成長遅滞障害を治療する方法が提供される。特に、患者は、骨格成長遅滞障害 ( 例えは、軟骨無形成症 ) の 1 つ以上の症状を呈し、または発症する可能性が高い者である。本方法は、骨格成長遅滞障害を有する患者、例えは、軟骨無形成症を有する患者 ( 例えは、軟骨無形成症を有するヒト ) に本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えは、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 3 3 ) 、およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 1 8 または 3 4 ) ) を投与することを含む。特に、本方法は、骨格成長遅滞障害を有する患者、例えは、軟骨無形成症を有する患者 ( 例えは、軟骨無形成症を有するヒト ) に s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) または s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 3 3 ) を投与することを含む。例えは、患者は、骨格成長遅滞障害を有する幼児または小児、例えは、軟骨無形成症を有する幼児、小児、または若年者 ( 例えは、軟骨無形成症を有するヒト ) である。

20

#### 【 0 0 8 4 】

患者 ( 例えは、ヒト ) は、骨格成長遅滞障害 ( 例えは、軟骨無形成症 ) の症状が出現する前または骨格成長遅滞障害 ( 例えは、軟骨無形成症 ) の症状が発症した後に治療することができる。特に、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えは、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 3 3 ) 、およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 1 8 または 3 4 ) ) により治療することができる患者は、症状、例として、限定されるものではないが、四肢短縮、短い胴体、 O 脚、動搖性歩行、頭蓋異形、クローバー葉頭蓋、頭蓋骨縫合早期癒合症、ウォルム骨、手の奇形、足の奇形、ヒッチハイカーの親指、および / または胸部奇形を呈する者である。さらに、 s F G F R 3 ポリペプチドによる治療は、骨格成長遅滞障害、例えは、軟骨無形成症の上記症状の 1 つ以上の改善を ( 例えは、非治療患者に対して ) もたらし得る。

30

#### 【 0 0 8 5 】

患者 ( 例えは、ヒト ) は、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えは、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 3 3 ) )

40

50

、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド（配列番号18または34）の投与前に骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症と診断されていてよい。さらに、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有する患者は、s F G F R 3ポリペプチドにより予め治療されなかつた者であり得る。

【0086】

骨格成長遅滞障害

骨格成長遅滞障害は、骨格成長遅滞障害の治療が必要とされる患者（例えば、ヒト）に本明細書に記載のs F G F R 3ポリペプチドを投与することにより治療することができる。本方法は、骨格成長遅滞障害を有する患者（例えば、ヒト）に本発明のs F G F R 3ポリペプチド（例えば、s F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド（配列番号18または34））を投与することを含む。s F G F R 3ポリペプチドにより治療することができる骨格成長遅滞障害は、骨の変形および/または奇形により特徴付けられ、それとしては、限定されるものではないが、F G F R 3関連骨格疾患を挙げることができる。特に、患者は、s F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）またはs F G F R 3\_D e 1 4 - D 3（配列番号33）により治療される。

【0087】

本発明のs F G F R 3ポリペプチド（例えば、s F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド（配列番号18または34））の投与は、骨格成長遅滞障害、例として、限定されるものではないが、軟骨無形成症、軟骨無発生症、先端骨形成不全症、遠位中間肢異形成症、骨発生不全症、屈曲肢異形成症、点状軟骨異形成症、肢根型点状軟骨異形成症、鎖骨頭蓋骨異形成症、先天性大腿骨短縮症、クルーゾン症候群、アペール症候群、J a c k s o n - W e i s s 症候群、ファイファー症候群、クルーゾン皮膚骨格症候群、指奇形、短指症、屈指症、多指症、合指症、捻曲性骨異形成症、小人症、分節異常骨異形成症、内軟骨腫症、線維性軟骨発生症、線維性骨異形成症、遺伝性多発性外骨腫症、低ホスファターゼ症、低リン血症性くる病、J a f f e - L i c h t e n s t e i n 症候群、クニースト骨異形成症、クニースト症候群、ランガー型中間肢異形成症、マルファン症候群、マッキューン・オルブライト症候群、小肢症、骨幹端異形成症、J a n s e n 型骨幹端異形成症、変容性異形成症、モルキオ症候群、ニーベルゲルト型中間肢異形成症、神経線維腫症（例えば、1型（例えば、骨所見を伴うもの、または骨所見を伴わないもの）、2型、またはシュワノマトーシス）、変形性関節症、骨軟骨異形成症、骨形成不全症、骨形成不全症周産期致死型、大理石骨病、骨斑紋症、末梢骨形成不全症、R e i n h a r d t 症候群、R o b e r t s 症候群、ロビノウ症候群、短肋骨多指症候群、低身長、先天性脊椎・骨端骨異形成症、および脊椎・骨端・骨幹端異形成症を治療し得る。

【0088】

例えば、本発明のs F G F R 3ポリペプチド（例えば、s F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3ポリペプチド（配列番号18または34））を使用して骨格成長遅滞障害、例として、上記障害、例えば、軟骨無形成症に伴う症状を治療することができる。s F G F R 3ポリペプチドにより治療することができる骨格成長遅滞障害の症状の非限定的な例としては、四肢短縮および短い胴体、O脚、動搖性歩行、頭蓋異形（例えば、大きな頭部）、クローバー葉頭蓋、頭蓋骨縫合早期癒合症（例えば、頭蓋内の骨の早期癒合）、ウォルム骨（例えば、頭蓋内の骨間の異常な糸状連結）、手足の奇形（例えば、多指症または余剰の指）、「ヒッチハイカー」の親指および異常な指の爪および足指の爪、ならびに胸部奇形（例えば、ナシ形状胸部または狭い胸郭）が挙げられる。s F G F R 3ポリペプチドを投与することにより治療することができる追加の症状としては、骨格成長遅滞障害を有する患者における非骨格異常

10

20

30

40

50

、例えば、眼、口、および耳の奇形、例えば、先天性白内障、近視、口蓋裂、または難聴；脳異形、例えば、水頭症、孔脳症、水無脳症、または脳梁欠損症；心臓欠陥、例えば、心房中隔欠損症、動脈管開存症、または大血管の転位；発育遅延；または精神障害を挙げることもできる。

【0089】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））による治療は、骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を有する患者（例えば、ヒト）の生存率も増加させ得る。例えば、s F G F R 3 ポリペプチドによる治療される患者の生存率は、例えば、数日間、数カ月間、数年間以上の治療期間にわたり、骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を有する非治療患者に対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上だけ増加し得る。特に、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3の投与は、骨格成長遅滞障害、例えば、軟骨無形成症を有する患者（例えば、ヒト）の生存率を（例えば、非治療患者に対して）増加させ得る。

10

【0090】

患者（例えば、ヒト）に本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））を投与することにより、F G F R 3 関連骨格疾患（例えば、機能獲得F G F R 3 突然変異の結果としてのF G F R 3 の過剰活性化により引き起こされ、またはそれに伴う）である任意の骨格成長遅滞障害を治療することができる。例えば、F G F R 3 関連骨格疾患としては、限定されるものではないが、軟骨無形成症、タナトフォリック骨異形成症I型（T D I）、タナトフォリック骨異形成症II型（T D I I）、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症（S A D D A N）、軟骨低形成症、および頭蓋骨縫合早期癒合症（例えば、M u e n k e 症候群、クルーゾン症候群、およびクルーゾン皮膚骨格症候群）を挙げることができる。

20

【0091】

様々なF G F R 3 関連骨格障害、例えば、軟骨無形成症、軟骨低形成症、S A D D A N、T D I、およびT D I Iに関連するF G F R 3 遺伝子中の突然変異を有する患者（例えば、ヒト）は、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））により治療することができる。例えば、s F G F R 3 ポリペプチドを投与してF G F R 3 遺伝子のG 3 8 0 R、G 3 7 5 C、G 3 4 6 EまたはS 2 7 9 C突然変異から生じる軟骨無形成症を治療することができる。s F G F R 3 ポリペプチドの投与を使用して以下の例示的なF G F R 3 関連骨格障害：F G F R 3 遺伝子のG 3 7 5 C、G 3 4 6 EまたはS 2 7 9 C突然変異から生じる軟骨低形成症；F G F R 3 遺伝子のR 2 4 8 C、S 2 4 8 C、G 3 7 0 C、S 3 7 1 C、Y 3 7 3 C、X 8 0 7 R、X 8 0 7 C、X 8 0 7 G、X 8 0 7 S、X 8 0 7 WおよびK 6 5 0 M突然変異から生じるT D I；F G F R 3 遺伝子のK 6 5 0 E突然変異から生じるT D I I；ならびにF G F R 3 遺伝子のK 6 5 0 M突然変異から生じるS A D D A Nを治療することができる。

30

【0092】

F G F R 3 遺伝子中の上記突然変異（例えば、F G F R 3 遺伝子のG 3 8 0 R突然変異）のいずれも、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、またはそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含むs F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））による治療前または後に患者（例えば、軟骨無形成症、軟骨低形成症、S A D D A N、T D I、およびT D I Iを有するヒト）からの試料中で検出

40

50

することができる。さらに、患者の親および／または胎児試料（例えば、母体血液、胎盤、または胎児試料から得られる胎児核酸）を、*S F G F R 3* 遺伝子中の突然変異についての当分野における公知の方法により試験してそれらの治療必要性を決定することができる。

#### 【 0 0 9 3 】

##### 軟骨無形成症

軟骨無形成症は、ヒトにおける小人症の最も一般的な原因であり、本明細書に記載の *S F G F R 3* ポリペプチドを投与することにより治療することができる。特に、軟骨無形成症は、本発明の *S F G F R 3* ポリペプチド（例えば、*S F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S*（配列番号 2）、*S F G F R 3\_D e 1 4 - D 3*（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む *S F G F R 3* ポリペプチド（配列番号 18 または 34））を投与することにより治療することができる。したがって、*S F G F R 3* ポリペプチドの投与は、症状、例として、限定されるものではないが、成長遅滞、頭蓋変形、歯列矯正欠陥、頸髄圧迫（例えば、中枢性無呼吸または発作からの死亡リスクを伴うもの）、脊髄の狭窄（例えば、脚部および腰部の疼痛）、水頭症（例えば、脳シャント手術を要求するもの）、慢性耳炎に起因する難聴、心血管疾患、神経疾患、呼吸疾病、疲労、疼痛、腰部および／もしくは脊柱における無感覚、ならびに／または肥満症の改善をもたらし得る。

#### 【 0 0 9 4 】

本発明の *S F G F R 3* ポリペプチド（例えば、*S F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S*（配列番号 2）、*S F G F R 3\_D e 1 4 - D 3*（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む *S F G F R 3* ポリペプチド（配列番号 18 または 34））を使用して治療される患者としては、軟骨無形成症を有する幼児、小児、および成人を挙げることができる。特に、幼児は、出生時に軟骨無形成症と診断されることが多く、したがって、*S F G F R 3* ポリペプチドによる治療は、患者の生涯において可能な限り早期に、例えば、出生直後、または出生前（子宮内）に開始することができる。

#### 【 0 0 9 5 】

患者（例えば、ヒト）における軟骨無形成症の症状は、患者を本発明の *S F G F R 3* ポリペプチド（例えば、*S F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S*（配列番号 2）、*S F G F R 3\_D e 1 4 - D 3*（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む *S F G F R 3* ポリペプチド（配列番号 18 または 34））により治療する前または後にモニタリングすることもできる。例えば、軟骨無形成症の症状は、治療前にモニタリングして本方法の実施前に患者の軟骨無形成症の重症度および状態を評価することができる。

#### 【 0 0 9 6 】

本方法は、患者における軟骨無形成症の診断ならびに軟骨無形成症の症状の変化、例えば、患者の体重および頭蓋サイズ（例えば、頭蓋長および／または頭蓋幅）の変化についての患者のモニタリングを含み得る。体重および頭蓋サイズの変化は、一定期間にわたり、例えば、1カ月もしくは1年当たり1、2、3、4回以上、または本発明の *S F G F R 3* ポリペプチド（例えば、*S F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S*（配列番号 2）、*S F G F R 3\_D e 1 4 - D 3*（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む *S F G F R 3* ポリペプチド（配列番号 18 または 34））による治療過程にわたり約1、2、3、4、5、6、7、8、12または16週間ごとにモニタリングすることができる。軟骨無形成症を有する患者の体重および／または頭蓋サイズは、治療の規定イベントにおいて、例えば、*S F G F R 3* ポリペプチドの投与前および／または後に測定することもできる。

#### 【 0 0 9 7 】

例えば、体重および／または頭蓋サイズは、本発明の *S F G F R 3* ポリペプチド（例えば、*S F G F R 3\_D e 1 4 - C 2 5 3 S*（配列番号 2）、*S F G F R 3\_D e 1 4 - D 3*（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む *S F G F R 3* ポリペプチド（配列番号 18 または 34））の投与に応答して計測する

10

20

30

40

50

ことができる。体重は、軟骨無形成症を有する患者をスケール上で、好ましくは、標準化様式で、例えば、同一の衣類でもしくは衣類なしで、または1日のある時間において、好ましくは、絶食状態（例えば、朝食前の朝または絶食の少なくとも1、2、3、4、5時間以上後で）で秤量することにより計測することができる。頭蓋サイズは、頭蓋の長さ、高さ、幅、および／また外周により表すことができる。計測は、任意の公知のまたは自己考案標準化方法を使用して実施することができる。ヒト対象について、頭蓋外周の計測が好ましく、それは、フレキシブルな非伸縮性材料、例えば、巻き尺を使用して、頭部の考えられる最大外周（例えば、額の最も突出した部分から、後頭部の最大幅の部分まで）を巻き付けて計測することができる。対象（例えば、ヒト）の頭蓋の高さは、頸の底部から頭部の最上部まで測定することもできる。好ましくは、任意の計測は、2回以上、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10回以上実施される。

10

#### 【0098】

##### s F G F R 3 ポリペプチドの投与

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））は、当分野における公知の任意の経路により、例えば、非経口投与、腸内投与、または局所投与により投与することができる。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を有する患者に皮下（例えば、皮下注射による）、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内または腹腔内投与することができる。

20

#### 【0099】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））は、患者（例えば、ヒト）に所定投与量において、例えば、重大な毒性を誘導せずに骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を治療するための有効量で投与することができる。例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を有する患者に、約0.002mg/kg～約50mg/kg（例えば、2.5mg/kg～30mg/kg、0.002mg/kg～20mg/kg、0.01mg/kg～2mg/kg、0.2mg/kg～20mg/kg、0.01mg/kg～10mg/kg、10mg/kg～100mg/kg、0.1mg/kg～50mg/kg、0.5mg/kg～20mg/kg、1.0mg/kg～10mg/kg、1.5mg/kg～5mg/kg、または0.2mg/kg～3mg/kg）の範囲の個々の用量で投与することができる。特に、s F G F R 3 ポリペプチドは、例えば、0.001mg/kg～50mg/kg、例えば、2.5mg/kg～約10mg/kgの個々の用量で投与することができる。

30

#### 【0100】

骨格成長遅滞障害（例えば、軟骨無形成症）を有する患者（例えば、ヒト）への投与のための本発明の s F G F R 3 ポリペプチドの例示的な用量（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号33）、およびそれらのバリアント（配列番号4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号18または34））としては、例えば、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、または50mg/kgが挙げられる。これらの用量は、1日、1週間、1カ月、または1年当たり1回以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12回以上）投与することができる。例えば、s F G F R 3 ポリペプチドは、患者に例えば、約0.0014mg/kg/週～約140mg/kg/週、例えば、約0.14mg/kg/週～約105mg/kg/週、または例えば、約1.4mg/kg

40

50

g / 週 ~ 約 70 mg / kg / 週 ( 例えば、 2.5 mg / kg / 週、 5 mg / kg / 週、 10 mg / kg / 週、 20 mg / kg / 週、 30 mg / kg / 週、 40 mg / kg / 週、 または 50 mg / kg / 週 ) の範囲の 1 週間の投与量で投与することができる。

#### 【 0101 】

##### 遺伝子療法

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えば、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 33 ) 、 およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 18 または 34 ) ) は、 s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを目的の組織に送達し、インビボで発現させる遺伝子療法を介して送達することもできる。遺伝子療法の方法は、 例えば、 Verme et al. ( Nature 389 : 239 - 242 , 1997 ) 、 Yamamoto et al. ( Molecular Therapy 17 : S67 - S68 , 2009 ) 、 および Yamamoto et al. , ( J. Bone Miner. Res. 26 : 135 - 142 , 2011 ) ( それらのそれぞれは、 参照により本明細書に組み込まれる ) に考察されている。

10

#### 【 0102 】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えば、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 33 ) 、 およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 18 または 34 ) ) は、 骨格成長遅滞障害 ( 例えば、 軟骨無形成症 ) を有する患者 ( 例えば、 ヒト ) の細胞により、 s F G F R 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの核酸配列を含有するベクター ( 例えば、 プラスミド、 人工染色体 ( 例えば、 B A G 、 P A C 、 および Y A C ) 、 またはウイルスベクター ) を投与することにより产生することができる。 例えば、 ウイルスベクターは、 レトロウイルスベクター、 アデノウイルスベクター、 またはポックスウイルスベクター ( 例えば、 ワクシニアウイルスベクター、 例えば、 改変ワクシニアアンカラ ( M V A ) ) 、 アデノ随伴ウイルスベクター、 またはアルファウイルスベクターであり得る。 ベクターは、 例えば、 形質転換、 形質移入、 エレクトロポレーション、 リン酸カルシウム沈殿、 または直接マイクロインジェクションにより、 骨格成長遅滞障害 ( 例えば、 軟骨無形成症 ) を有する患者 ( 例えば、 ヒト ) の細胞内側に存在させたら、 s F G F R 3 ポリペプチドの発現を促進し、 次いでそれが細胞から分泌される。 本発明はさらに、 患者 ( 例えば、 ヒト ) に s F G F R 3 ポリペプチドを発現する細胞を投与する細胞ベース療法を含む。

20

#### 【 0103 】

##### 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、 本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えば、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 33 ) 、 およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 18 または 34 ) ) 、 ポリヌクレオチド、 ベクター、 および / または宿主細胞を含み得る。 s F G F R 3 ポリペプチド、 ポリヌクレオチド、 ベクター、 および / または宿主細胞を含む組成物は、 投与量の範囲において、 種々の配合物中で、 および薬学的に許容可能な賦形剤、 担体、 または希釈剤との組合せで配合することができる。

30

#### 【 0104 】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えば、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ( 配列番号 2 ) 、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ( 配列番号 33 ) 、 およびそれらのバリアント ( 配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド ( 配列番号 18 または 34 ) ) 、 ポリヌクレオチド、 ベクター、 および / または宿主細胞を含む医薬組成物は、 規定の投与量、 例えば、 重大な毒性を誘導せずに患者 ( 例えば、 ヒト ) の骨格成長遅滞障害 ( 例えば、 軟骨無形成症 ) を治療するために有効な投与量において配合することができる。 例えば、 組成物は、 約 1 mg / mL ~ 約 500 mg / mL の s F G F R 3 ポリペプチド ( 例えば、 10 mg / mL ~ 300 mg / mL 、 20 mg / mL ~ 120 mg

40

50

/ mL、40 mg / mL ~ 200 mg / mL、30 mg / mL ~ 150 mg / mL、40 mg / mL ~ 100 mg / mL、50 mg / mL ~ 80 mg / mL、または60 mg / mL ~ 70 mg / mL の s F G F R 3 ポリペプチド) を含むように配合することができる。

#### 【0105】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド (例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S (配列番号 2 )、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 (配列番号 3 3 )、およびそれらのバリアント (配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド (配列番号 1 8 または 3 4 )) 、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または宿主細胞を含む医薬組成物は、種々の形態で、例えば、液体液剤、分散剤もしくは懸濁液剤、散剤、または安定的な貯蔵に好適な他の秩序構造で調製することができる。例えば、全身または局所送達が意図される s F G F R 3 ポリペプチドを含む組成物は、例えば、非経口投与 (例えば、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、または腹腔内投与) のための注射または注入液剤の形態であり得る。注射 (例えば、皮下または静脈内注射) 用 s F G F R 3 組成物は、ビヒクルとしての無菌溶液または任意の薬学的に許容可能な液体を使用して配合することができる。薬学的に許容可能なビヒクルとしては、限定されるものではないが、滅菌水、生理食塩水、および細胞培養培地 (例えば、ダルベッコ改变イーグル培地 (D M E M ) 、 - 改变イーグル培地 ( - M E M ) 、 F - 1 2 培地) が挙げられる。配合方法は当分野において公知であり、例えば、B a n g a (ed .) T h e r a p e u t i c P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : F o r m u l a t i o n , P r o c e s s i n g a n d D e l i v e r y S y s t e m s (2 n d e d .) T a y l o r & F r a n c i s G r o u p , C R C P r e s s (2 0 0 6 ) (参照により全体として本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

10

20

30

#### 【0106】

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド (例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S (配列番号 2 )、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 (配列番号 3 3 )、およびそれらのバリアント (配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド (配列番号 1 8 または 3 4 )) 、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または宿主細胞を含む組成物は、骨格成長遅滞障害 (例えば、軟骨無形成症) を有する患者 (例えば、ヒト) に薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤との組合せで提供することができる。許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤としては、緩衝剤、酸化防止剤、保存剤、ポリマー、アミノ酸、および炭水化物を挙げることができる。水性賦形剤、担体、または希釈剤としては、水、水 - アルコール溶液、生理食塩水を含むエマルションまたは懸濁液、緩衝医薬非経口ビヒクル、例として、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース溶液、デキストロースと塩化ナトリウムの溶液、ラクトースを含有するリンガー溶液、および固定油を挙げることができる。非水性賦形剤、担体、または希釈剤の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、魚油、および注射用有機エステルである。

#### 【0107】

薬学的に許容可能な塩も、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド (例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S (配列番号 2 )、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 (配列番号 3 3 )、およびそれらのバリアント (配列番号 4 ) またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド (配列番号 1 8 または 3 4 )) 、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または宿主細胞を含む組成物中に含めることができる。例示的な薬学的に許容可能な塩としては、鉛酸塩 (例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、および硫酸塩) および有機酸の塩 (例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、および安息香酸塩) を挙げることができる。さらに、補助物質、例えば、湿潤または乳化剤および pH 緩衝物質が存在し得る。薬学的に許容可能な賦形剤、担体、および希釈剤の詳細な考察は、R e m i n g t o n : T h e S c i e n c e a n d P r a c t i c e o f P h a r m a c y , 2 2 n d E d . , A l l e n (2 0 1 2 ) (参照により全体として本明細書に組み込まれる) において利用可能である。

#### 【0108】

40

50

本発明の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号 18 または 34））、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または宿主細胞を含む医薬組成物は、急速放出から s F G F R 3 ポリペプチドを保護する担体と配合することもでき、例えば、制御放出配合物、例として、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系である。例えば、s F G F R 3 組成物は、コアセルベーション技術により、または界面重合により調製されるマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、またはポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセル；コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子、またはナノカプセル）；またはマクロエマルション中で捕捉することができる。さらに、s F G F R 3 組成物は、徐放組成物として配合することができる。例えば、徐放組成物は、本発明の s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを含み得、マトリックスは、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。

#### 【 0 1 0 9 】

##### キット

本発明のキットは、本明細書に記載の本発明の 1 つ以上の s F G F R 3 ポリペプチド（例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）、およびそれらのバリアント（配列番号 4）またはシグナルペプチドを含む s F G F R 3 ポリペプチド（配列番号 18 または 34））、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または細胞を含み得る。例えば、s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または細胞は、容器（例えば、ガラスバイアル）中で液体形態（例えば、水または緩衝塩溶液、例えば、2 mM ~ 20 mM のリン酸ナトリウム、pH 6.5 または 7.0、および 25 mM ~ 250 mM の塩化ナトリウム中）で存在し得る。あるいは、s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および / またはベクターは、容器（例えば、ガラスバイアル）中で、場合により、投与前の液体形態への凍結乾燥 s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または細胞の再構成のための希釈剤（例えば、水または緩衝塩溶液）を含み得る凍結乾燥形態で存在する。s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または細胞は、キット中で本明細書に記載の別の配合物中でも存在し得る。キット構成成分は、投与を容易にするための剤形で提供することができ、場合により、投与に要求される材料および / または本方法に従う患者治療についての説明書を含み得る。例えば、キットは、s F G F R 3 ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、および / または細胞の投与に関して使用者（例えば、医師）にガイドする使用説明書を含み得る。

#### 【 実施例 】

##### 【 0 1 1 0 】

以下の実施例は本開示を説明するためのものであり、限定するものではない。これらの試験は、軟骨無形成症およびそれに伴う症状を治療するための軟骨無形成症を有する患者（例えば、ヒト）への s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）の s F G F R 3 ポリペプチドの投与を特徴とする。

##### 【 0 1 1 1 】

##### 実施例 1 : s F G F R 3 ポリペプチドの產生

3 つの異なる懸濁細胞タイプ：H E K 2 9 3 \_ f r e e s t y l e 、 C H O - S \_ f r e e s t y l e 細胞および E x p i \_ C H O - S 細胞中の一過的形質移入により、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S（配列番号 2）および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3（配列番号 33）を產生した。H E K 2 9 3 \_ f r e e s t y l e および C H O - S \_ f r e e s t y l e 細胞中での產生のため、ポリエチレンイミン（P E I p r o（登録商標）- P o l y p l u s - t r a n s f e c t i o n）を製造業者の指示書に従って使用して形質移入を実施した。3 日後にタンパク質を回収した。E x p i \_ C H O - S 細胞中での s F G F

10

20

30

40

50

R3ポリペプチド産生のため、Expifectamineを製造業者による記載のとおりに使用して、High Titer産生プロトコルを使用して形質移入を実施した。タイムコースを実施し、12日後にsFGFR3ポリペプチドを最適に回収した。次いで、50ngのsFGFR3ポリペプチドを使用してウエスタンプロットを実施した。ブロッキング緩衝液中で1:2000希釈された一次抗体としてのB9（抗FGFR3、sc-13121、Santa Cruz）およびブロッキング緩衝液中で1:5000希釈された抗マウスIgG二次抗体（抗マウスIgG、#7076、Cell signalin g）を用いて古典的ウエスタンプロットプロトコルを使用した。

#### 【0112】

実施例2：sFGFR3ポリペプチドの精製

イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを含む2ステップ精製プロセスを使用してsFGFR3\_Del4-C253SおよびsFGFR3\_Del4-D3をそれぞれ精製した。

#### 【0113】

イオン交換クロマトグラフィーのため、5μmおよび0.2μmのカプセル（それぞれKGF-A0504TTおよびKMP-HEC9204TT、GE Healthcare）を使用するクロスフロー濾過（AKTA（商標）flux、GE Healthcare）により300mLの培養上清を精製した。次いで、14mS/cmへの試料の伝導度の調整後に平衡化カラム上で20mL/分においてsFGFR3\_Del4-C253SまたはsFGFR3\_Del4-D3を含む精製試料をロードした（AKTA（商標）pure25（GE Healthcare））。使用カラムは、53mLのベッドボリュームを有するHiPrep Q FF26/10（GE Healthcare）であった。結合緩衝液は1×PBSであり、溶出緩衝液はPBS 1×+1MのNaClであった。カラムを4カラム容量の1×PBSにより洗浄した。sFGFR3\_Del4-C253SおよびsFGFR3\_Del4-D3の溶出を、それぞれの4カラム容量を使用する5%のNaClおよび10%のNaClの2ステップにより実施した。5%のNaClおよび10%のNaClの両方をプールし、クロスフロー濾過（AKTA（商標）flux、GE Healthcare）により濃縮した。次いで、残留容量を、4、3,900gにおける10分間の遠心分離（MILLIPORE（登録商標）UFC903024AMICON（登録商標）Ultra-15Centrifugal Filter Concentrator）により30kDaフィルター上で濃縮した。サイズ排除クロマトグラフィーのため、320mLのベッドボリュームを有するHiLoad 26/600 SUPERDEX（商標）200prep grade（28-9893-36、GE Healthcare）上で残留容量をロードした。負荷容量は、12.8mLを超過しなかった。溶出を1×PBS中で実施した。

#### 【0114】

実施例3：sFGFR3ポリペプチドのカイネティックアッセイおよび解離定数（Kd）計測

Sensor Chip CM5（GE Healthcare）を用いてsFGFR3\_Del4-C253SおよびsFGFR3\_Del4-D3のキャリブレーションフリー濃度分析およびカイネティックアッセイを実施した。ヒトFGF2（hFGF2）を、Sensor Chip CM5に約5000RUのレベルにおいてアミンカップリングにより共有結合により固定化した。5000RUを達成するため、hFGF2を流速10μl/分および濃度25μg/mlにおいて420秒間固定化した。ランニング緩衝液は、HBS-EP+緩衝液（GE Healthcare）であった。再生緩衝液は、2Mの塩化ナトリウムを有する100mMの酢酸ナトリウム、pH4.5であった。BIACORE（商標）T200（GE Healthcare）を使用する表面プラズモン共鳴によりFGF結合、解離定数（Kd）計測、およびカイネティックパラメータを測定した。カイネティックアッセイおよびKd測定に使用されたモデルは、1:1結合アルゴリズムであった。

10

20

30

30

40

50

## 【0115】

実施例4：s F G F R 3 ポリペプチドの増殖アッセイ

A T D C 5 および A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞系の両方を、NUNC（商標）MICROWELL（商標）96 - Well Optical - Bottom Plate with Polymer Base（ThermoFisher Scientific、カタログ番号165305）中で 25,000 個の細胞 / cm<sup>2</sup> の密度において播種した。24時間のインキュベーション期間後、細胞を 0.5% の B S A 中で 48 時間枯渇させ、次いで s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S または s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 により h F G F 2 (Peprotech) を用いてまたは用いずに 72 時間刺激した。次いで、CyQUANT (登録商標) Direct Cell Proliferation Assay (Molecular Probes、カタログ番号C35012) を使用して細胞増殖を計測した。刺激後、1 ウェル当たり 10 μL の CyQUANT (登録商標) Direct Cell Proliferation (Invitrogen; 1 mL の 1 × PBS、250 μL のバックグラウンド抑制剤、および 50 μL の核染色) を添加した。次いで、A T D C 5 および A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞を、暗所で室温において 2 時間インキュベートした。VARIOSCAN (商標) LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (ThermoFisher Scientific) を使用して蛍光を読み取った。

## 【0116】

実施例5：s F G F R 3 ポリペプチドのルシフェラーゼアッセイ

F G F R 3 G 3 8 0 R を発現する血清応答エレメント - ルシフェラーゼ (SRE - Luc) HEK 細胞を、標準培養 96 ウェルプレート中で 100,000 個の細胞 / cm<sup>2</sup> の密度において播種した。次いで、細胞を 0.5% の熱不活化ウシ胎仔血清 (hiFBS) により 24 時間枯渇させてから、0 nm、70 nm、および 280 nm の濃度における s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 により 1 ng / mL の h F G F 2 を用いてまたは用いずに 24 時間処理した。培養プレートを室温に 15 分間平衡化してから 1 ウェル当たり 100 μL の Firefly Luc One-Step Glow Assay Working Solution (ThermoFisher Scientific、カタログ番号16197) を添加し、次いで 600 rpm において 3 分間振盪させた。プレートを室温において 10 分間インキュベートし、それぞれの細胞溶解物を白色不透明 96 ウェルプレートに移して発光シグナルを増加させ、交差汚染を減少させた。VARIOSCAN (商標) LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (ThermoFisher Scientific) を使用して発光シグナルを読み取った。

## 【0117】

実施例6：s F G F R 3 ポリペプチドのインビボ効力試験

突然変異 F G F R 3 の発現が C o l 2 a 1 プロモーター / エンハンサーによりドライブされるトランスジェニック F g f r 3 a c h / + 動物に対して実験を実施した。マウスを 12 時間の明 / 暗サイクルに曝露し、標準的な実験室飼料および水に自由にアクセスさせた。F G F R 3 導入遺伝子の 3 6 0 b p を增幅させるプライマー 5' - A G G T G G C C T T T G A C A C C T A C C A G G - 3' (配列番号 30) および 5' - T C T G T T G T G T T T C C T C C C T G T T G G - 3' (配列番号 31) を使用するゲノム DNA の PCR によりゲノタイプを確認した。

## 【0118】

C H O 細胞を使用して産生された s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 を、0.25 mg / kg の週 2 回の皮下用量において評価した。3 日目、單一リッターからの全ての新生マウスは同一用量を受容した。対照リッターは、10 μL の PBS (ビヒクル) を受容した。その後、s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 (0.25 mg / kg) の皮下注射を、背中の左側および右側上に交互に 3 週間にわたり週 2 回投与した。マウスをロコモーションおよび排尿の変更に特に留意して毎日観察した。繁殖を実施して半数の野生型および半数のヘテロ接合性 F g f r 3 a c h / + マウスを有するリッターを生成した。表現型浸透度変動に起因

10

20

30

40

50

するバイアスを回避するため、同一のブリーダーからの少なくとも 2 匹のリッター（処理 1 匹、対照 1 匹）に対して実験を実施した。事前のデータは、雄および雌間で統計的差異が存在しないことを示し、したがって、雄および雌を全ての分析について 1 つの群とみなした。

【 0 1 1 9 】

22 日目、ペントバルビタールの致死注射により全ての動物を殺し、性別を判定した。全ての後続の計測および分析をマウスのゲノタイプの知識なしで実施して調査者のバイアスを回避した。試験の終了時にゲノタイピングを実施してデータと規定のゲノタイプとの対応を明らかにした。軟骨無形成症は表現型変異を有する疾患であるため、全ての動物を試験に含めた。22 日目前に死亡した動物を使用して早期死亡に対する処理の影響を調査した。22 日目における生存動物を全ての分析に使用した。全ての実験およびデータ計測を全ての時点において盲検化実験者により実施した。

10

【 0 1 2 0 】

22 日目における殺後、体重を計測した。死体の皮を慎重に剥ぎ、内臓摘出し、骨格計測を X 線に基づき実施した。標準的なパラフィン包埋技術を使用するさらなる組織学的分析のために臓器を回収し、秤量し、10 % のホルマリン中で貯蔵した。次いで、臓器を肉眼異常、例えば、色または質感の変化および結節の存在について観察した。全ての動物実験の間、The Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication no. 85-23, revised 1985; <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>) および European commission guidelines for the protection of animals used for scientific purposes ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm)) に従った。全ての手順は、Institutional Ethic Committee for the use of Laboratory Animals (CIEPAL Azur) により承認された（承認番号 NCE-2012-52）。

20

【 0 1 2 1 】

実施例 7 : s F G F R 3 ポリペプチドを産生するために使用された細胞系は、活性に影響を与えたかった

30

懸濁 HEK 293 細胞または CHO 細胞中で産生された s F G F R 3 \_ D e l 1 (配列番号 7)、s F G F R 3 \_ D e l 4 (配列番号 1)、および s F G F R 3 \_ D e l 4 - L K 1 - L K 2 (配列番号 10) の FGF 2 結合活性、Kd、および細胞シグナリングに対する効果を比較した。HEK 293 細胞または CHO 細胞は、タンパク質の翻訳後修飾が異なる。異なる細胞系中での s F G F R 3 ポリペプチドの発現は、s F G F R 3 ポリペプチドの Kd にも、結合活性にも、細胞内シグナリング阻害に対する効果にも影響を与えたかった（図 1 A ~ 1 D）。

【 0 1 2 2 】

実施例 8 : s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S および s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 の産生の改善

40

s F G F R 3 \_ D e l 1 (配列番号 7)、s F G F R 3 \_ D e l 4 (配列番号 1)、および s F G F R 3 \_ D e l 4 - L K 1 - L K 2 (配列番号 10) の s F G F R 3 ポリペプチドを、253 位におけるセリン残基によるシスティン残基のアミノ酸置換または拡張 Ig 様 C2 型ドメイン 3 (配列番号 33) のいずれかを含むようにそれぞれ改変した。s F G F R 3 \_ D e l 1 および s F G F R 3 \_ D e l 4 - L K 1 - L K 2 のこれらの改変は、凝集が依然として可視的であったため、s F G F R 3 ポリペプチドの産生に対する効果を有さず、または最小の効果を有した（それぞれ、図 2 A および 2 B）。驚くべきことに、253 位におけるセリン残基によるシスティン残基のアミノ酸置換 (s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S) または拡張 Ig 様 C2 型ドメイン 3 (配列番号 33) のいずれかを含

50

めるための s F G F R 3 \_ D e l 4 の改変は、 s F G F R 3 ポリペプチドの産生を改善した。特に、還元および非還元の両方の条件下で s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S および s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 の最小の凝集が存在した(図 2 C)。C 2 5 3 S または D 3 の包含は、 s F G F R 3 \_ D e l 4 と比較して産生の相対的増加ももたらし、 s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S 産生においては 2 倍の増加および s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 産生においては 3 倍の増加をもたらした。

【 0 1 2 3 】

さらに、 s F G F R 3 \_ D e l 4 、 s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S 、および s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は類似の Kd を示し、翻訳後修飾の細胞タイプ特異的変化により影響を受けなかった。Exp i CHO 細胞において、 s F G F R 3 \_ D e l 4 の Kd は 0.8 nM であり、 s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S の Kd は 0.6 nM であり、 s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 の Kd は 0.7 nM であった(図 3 A および表 1)。

10

【 0 1 2 4 】

【表 1】

表1. sFGFR3ポリペプチドの解離定数(Kd)

sFGFR3ポリペプチド	Kd (nM)
sFGFR3_Del4	0.8
sFGFR3_Del4-C253S	0.6
sFGFR3_Del4-D3	0.7

20

【 0 1 2 5 】

実施例 9 : s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S および s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は、インビトロで同等に活性である

s F G F R 3 \_ D e l 4 、 s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S 、および s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は、 F G F R 3 a c h 突然変異を過剰発現するように遺伝子改変させた A T D C 5 細胞 ( A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞系) の増殖を回復させた。3 6 n M の用量において、 H E K 2 9 3 細胞を使用して産生された s F G F R 3 \_ D e l 4 は増殖を 1 1 5 . 5 % に増加させ、 C H O - S 細胞を使用して産生された s F G F R 3 \_ D e l 4 は増殖を 1 1 6 % に増加させ、 C H O - S 細胞を使用して産生された s F G F R 3 \_ D e l 4 - C 2 5 3 S は増殖を 1 1 4 . 4 % に増加させ、 C H O - S 細胞を使用して産生された s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は増殖を 1 2 0 . 1 % に増加させた(図 3 B)。

30

【 0 1 2 6 】

s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 を、 F G F R 3 G 3 8 0 R 発現 S R E ( - L u c ) H E K 細胞系においても、 0 n M 、 7 0 n M 、および 2 8 0 n M の用量において、 1 n g / m l の h F G F 2 を用いてまたは用いずに試験した(図 4 ; n = 8)。図 4 に示されるデータは、平均値 + / - 平均値の標準誤差 ( S E M ) である。これらのデータは正規分布に従い、ダゴスティーノ・ピアソンオムニバス正規性検定に基づく等分散を有する。スチュードントの t 検定を使用して s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 を用いるまたは用いない統計的比較を実施した。図 4 に示されるとおり、 s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は、 S R E 細胞系中でルシフェラーゼシグナリングを減少させる。

40

【 0 1 2 7 】

実施例 1 0 : s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は、軟骨無形成症を有するマウスの骨成長を回復させ、死亡を予防し、大後頭孔形状を回復させる

低用量 ( 0 . 2 5 m g / k g ) の s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 を使用してインビボ効力試験を実施例 6 のとおり実施した。合計 6 0 匹のマウスをビヒクル群に含め、 3 2 匹の野生型 ( w t ) マウスおよび 2 8 匹の F g f r 3 a c h / + マウスであった。処理群は 4 0 匹のマウスを含み、 1 9 匹の w t マウスおよび 2 1 匹の F g f r 3 a c h / + マウスであった。驚くべきことに、低用量の s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 は、軟骨無形成症を有するマウスの早期死亡をほぼ完全に予防した(図 5)。対照群において、 F g f r 3 a c h

50

/ + マウスの 53.6 % が離乳前に死亡した一方、処理群のマウスの 4.8 % のみが 22 日前に死亡し、0.25 mg / kg における sFGFR3\_Del1 による処理後にマウスの 20 % が死亡した（表 2；Garcia et al. Sci. Transl. Med. 5 : 203ra124, 2013（参照により全体として本明細書に組み込まれる）も参照されたい）。

【0128】

sFGFR3\_Del4-D3 は、軸および付属肢骨格に関する wt および Fgfr3a ch / + マウス間の初期相違を矯正して骨成長も部分的に回復させた（表 2）。低用量の sFGFR3\_Del1 による処理の事前の結果とは対照的に、低用量の sFGFR3\_Del4-D3 は正常な大後頭孔形状を回復させた。

10

【0129】

【表 2】

表2. 軟骨無形成症を有するマウスへの高用量の sFGFR3\_Del1、低用量の sFGFR3\_Del1、および低用量の sFGFR3\_Del4-D3 の投与のインピボ結果

	2.5 mg/kg sFGFR3_Del1 (Garcia ら)	0.25 mg/kg sFGFR3_Del1 (Garcia ら)	0.25 mg/kg sFGFR3_Del4-D3
死亡率	12%	20%	4.8%
軸矯正率	77%	24%	10%
付随肢矯正率	150-215%	18-42%	11-42%
孔形状矯正率 (W/H比)	測定せず	測定せず	111%

20

【0130】

実施例 11 : sFGFR3\_Del4-C253S の投与による軟骨無形成症の治療  
軟骨無形成症を罹患するヒト患者（例えば、幼児、小児、若年者、または成人）は、特定の投与量（例えば、0.0002 mg / kg / 日～約 20 mg / kg / 日、例えば、0.001 mg / kg / 日～7 mg / kg / 日）において適切な経路（例えば、皮下注射による）により sFGFR3\_Del4-C253S（図 6；配列番号 2）を数日間、数週間、数ヶ月間、または数年間の過程にわたり投与することにより治療することができる。 sFGFR3\_Del4-C253S により治療される軟骨無形成症の進行は、いくつかの確立された方法の 1 つ以上によりモニタリングすることができる。医師は、患者を直接的な観察によりモニタリングして患者により呈される軟骨無形成症の症状が治療に応答していかに変化したかを評価することができる。例えば、医師は、患者の体重、頭蓋長および / または頭蓋幅の変化を一定期間にわたり、例えば、sFGFR3\_Del4-C253S による治療過程にわたり 1 カ月当たりもしくは 1 年当たり 1、2、3、4 回以上または約 1、2、3、4、5、6、7、8、12、もしくは 16 週間ごとにモニタリングすることができる。患者の体重および / もしくは頭蓋サイズまたはそれらの変化は、治療の規定イベントにおいて、例えば、sFGFR3\_Del4-C253S の投与前および / または後に測定することもできる。例えば、体重および / または頭蓋サイズは、sFGFR3\_Del4-C253S の投与に応答して計測する。

30

【0131】

実施例 12 : sFGFR3\_Del4-D3 の投与による軟骨無形成症の治療  
さらに、軟骨無形成症を罹患するヒト患者（例えば、幼児、小児、若年者、または成人）は、特定の投与量（例えば、0.0002 mg / kg / 日～約 20 mg / kg / 日、例えば、0.001 mg / kg / 日～7 mg / kg / 日）において適切な経路により（例えば、皮下注射による） sFGFR3\_Del4-D3（配列番号 33）の sFGFR3 ポリペプチドを数日間、数週間、数ヶ月間、または数年間の過程にわたり投与することにより

40

50

治療することができる。s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 により治療される軟骨無形成症の進行は、いくつかの確立された方法の1つ以上によりモニタリングすることができる。医師は、患者を直接的な観察によりモニタリングして患者により呈される軟骨無形成症の症状が治療に応答していかに変化したかを評価することができる。例えば、医師は、患者の体重、頭蓋長および/または頭蓋幅の変化を一定期間にわたり、例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 による治療過程にわたり1カ月当たりもしくは1年当たり1、2、3、4回以上または約1、2、3、4、5、6、7、8、12、もしくは16週間ごとにモニタリングすることができる。患者の体重および/もしくは頭蓋サイズまたはそれらの変化は、治療の規定イベントにおいて、例えば、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の投与前および/または後に測定することもできる。例えば、体重および/または頭蓋サイズは、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の投与に応答して計測する。

【 0 1 3 2 】

実施例13：s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 およびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の產生

s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 およびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S ポリペプチドを実施例2に記載のとおり精製した。拡張Ig様C2型ドメイン3(F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3)または253位におけるセリン残基によるシスティン残基のアミノ酸置換(s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S)のいずれかを含めるためのs F G F R 3 \_ D e 1 4 の改変は、s F G F R 3 ポリペプチドの產生を改善した。特に、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用する還元および非還元の両方の条件(S D S - P A G E; それぞれ図7Aおよび7B)下でs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 およびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の約2%未満の凝集が存在した(F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 について2.3mg/mlまたは23mg/mlおよびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S について1.5mg/mlおよび15mg/mlの濃度を使用するロード時に観察)。流加培養におけるs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 およびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の產生後、キャピラリー電気泳動を使用して上位5つのクローンを分離して0.93~1.0g/Lおよび0.98~1.1g/Lのs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 およびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S をそれぞれ得た。イオン交換クロマトグラフィーを使用するウイルス濾過は、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 およびs F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の両方について60%超の収率をもたらした。

【 0 1 3 3 】

実施例14：インビボでのs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の薬物動態および組織分布  
インビボ試験を実施してs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の薬物動態パラメータ、血液脳関門を越えるs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の取り込み、ならびに腎臓、肝臓、脾臓、肺、および心臓中のs F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の組織分布を調査した。本明細書に記載の試験は4つの処理群を含み、1処理群当たり5つの群のC57BL/6Jマウスおよび1群当たり合計4匹のマウス(n=4)を有した(表3)。マウスは雄であり、25~30グラムの体重であった。

【 0 1 3 4 】

【表3】

表3. sFGFR3 Del4-D3の試験において使用されたマウスの概要

処理群	sFGFR3_Del4-D3 (mg/kg)	経路	PK	BBB	組織分布
1	0.25	SC	有	無	無
2	2.5	SC	有	無	有
3	2.5	IV	有	有	有
4	10	SC	有	無	無

【 0 1 3 5 】

10

20

30

40

50

第1群を1分、15分、および30分において試料採取し；第2群を4時間において試料採取し；第3群を24時間において試料採取し；第4群を36時間において試料採取し；第5群を48時間において試料採取した。第1群については、留置動脈内カテーテル(P E - 10)をイソフルラン麻酔下で1本の総頸動脈中に挿入し、30分の最終試料採取時点における反復採血に使用した。静脈内注射のため、125I-sFGFR3-D e 14-D 3を、イソフルラン麻酔下で皮膚切開により曝露させた頸静脈中に静脈内注射した。第1群マウスは、実験全体にわたり麻酔したままであった。反復血液試料(2×約50μL)を動脈カテーテルから静脈内注射の1分および15分後に抜き取った。第2～5群については、125I-sFGFR3-D e 14-D 3の注射後、皮膚を外科用クリップにより閉じ、マウスを起床させ、ケージに戻した。第3群についての終了時間5分前、マウスを再麻酔化し、マウスは頸静脈中への<sup>3</sup>H-アルブミンの静脈内ボーラスを受容した。<sup>3</sup>Hトレーサー用量は、後の試料採取時間におけるより低用量による二重同位体標識に好適な血中の125Iと<sup>3</sup>Hとの比を得るように標的化した。最終試料採取時間(2時間、3時間、24時間、36時間、および48時間)において、血液試料を回収し、動物を安樂死させた。ホモジナイゼーションおよびトレーサーの組織濃度の測定のために脳を試料採取した。試験の終点は、sFGFR3-D e 14-D 3についての薬物動態パラメータ(終末相半減期)、血液脳関門を越えるsFGFR3-D e 14-D 3の取り込み、ならびに腎臓、肝臓、脾臓、肺、および心臓中のsFGFR3-D e 14-D 3の組織分布を含んだ。

#### 【0136】

実施例15：sFGFR3-D e 14-D 3およびsFGFR3-D e 14-C 253Sの熱および血漿安定性

示差走査熱量測定を使用してマウス血漿中のsFGFR3-D e 14-D 3およびsFGFR3-D e 14-C 253Sの熱安定性を調査した。sFGFR3-D e 14-D 3については、2つの緩衝液(20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5、および20mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5)をポリペプチド試料に添加した。sFGFR3-D e 14-C 253Sについては、2つの緩衝液(20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5、および40mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5)をポリペプチド試料に添加した。20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5緩衝液中のsFGFR3-D e 14-C 253Sについての融解温度(T<sub>m</sub>)は52および56であり、40mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5緩衝液中のsFGFR3-D e 14-C 253SについてのT<sub>m</sub>は55および60であった(図8A)。sFGFR3-D e 14-D 3については、2つの緩衝液(20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5、および20mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5)をポリペプチド試料に添加した。20mMのリン酸塩、40mMのNaCl、pH7.5緩衝液中のsFGFR3-D e 14-D 3についてのT<sub>m</sub>は50および54であり、20mMのクエン酸塩、40mMのNaCl、pH6.5緩衝液中のsFGFR3-D e 14-D 3についてのT<sub>m</sub>は53および58であった(図8B)。これらの結果は、sFGFR3-D e 14-D 3およびsFGFR3-D e 14-C 253Sの両方がポリペプチド安定性およびアンフォールディングの2つのドメインを示すことを示す。

#### 【0137】

ヒスチジンタグを有するsFGFR3-D e 14-D 3のエクスビボ血漿安定性は、ボルトン・ハンター法を使用して125I-トレーサーにより精製sFGFR3-D e 14-D 3を標識し、次いでPD-10(Sephadex(登録商標)G-25)カラム上で精製することにより測定した。ピーク分画のトリクロロ酢酸(TCA)沈殿性も測定して125I-トレーサーの安定性を確認した。37に予備加温したマウス血漿(n=4)に125I-sFGFR3-D e 14-D 3を-10cpm/mLの濃度までスパイクし、次いでボルテックスに供した。血漿試料をEppendorf Thermomixer(r(登録商標)中で穏やかな回転(300rpm)下で125I-sFGFR3-D e 1

10

20

30

40

50

4 - D 3 とインキュベートした。次いで、TCA沈殿 (10  $\mu$ l の試料および100  $\mu$ l の2%のBSA) のため、および高速液体クロマトグラフィー (FPLC) カラム上へのインジェクション (20  $\mu$ l の試料および150  $\mu$ l の10 mMのPBS、pH 7.4) のために、0、30、60、120、180、および360分の間隔においてアリコートを回収した。TCA沈殿またはFPLCインジェクションを実施するまでアリコートを氷上で貯蔵した。

【0138】

TCA沈殿のため、1 mLの氷冷10%TCAを血漿試料に添加し、氷上で10分間インキュベートし、4,000gにおいて5分間遠心分離し、次いで上清およびペレットを分離し、両方をガンマカウンターで計数した。エクスピボ血漿安定性の評価のため、100  $\mu$ l の試料をFPLCカラム (Superdex (登録商標) 200 10 / 300 GL) 上でインジェクトし、1.5カラム容量について0.75 mL / 分の速度において溶出させた。カラムから1 mLの分画を回収し、次いでガンマカウンターで計測した。37におけるsFGFR3\_De14-D3の血漿安定性は、0分において95%、2時間において95%、および24時間において約92%と測定され、わずかな凝集を伴うにすぎなかった (図9A)。

10

【0139】

静脈内および皮下注射による投与後の血漿中のsFGFR3\_De14-D3のインビボ安定性も測定した。ボルトン・ハンター法を使用して125I-トレーサーによりsFGFR3\_De14-D3を標識し、次いでPD-10 (Sephadex (登録商標) G-25) カラム上で精製した。125I-標識sFGFR3\_De14-D3 (約50  $\mu$ LのPBS中10  $\mu$ Ci) を、静脈内または皮下注射により麻酔C57Bl/6マウス中に投与した。125I-トレーサータンパク質用量 (約0.1 mg / kg) に非標識タンパク質を2.5 mg / kgの総用量まで補った。血管マーカーとして使用されるラット血清アルブミンを [3H] - NSP (N-スクシンイニジル (N-succinimidyl) [2,3-3H] プロピオネート; Perkin Elmer) により標識し、PD-10 (Sephadex (登録商標) G25) カラム上で精製した。

20

【0140】

静脈内ボーラス注射後の血漿中のsFGFR3\_De14-D3の安定性について、FPLC溶出プロファイルは、15分まで血漿中で分解産物を示さなかった (図9B)。sFGFR3\_De14-D3の投与30分後において、少量の低分子量の分解産物が出現し、それは2時間までに増加したが、24時間までに大部分が消失した。皮下注射後の血漿中のsFGFR3\_De14-D3の安定性について、FPLC溶出プロファイルは、30分において血漿中でいくらかの分解産物を示し、2時間および4時間までに分解が増加した (図9C)。24時間後に血漿中に残る少量のトレーサーは、大部分が、インタクトsFGFR3\_De14-D3ポリペプチドとして出現する。図9Bおよび9Cについての下段パネルのクロマトグラムを、溶出パターンのより容易な比較のためにそれぞれの個々のランにおける最大ピークに正規化したものとして提示する。

30

【0141】

実施例16: sFGFR3\_De14-D3およびsFGFR3\_De14-C253Sのリガンド結合活性

40

ヒトFGF2についてのsFGFR3\_De14-D3およびsFGFR3\_De14-C253Sの結合親和性を特徴付けるための実験を実施した。FGF2についてのsFGFR3\_De14-D3の解離定数 (Kd) およびsFGFR3\_De14-C253SのKdを実施例3に記載のとおり測定し、20 mMのリン酸塩、40 mMのNaCl、pH 7.5の再生緩衝液を用いた。13 nM、6.5 nM、3.25 nM、および1.75 nMの濃度を、sFGFR3\_De14-D3およびsFGFR3\_De14-C253Sの両方について試験した。sFGFR3\_De14-D3のKdは約3.6 nMであることが測定され、sFGFR3\_De14-C253SのKdは約6.9 nMであることが測定された。これらの結果は、sFGFR3\_De14-D3およびsFGFR3\_D

50

e 1 4 - C 2 5 3 S が低い n M 範囲で F G F 2 についての結合活性を有することを示す。

【 0 1 4 2 】

実施例 1 7 : s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S は、インビトロで機能的活性を示す

増殖アッセイを使用して s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の機能的活性を試験した。 F G F R 3 a c h 突然変異を過剰発現するように遺伝子改変された A T D C 5 細胞 ( A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞系 ) を使用する増殖アッセイを実施例 4 に記載のとおり実施し、濃度は s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S について 1 u g / m l 、 1 0 u g / m l 、および 5 0 u g / m l であった。これらの濃度のそれぞれにおいて、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 は、 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞の増殖を回復させた ( 図 1 0 A および 1 0 B ) 。 E C 5 0 は、 1 u g / m l の濃度に基づき s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の両方について約 1 0 n M であることが測定された。これらの結果は、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S が低い n M 範囲で生物学的に活性であることを示す。

【 0 1 4 3 】

実施例 1 8 : s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 および s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S の薬物動態プロファイル

2 . 5 m g / k g の用量において皮下または静脈内投与される s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の薬物動態 ( P K ) プロファイルを使用して s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の終末期消失半減期を測定した ( 図 1 1 ) 。 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を皮下投与されたマウスについて 3 0 分、 2 時間、 4 時間、 8 時間、 2 4 時間、 3 6 時間および 4 8 時間ににおいて試料を回収した。 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を静脈内投与されたマウスについて 1 分、 1 5 分、 3 0 分、 2 時間、 2 4 時間、および 3 6 時間ににおいて試料を回収した。 2 . 5 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の皮下終末期消失半減期は約 2 0 時間であった一方、 2 . 5 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の静脈内終末期消失半減期は約 7 時間であった。 P K プロファイルから、皮下投与された 2 . 5 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 について T <sub>max</sub> は約 8 時間であり、 C <sub>max</sub> は約 4 . 5 n M であり、推定バイオアベイラビリティは約 3 0 % であった。 相の間の静脈内投与された s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の急速なクリアランスとそれに続くより緩慢な 相クリアランスが存在し、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - C 2 5 3 S について類似の静脈内 P K プロファイルであった。

【 0 1 4 4 】

実施例 1 9 : 腎臓および肝臓は、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の主なクリアランス経路である

s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 のクリアランスを腎臓、肝臓、脾臓、肺、および心臓組織において 2 . 5 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の静脈内投与の 3 0 分、 1 2 0 分、および 1 4 4 0 分後、ならびに 2 . 5 m g / k g の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の皮下投与の 3 0 分、 1 2 0 分、 2 4 0 分、 4 8 0 分、および 1 4 4 0 分後に評価した。 肝臓および腎臓は、静脈内投与についての s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 クリアランスの主要な経路であった ( 図 1 2 ) 。 腎臓は、皮下投与についての s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 クリアランスの主要な経路であった ( 図 1 3 ) 。

【 0 1 4 5 】

実施例 2 0 : s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 は血液脳関門を越えない

野生型マウスにおける血液脳関門を越える s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の取り込みを測定するための薬物動態試験も実施した。 静脈内ボーラス注射後、 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の脳組織の取り込みを 3 つの時点 ( 3 0 分、 2 時間、および 2 4 時間 ) において計測した。 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を放射性標識トレーサー ( 1 2 5 I - s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 ) として、 2 . 5 m g / k g の非標識 s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3

10

20

30

40

50

と注射した。125I-sFGFR3\_De14-D3の注射用量は1動物当たり約10 $\mu$ Ciであり、それは0.1mg/kg未満に対応する。マウスを30分、2時間、および24時間において安樂死させた後、臓器および血漿中の125I-sFGFR3\_De14-D3の濃度を液体シンチレーション計数により計測した。

#### 【0146】

トリクロロ酢酸(TCA)沈殿性材料(例えば、インタクトトレーサー)の分画を計測することにより血漿中および脳試料中の代謝について125I-sFGFR3\_De14-D3濃度を補正した。TCA補正の妥当性は、試料をサイズ排除高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)カラム上にインジェクトすることによって確認した。動物の殺直前に放射性標識アルブミン(H-RSA)を注射することにより血管内含有量( $V_0$ )について125I-sFGFR3\_De14-D3の臓器濃度を補正した。RSAの見かけの臓器の分布容量は、 $V_0$ を表す。アルブミンの用量は無視可能であった(生理学的濃度の1%のオーダー)。脳以外の全ての臓器について、血管含有量を減算し、血漿中のTCA沈殿性分画を考慮することにより濃度を計算した。しかしながら、脳以外のそれらの臓器中への分解材料の取り込みについては、TCA沈殿を実施しなかったため補正を行わなかった。

10

#### 【0147】

脳濃度は、以下の式： $C_{brain} (corr.) = [V_d (sFGFR3_De14-D3) - V_0] \times C_{plasma (terminal)}$  (式中、 $V_d (sFGFR3_De14-D3)$ は、脳内のsFGFR3\_De14-D3の分布容量( $C_{brain}/C_{plasma}$ として計算)であり、 $V_0$ は、脳内で分布するアルブミンの容量であり、 $C_{plasma (terminal)}$ は、最終試料採取の時間におけるsFGFR3\_De14-D3の血漿濃度である)により計算した。全ての濃度を1グラムまたは1ml当たりの注射用量のパーセント(%ID/gまたは%ID/mL)としてそれぞれ表現し、静脈内ボーラス注射の用量は100%に等しい。これらの値は、注射用量：(体重、g/1000g)  $\times$  2.5mgにより乗算することにより[mg/g]または[mg/mL]に変換することができる。全ての体重は25g~30gの範囲であった。

20

#### 【0148】

補正脳濃度(血管含有量および分解(TCA沈殿性)について補正後)により示されるおり、計測時点のいずれにおいても125I-sFGFR3\_De14-D3の検出可能な脳の取り込みは存在しなかった(図14A)。さらに、RSAの $V_d$ (= $V_0$ )および125I-sFGFR3\_De14-D3は、対応のあるt検定により決定されたとおり、計測時点(30分、2時間、および24時間)のいずれにおいても有意に異なることはなかった(図14B)。まとめると、静脈内ボーラスとして注射された2.5mg/kgの用量における30分、2時間、および24時間におけるマウスの脳組織中へのsFGFR3\_De14-D3の計測可能な取り込みは存在しなかった。

30

#### 【0149】

実施例21：軟骨無形成症の治療についてのsFGFR3\_De14-D3のインビボ効力sFGFR3\_De14-D3およびsFGFR3\_De14-C253Sを、2.5mg/kgの週1回もしくは2回または10mg/kgの週2回の皮下用量においてそれぞれ評価した。繁殖を実施して半数の野生型および半数のヘテロ接合性Fgr3ach/+マウスを有する30匹のリッターを生成した(表4)。

40

#### 【0150】

50

## 【表4】

表4. 野生型(WT)および*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスへのsFGFR3\_Del4-D3およびsFGFR3\_Del4-C253Sの皮下投与

		PBS (プール)	2.5mg 週1回	2.5mg 週2回	10mg 週2回
<b>sFGFR3_Del4-D3</b>					
	WT	65	26	22	23
	<i>Fgfr3<sup>ach/+</sup></i>	43	26	25	30
					合計N= 260
<b>sFGFR3_Del4-C253S</b>					
	WT	65	26	22	23
	<i>Fgfr3<sup>ach/+</sup></i>	27	22	18	28
					合計N= 231
	%生存	62.8	84.6	72.0	93.3
	%死亡	37.2	15.4	28.0	6.7

## 【0151】

3日目、単一リッターからの全ての新生マウスは同一用量を受容した。対照リッターは、10 μlのPBS(ビヒクル)を受容した。その後、sFGFR3\_Del4-D3およびsFGFR3\_Del4-C253Sの皮下注射を、2.5mg/kgの週1回もしくは2回または10mg/kgの週2回の用量において背中の左側または右側上に交互に3週間投与した。マウスを特に口コモーションおよび排尿の変更に留意して毎日観察し、注射日に秤量した。合併症を有するマウスを監視のために1日2回観察した。事前のデータは、雌および雄間に統計的差異が存在しないことを示し、したがって、雌および雄を全ての分析について1つの群とみなした。

## 【0152】

22日目、全ての動物をペントバルビタールの致死注射により殺し、性別を判定した。全ての後続の計測および分析は、マウスゲノタイプの知識なしで実施して調査者のバイアスを回避した。試験の終了時にゲノタイピングを実施してデータと規定のゲノタイプとの対応を明らかにした。軟骨無形成症は表現型変異を有する疾患であるため、全ての動物を試験に含めた。22日目前に死亡した動物を使用して早期死亡に関する治療の影響を調査した。22日目における生存動物を全ての分析に使用した。全ての実験およびデータ計測を全ての時点において盲検化実験者により実施した。

## 【0153】

2.5mg/kgの週1回もしくは2回または10mg/kgの週2回におけるsFGFR3\_Del4-D3の皮下投与は、PBSを受容した*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスに対して*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスの生存率を増加させた(図15および表4)。特に、10mg/kgのsFGFR3\_Del4-D3の週2回の投与は*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスの93%の生存率をもたらし、2.5mg/kgのsFGFR3\_Del4-D3の週1回の投与は*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスの84%の生存率をもたらし、2.5mg/kgのsFGFR3\_Del4-D3の週2回の投与は*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスの72%の生存率をもたらした一方、PBSを受容した*Fgfr3<sup>ach/+</sup>*マウスの生存率

10

20

30

40

50

は 62.8% であった。10 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 2 回投与された Fgfr3ach/+ マウスの死亡率は 6.7% であり、2.5 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 1 回投与されたマウスの死亡率は 15.4% であり、2.5 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 2 回投与された Fgfr3ach/+ マウスの死亡率は 28.0% であり、PBS を投与された Fgfr3ach/+ マウスの死亡率は 37.2% であった。sFGFR3\_Del4-D3 による処理後の Fgfr3ach/+ マウス生存率の統計的分析は、アゴスティーノ (Agostino)・ピアソンオムニバス正規性検定とそれに続く t 検定を使用して実施した。全ての調査群は、正規性検定をパスした。これらの分析からの P 値を以下に示し、\* は < 0.05 の P 値を表し、\*\*\* は < 0.001 の P 値を表す (表 5)。

【0154】

【表 5】

表5. 野生型(WT)およびFgfr3ach/+ マウスへのsFGFR3\_Del4-D3の皮下投与についてのP値

群比較	P値
Wt対ach	***
Fgfr3ach/+ PBS 対 Fgfr3ach/+ 2.5 mg/kg, 1回	***
Fgfr3ach/+ PBS 対 Fgfr3ach/+ 2.5 mg/kg, 2回	*
Fgfr3ach/+ PBS 対 Fgfr3ach/+ 10 mg/kg, 2回	***
Wt PBS 対 Fgfr3ach/+ 10 mg/kg, 2回	非有意

【0155】

sFGFR3\_Del4-D3 の 2.5 mg / kg における週 1 回もしくは 2 回または 10 mg / kg の週 2 回の皮下投与も、PBS を受容した Fgfr3ach/+ マウスに対して Fgfr3ach/+ マウスにおける口コモーター疾病および腹式呼吸における合併症の重症度および頻度を減少させた (図 16)。特に、口コモーター疾病は、10 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 2 回皮下投与された Fgfr3ach/+ マウスで最も大きく減少し、それに続き sFGFR3\_Del4-D3 2.5 mg / kg を週 2 回投与されたマウスおよび sFGFR3\_Del4-D3 2.5 mg / kg を週 1 回投与されたマウスで減少した。腹式呼吸における合併症は、10 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 2 回皮下投与された Fgfr3ach/+ マウスで最も大きく減少し、それに続き sFGFR3\_Del4-D3 2.5 mg / kg を週 1 回投与されたマウス、次いで sFGFR3\_Del4-D3 2.5 mg / kg を週 2 回投与されたマウスで減少した。これらの結果は、sFGFR3\_Del4-D3 が Fgfr3ach/+ マウスにおける軟骨無形成症の症状を低減させることを示す。

【0156】

sFGFR3\_Del4-D3 の皮下投与は、PBS を受容した Fgfr3ach/+ マウスに対して 2.5 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 1 回もしくは 2 回または 10 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 を週 2 回受容した Fgfr3ach/+ マウスにおいて軸長および尾長、ならびに長骨を含めた総体長も有意に増加させた (p = 0.07) (図 17A ~ 17C)。尾長および体長 (軸長) は、全骨格上で同一のデジタルキャリパーを使用して計測した。脛骨長は、デジタル X 線上で計測した。10 mg / kg の sFGFR3\_Del4-D3 の週 2 回の投与は、Fgfr3ach/+ マウス

10

20

30

40

50

スの 51 %の軸矯正率（体長および尾長）をもたらし、それに続き 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回受容した F g f r 3 a c h / マウスの 43 %の軸矯正率、および 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回受容した F g f r 3 a c h / + マウスの 39 %の軸矯正率をもたらした。骨長および体長の増加は、P B S を受容体した F g f r 3 a c h / + マウスに対して 2.5 mg / kg または 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスの X 線写真からも明らかであった（図 17 D）。10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の週 2 回の投与は、F g f r 3 a c h / + マウスの 86 %の付属肢矯正率（脛骨および大腿骨長）をもたらし、それに続き 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回受容した F g f r 3 a c h / + マウスの 68 %の付属肢矯正率および 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回受容した F g f r 3 a c h / + マウスの 54 %の付属肢矯正率をもたらした。

## 【 0 1 5 7 】

s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の皮下投与は、P B S を受容体した F g f r 3 a c h / + マウスに対して F g f r 3 a c h / + マウスの頭蓋比（長さ / 幅（L / W））の用量依存的な改善ももたらした（図 18 A）。10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回皮下投与された F g f r 3 a c h / + マウスが頭蓋比（L / W）の最大改善を呈し、それに続き 2 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスおよび 2 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回投与された F g f r 3 a c h / + マウスが改善を呈した。特に、10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の週 2 回の投与は F g f r 3 a c h / + マウスの 37 %の頭蓋形状矯正率（L / W 比）をもたらし、それに続き 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 2 回受容した F g f r 3 a c h / + の 29 %の頭蓋形状矯正率および 2.5 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を週 1 回受容した F g f r 3 a c h / + マウスの 19 %の頭蓋形状矯正率をもたらした。頭蓋比の改善は、P B S を受容した F g f r 3 a c h / + マウスに対して 10 mg / kg の s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 を投与された F g f r 3 a c h / + マウスの X 線写真からも明らかであった（図 18 B）。体長、尾、大腿骨、脛骨、および頭蓋比についての骨計測値（mm および平均  $\pm$  SEM で提示）を以下に示す（表 6）。これらの結果は、F g f r 3 a c h / + マウスの生存率の増加、合併症の数の低減、骨成長の増加、および骨格比率の改善により実証されるとおり、s F G F R 3 \_ D e 1 4 - D 3 の用量依存的インビボ効力を示す。

## 【 0 1 5 8 】

## 【表 6】

表 6. sFGFR3 Del4-D3 を皮下投与された WT および Fgfr3<sup>ach/+</sup> マウスの体長、尾、大腿骨、脛骨、および頭蓋比についての骨計測値（mm および平均  $\pm$  SEM で提示）

sFGFR3 Del4-D3 の効力					
	WT	PBS、 Fgfr3 <sup>ach/+</sup> マウス	2.5mg/kg 週1回	2.5mg/kg 週2回	10mg/kg 週2回
体長	144.8 $\pm$ 0.53	129.2 $\pm$ 1.98	135 $\pm$ 1.48	135.5 $\pm$ 1.75	135.2 $\pm$ 1.58
尾	77.65 $\pm$ 0.39	70.25 $\pm$ 1.1	73.37 $\pm$ 1.66	73.69 $\pm$ 1.5	74.95 $\pm$ 0.91
大腿骨	10.94 $\pm$ 0.05	10.14 $\pm$ 0.13	10.47 $\pm$ 0.08	10.58 $\pm$ 0.09	10.63 $\pm$ 0.10
脛骨	14.19 $\pm$ 0.05	13.67 $\pm$ 0.14	14.02 $\pm$ 0.10	14.09 $\pm$ 0.12	14.25 $\pm$ 0.12
頭蓋比	1.99 $\pm$ 0.01	1.79 $\pm$ 0.01	1.83 $\pm$ 0.02	1.85 $\pm$ 0.01	1.86 $\pm$ 0.02

## 【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

50

さらに、2.5mg/kgの週2回の投与量においてsFGFR3\_Del1を投与されたFgfr3ach/+マウスについての骨計測値の比較は、2.5mg/kgの週2回の投与量におけるsFGFR3\_Del14-D3の投与が、Fgfr3ach/+マウスの骨、尾、大腿骨、および脛骨長の増加ならびに頭蓋比の改善において同等またはそれよりも有効であったことを示す（表7）。特に、sFGFR3\_Del14-D3を投与されたFgfr3ach/+マウスの体長は、sFGFR3\_Del1を投与されたFgfr3ach/+マウスについての134.4±1.17mmに対して135.5±1.75mmに改善し；sFGFR3\_Del14-D3を投与されたFgfr3ach/+マウスの尾長は、sFGFR3\_Del1を投与されたFgfr3ach/+マウスについての71.58±0.86mmに対して73.69±1.5mmに改善し；sFGFR3\_Del14-D3を投与されたFgfr3ach/+マウスの大腿骨長は、sFGFR3\_Del1を投与されたFgfr3ach/+マウスについての10.01±0.06mmに対して10.58±0.09mmに改善し；sFGFR3\_Del14-D3を投与されたFgfr3ach/+マウスの脛骨長は、sFGFR3\_Del1を投与されたFgfr3ach/+マウスについての13.27±0.31mmに対して14.09±0.12mmに改善し；sFGFR3\_Del14-D3を投与されたFgfr3ach/+マウスの頭蓋比は、sFGFR3\_Del1を投与されたFgfr3ach/+マウスについての1.81±0.02mmに対して1.85±0.01mmに改善した。

【0160】

【表7】

表7. sFGFR3\_Del1を皮下投与されたWTおよびFgfr3ach/+マウスの体長、尾、大腿骨、脛骨、および頭蓋比についての骨計測値(mmおよび平均±SEMで提示)(Garcia et al. Sci. Transl. Med. 5:203ra124, 2013に記載のデータ)

sFGFR3_Del1の効力				
	WT	PBS、Fgfr3ach/+ マウス	0.25mg/kg 週2回	2.5mg/kg 週2回
体長	133.9±0.8	118.5±1.76	132.4±1.26	134.4±1.17
尾	71.9±0.49	64.48±1.1	71.05±0.99	71.58±0.86
大腿骨	10.05±0.17	9.67±0.16	9.85±0.10	10.01±0.06
脛骨	13.43±0.19	12.62±0.18	12.87±0.14	13.27±0.31
頭蓋比	1.94±0.01	1.75±0.01	1.77±0.02	1.81±0.02

【0161】

実施例22：sFGFR3\_Del14-D3の投与に伴う臓器毒性は存在しない  
sFGFR3\_Del14-D3投与に伴う臓器毒性を特徴付けるための病理組織学的試験を実施した。野生型マウス（1用量当たり6匹の雄および6匹の雌）にPBS、2.5mg/kgのsFGFR3\_Del14-D3を週1回、2.5mg/kgのsFGFR3\_Del14-D3を週2回投与した。また10mg/kgのsFGFR3\_Del14-D3を週2回投与した。調査臓器は、腎臓、皮膚、唾液腺、下頸リンパ節、胆嚢、脾臓、脾臓、肺、心臓、大動脈、空腸、結腸、および肝臓を含んだ。sFGFR3\_Del14-D3の用量のいずれかを投与された野生型マウス中の臓器毒性を示す病理組織学的結果は存在しなかった。これらの結果は、sFGFR3\_Del14-D3の10mg/kgまでの週2回の投与に伴う毒性が存在しないことを示す。

【0162】

実施例23：線維芽細胞成長因子に対するsFGFR3\_Del14-D3の結合親和性の測定

本発明者らは、sFGFR3\_Del14-D3が線維芽細胞成長因子（FGF）リガンド

10

20

30

40

50

に結合し、膜結合 F G F R 3 への F G F の結合を妨害するためのデコイとして作用することを決定した。B I A C O R E (商標) T 2 0 0 (G E H e a l t h c a r e) を使用して表面プラズモン共鳴を実施して固定化 s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 への異なるヒト F G F (h F G F ) 結合についての  $K_d$  値を測定した。特に、h F G F 1 (図 19 A)、h F G F 2 (図 19 B)、h F G F 9 (図 19 C)、および h F G F 1 8 (図 19 D) の傍分泌 h F G F ならびに h F G F 1 9 (図 19 E) および h F G F 2 1 (図 19 F) の内分泌 h F G F についての  $K_d$  値を測定した。4 つ全ての傍分泌 F G F リガンドは、ナノモル濃度 (nM) の親和性で s F G F R 3 \_ D e l 4 - D 3 に結合した (表 8)。

【0163】

【表 8】

傍分泌 FGF	結合	$k_{a1}$ (1/Ms)	$k_{a2}$ (1/Ms)	$k_{d1}$ (1/s)	$k_{d2}$ (1/s)	$K_D$ (M) カイネティック	$Chi^2$ (RU <sup>2</sup> ) 平均	$K_D$ (M) 定常状態	$Chi^2$ (RU <sup>2</sup> ) 平均
FGF1	2:1結合 および 定常 状態	2.0* $10^{+11}$	1.2* $10^{-3}$	1610	6.4* $10^{-4}$	$2.6*10^{-9}$ (+/- $1.9*10^{-9}$ , n = 3)	0.138	$5.7*10^{-9}$ (+/- $2.1*10^{-9}$ , n=3)	0.247
FGF2	1:1結合	9.0* $10^{+5}$		4.75* $10^{-4}$		$6.1*10^{-10}$ (+/- $1.7*10^{-10}$ , n = 3)	13.6		
FGF9	2:1結合 および 定常 状態	2.3* $10^{+6}$	3.0* $10^{-2}$	2.6* $10^{-2}$	3.6* $10^{-3}$	$1.8*10^{-9}$ (+/- $0.25*10^{-9}$ , n = 3)	0.14	$3.6*10^{-9}$ (n = 1)	0.25
FGF18	1:1結合 および 定常 状態	2.0* $10^{+5}$		9.1* $10^{-3}$		$4.5*10^{-9}$ (+/- $2.5*10^{-9}$ , n = 3)	9.7	$6.4*10^{-9}$ (+/- $0.89*10^{-9}$ , n=4)	11.8
内分泌 FGFs									
FGF19	2:1結合	5.4* $10^{+4}$	7.3* $10^{-3}$	1.5* $10^{-1}$	3.6* $10^{-3}$	$4.8*10^{-7}$ (+/- $3.2*10^{-7}$ , n = 3)	0.05		
FGF21	2:1結合	258	1.8* $10^{-2}$	5.5* $10^{-3}$	1.4* $10^{-3}$	$2.8*10^{-5}$ (n = 2)	0.56		

表8.  $K_d$ 測定ならびにヒト傍分泌FGF(hFGF1、hFGF2、hFGF9、およびhFGF18)およびヒト内分泌FGF (hFGF19およびhFGF21)についての値のまとめ

【0164】

F G F 2 および F G F 1 8 について、結合親和性の最も直接的なモデルである 1 : 1 結合モデルで良好なフィットが達成された。このモデルは、単一のオンおよびオフ速度で異なる F G F に結合する固定化 S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 を有するチップの表面における 1 : 1 結合相互作用 : A + B = A B を説明する。2 : 1 モデルも、S F G F R 3 \_ D E L 4 - D 3 への F G F 結合の 1 : 1 相互作用を説明するが、複合体を安定化させる立体構造変化 : A + B = A B = A B \* も想定し、2 つのオンおよびオフ速度を表す。このモデルは

10

20

30

40

50

、立体構造的に変化した複合体（ $\text{F G F}$ に結合した $\text{S F G F R 3\_D E L 4 - D 3}$ ）が、立体構造変化を逆転させることによってのみ解離し得ることを想定する。2:1モデルを極めて十分にフィットさせるように $\text{h F G F 1}$ 、 $\text{h F G F 9}$ 、 $\text{h F G F 19}$ 、および $\text{h F G F 21}$ についての実験データを測定し、したがって、 $\text{h F G F 1}$ 、 $\text{h F G F 9}$ 、 $\text{h F G F 19}$ 、および $\text{h F G F 21}$ についての $K_d$ をその2:1モデルから導いた。

#### 【0165】

$\text{h F G F 1}$ 、 $\text{h F G F 9}$ 、 $\text{h F G F 19}$ 、および $\text{h F G F 21}$ が全て低いnM範囲の $K_d$ を有するにもかかわらず、それらの $\text{h F G F}$ のカイネティックプロファイルは有意に異なった。例えば、 $\text{F G F 1}$ は、極めて速いオン速度およびオフ速度で $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ に結合する一方、 $\text{F G F 2}$ は、 $\text{F G F 1}$ と同一の速さのオン速度またはオフ速度で $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ に結合せず、 $\text{F G F 1}$ と比較して $\text{F G F 2}$ についての全体的に小さい $K_d$ をもたらす（表8）。有意に低い親和性が、傍分泌 $\text{h F G F}$ に対して $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ と、内分泌 $\text{F G F 15 / F G F 19}$ サブファミリーのメンバーである $\text{h F G F 19}$ または $\text{h F G F 21}$ との間で計測された（表8ならびに図19Dおよび19E）。 $\text{F G F 15 / F G F 19}$ サブファミリーは、補因子としてプロテオグリカンに代えて $\text{Klotho}$ を使用し、代謝パラメータ、例えば、リン酸塩、胆汁酸、炭水化物、および脂質代謝の全身調節に重要な内分泌作用成長因子に進化した。

10

#### 【0166】

これらの結果は、 $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ と、 $\text{h F G F 1}$ 、 $\text{h F G F 2}$ 、 $\text{h F G F 9}$ 、および $\text{h F G F 18}$ との間の高い親和性相互作用が存在した一方、 $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ と、 $\text{F G F 19}$ および $\text{F G F 21}$ との間の低い親和性相互作用が存在したことを実証する。 $\text{F G F 19}$ および $\text{F G F 21}$ についての $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ の低い親和性は、有利である。それというのも、 $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ は、インピボでそれらの $\text{F G F}$ の機能を干渉する低い確率を有するためである。

20

#### 【0167】

実施例24： $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ のインピトロ増殖アッセイ

$\text{F G F}$ の結合後、 $\text{F G F R 3}$ は二量体化してシグナリングカスケードを開始する。いくつかの下流シグナリング経路が $\text{F G F}$ シグナリングに関連する。軟骨細胞において、二量体化 $\text{F G F R 3}$ は、軟骨細胞への抗増殖シグナル／早期分化シグナルをもたらし、それが最終的に骨成長の阻害をもたらす。例えば、 $\text{R A S / M A P K}$ 経路は、増殖、最終分化、および有糸分裂後マトリックス合成に負の影響を与えるためのシグナルを伝播し、 $\text{S T A T 1}$ 経路は、細胞周期調節因子 $\text{p 107}$ および $130$ ならびに細胞周期阻害因子 $\text{p 21Waf / Cip 1}$ と協調して軟骨細胞増殖の阻害を媒介する。遺伝子発現試験は、多数の他の経路も成長促進分子の下方調節または抗増殖機能の誘導に関与することを示唆する。

30

#### 【0168】

軟骨細胞モデルにおける $\text{F G F R 3 G 380R}$ の $\text{F G F R 3}$ デコイ誘導阻害を試験するため、 $\text{F G F R 3 a c h}$ 突然変異を過剰発現するように遺伝子改変された $\text{A T D C 5}$ 細胞（ $\text{A T D C 5 F G F R 3 G 380R}$ 細胞）の増殖に対する $\text{s F G F R 3\_D e 1 4 - D 3}$ の効果を測定するための試験を実施した。軟骨細胞系 $\text{A T D C 5}$ 細胞は、最初に分化奇形癌幹細胞系 $\text{A T 805}$ から単離され、一般に、インピトロ軟骨細胞研究用モデルとして使用される。 $\text{A T D C 5}$ 細胞は、最初にレトロウイルス発現ベクターにより感染され、 $\text{F G F R 3 G 380R}$ を発現する安定細胞系が生成された。 $\text{A T D C 5}$ 細胞系中の $\text{F G F R 3 G 380R}$ の発現をウエスタンプロットを介して測定した（図20）。耐性細胞選択後の第1継代（ $\text{G 380R} \# 1$ ）および第2継代（ $\text{G 380R} \# 2$ ）における $\text{F G F R 3 G 380R}$ を発現する $\text{A T D C 5}$ 細胞の抽出物ならびに対照 $\text{A T D C 5}$ 細胞の抽出物をプロットし、 $\text{F G F R 3}$ の総リン酸化（ $\text{p F G F R 3}$ ）、 $\text{F G F R 3}$ 中の規定のホスホチロシン $724$ （ $\text{p F G F R 3 Y 724}$ ）、および総 $\text{F G F R 3}$ 発現（ $\text{F G F R 3}$ ）について抗体により検出した。総細胞外シグナル関連キナーゼ発現をローディング対照（ $\text{E R K}$ ）として使用した。 $\text{A T D C 5 F G F R 3 G 380R}$ 細胞への $\text{S F G F R 3\_D E L 4 - D 3}$ の添加は、 $\text{A T D C 5 F G F R 3 G 380R}$ 細胞の増殖指数を2倍だけ用量依存的

40

50

に増加させ、E C 5 0 は 1 . 2 5 + / - 0 . 2 7 n M であった(図21)。これらの結果は、A T D C 5 F G F R 3 G 3 8 0 R 細胞への S F G F R 3 - D E L 4 - D 3 の添加が軟骨無形成症の細胞モデルにおいて F G F R 3 G 3 8 0 R により媒介される負の成長シグナルを克服し、軟骨細胞中で F G F R 3 により媒介される抗増殖シグナルと一致し、それは、軟骨細胞が G 3 8 0 R 突然変異を含む F G F R 3 を発現する場合により傑出していることを実証する。

## 【0169】

本発明の実施形態を、以下、さらに記載する：

## [項1]

配列番号32のアミノ酸残基23～357と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチド配列を含む可溶性線維芽細胞成長因子受容体3(s F G F R 3)ポリペプチドであって、F G F R 3のシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインを欠き、(i)500アミノ酸長未満であるか；(ii)200以下の連続アミノ酸のF G F R 3の細胞内ドメインを含むか；または(iii)F G F R 3のチロシンキナーゼドメインを欠く、ポリペプチド。

10

## [項2]

475、450、425、400、375、または350アミノ酸長未満である、上記項1に記載のポリペプチド。

## [項3]

175、150、125、100、75、50、40、30、20、15以下の連続アミノ酸のF G F R 3の細胞内ドメインを含む、上記項1に記載のポリペプチド。

20

## [項4]

配列番号32のアミノ酸残基423～435と少なくとも90%、92%、95%、97%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をさらに含む、上記項1から3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## [項5]

配列番号32のアミノ酸残基423～435をさらに含む、上記項1から3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## [項6]

配列番号32のアミノ酸残基23～357と少なくとも92%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記項1から5のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

## [項7]

配列番号33と少なくとも92%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記項1から5のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## [項8]

配列番号33を含む、またはそれからなる、上記項1から5のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## [項9]

配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む可溶性線維芽細胞成長因子受容体3(s F G F R 3)ポリペプチドであって、配列番号1の253位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換をさらに含む、ポリペプチド。

40

## [項10]

前記253位におけるシステイン残基が、セリン残基により置換されている、上記項9に記載のポリペプチド。

## [項11]

アミノ酸配列と少なくとも87%、90%、92%、95%、97%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記項9または10に記載のポリペプチド。

## [項12]

配列番号2のアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、上記項9から11のいずれか一

50

項に記載のポリペプチド。

[ 項 1 3 ]

単離 s F G F R 3 ポリペプチドである、上記項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 1 4 ]

線維芽細胞成長因子 1 ( F G F 1 )、線維芽細胞成長因子 2 ( F G F 2 )、線維芽細胞成長因子 9 ( F G F 9 )、線維芽細胞成長因子 18 ( F G F 18 )、線維芽細胞成長因子 19 ( F G F 19 ) または 線維芽細胞成長因子 21 ( F G F 21 ) に結合する、上記項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 1 5 ]

前記結合が、約 0 . 2 nM ~ 約 2 0 nM の平衡解離定数 ( K<sub>d</sub> ) により特徴付けられる、上記項 1 4 に記載のポリペプチド。

[ 項 1 6 ]

前記結合が、約 1 nM ~ 約 1 0 nM の K<sub>d</sub> により特徴付けられ、場合により、前記 K<sub>d</sub> が、約 1 nM、約 2 nM、約 3 nM、約 4 nM、約 5 nM、約 6 nM、約 7 nM、約 8 nM、約 9 nM、または約 1 0 nM である、上記項 1 5 に記載のポリペプチド。

[ 項 1 7 ]

配列番号 2 0 、 2 1 、 3 6 または 3 7 の核酸配列と少なくとも 8 5 % 、 8 7 % 、 9 0 % 、 9 2 % 、 9 5 % 、 9 7 % または 9 9 % の配列同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる、上記項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 1 8 ]

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2 0 、 2 1 、 3 6 または 3 7 の核酸配列を含む、またはそれからなる、上記項 1 7 に記載のポリペプチド。

[ 項 1 9 ]

前記ポリヌクレオチドが単離ポリヌクレオチドである、上記項 1 7 または 1 8 に記載のポリペプチド。

[ 項 2 0 ]

上記項 1 7 から 1 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[ 項 2 1 ]

プラスミド、人工染色体、ウイルスベクター、およびファージベクターからなる群より選択される、上記項 2 0 に記載のベクター。

[ 項 2 2 ]

単離ポリヌクレオチドである、上記項 2 1 に記載のベクター。

[ 項 2 3 ]

上記項 1 7 から 1 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは上記項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載のベクターを含む、宿主細胞。

[ 項 2 4 ]

単離宿主細胞である、上記項 2 3 に記載の宿主細胞。

[ 項 2 5 ]

H E K 2 9 3 細胞または C H O 細胞である、上記項 2 3 または 2 4 に記載の宿主細胞。

[ 項 2 6 ]

上記項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド、上記項 1 7 から 1 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、上記項 2 0 から 2 2 のいずれか一項に記載のベクター、または上記項 2 3 から 2 5 のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、組成物。

[ 項 2 7 ]

薬学的に許容可能な賦形剤、担体または希釈剤をさらに含む、上記項 2 6 に記載の組成物。

[ 項 2 8 ]

約 0 . 0 0 2 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量における投与のために配合される、上記項 2 6 または 2 7 に記載の組成物。

[ 項 2 9 ]

10

20

30

40

50

約 0.001 mg / kg ~ 約 10 mg / kg の用量における投与のために配合される、上記項 28 に記載の組成物。

[ 項 30 ]

1 日 1 回、週 1 回、または月 1 回の投与のために配合される、上記項 26 から 29 のいずれか一項に記載の組成物。

[ 項 31 ]

週 7 回、週 6 回、週 5 回、週 4 回、週 3 回、週 2 回、週 1 回、2 週間に 1 回、または月 1 回の投与のために配合される、上記項 26 から 30 のいずれか一項に記載の組成物。

[ 項 32 ]

約 2.5 mg / kg ~ 約 10 mg / kg の用量における週 1 回または週 2 回の投与のために配合される、上記項 31 に記載の組成物。 10

[ 項 33 ]

非経口投与、腸内投与または局所投与のために配合される、上記項 26 から 32 のいずれか一項に記載の組成物。

[ 項 34 ]

皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、髄腔内投与または腹腔内投与のために配合される、上記項 33 に記載の組成物。

[ 項 35 ]

皮下投与のために配合される、上記項 34 に記載の組成物。

[ 項 36 ]

上記項 26 から 35 のいずれか一項に記載の組成物を含む、医薬品。 20

[ 項 37 ]

患者における骨格成長遅滞障害を治療する方法であって、上記項 1 から 16 のいずれか一項に記載のポリペプチド、上記項 17 から 19 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、上記項 20 から 22 のいずれか一項に記載のベクター、上記項 23 から 25 のいずれか一項に記載の宿主細胞、上記項 26 から 35 のいずれか一項に記載の組成物、または上記項 36 に記載の医薬品を投与することを含む、方法。

[ 項 38 ]

骨格成長遅滞障害を有する患者において組織にポリペプチドを送達する方法であって、該患者に有効量の上記項 1 から 16 のいずれか一項に記載のポリペプチド、上記項 17 から 19 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、上記項 20 から 22 のいずれか一項に記載のベクター、上記項 23 から 25 のいずれか一項に記載の宿主細胞、上記項 26 から 35 のいずれか一項に記載の組成物、または上記項 36 に記載の医薬品を投与することを含む、方法。 30

[ 項 39 ]

前記組織が骨格組織である、上記項 38 に記載の方法。

[ 項 40 ]

前記骨格成長遅滞障害が、FGFR3 関連骨格疾患である、上記項 37 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 41 ]

前記 FGFR3 関連骨格疾患が、軟骨無形成症、タナトフォリック骨異形成症 I 型 (T D I )、タナトフォリック骨異形成症 I I 型 (T D I I )、発育遅延および黒色表皮症を伴う重度の軟骨無形成症 (S ADD A N )、軟骨低形成症、頭蓋骨縫合早期癒合症候群、ならびに屈指・高身長・難聴症候群 (C A T S H L ) からなる群より選択される、上記項 40 に記載の方法。 40

[ 項 42 ]

前記骨格成長遅滞障害が、軟骨無形成症である、上記項 41 に記載の方法。

[ 項 43 ]

前記頭蓋骨縫合早期癒合症候群が、M u e n k e 症候群、クルーゾン症候群、およびクルーゾン皮膚骨格症候群からなる群より選択される、上記項 41 に記載の方法。 50

## [ 項 4 4 ]

前記 F G F R 3 関連骨格疾患が、前記患者における構成的に活性な F G F R 3 の発現により引き起こされる、上記項 4 0 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 4 5 ]

前記構成的に活性な F G F R 3 が、配列番号 5 の 3 8 0 位のアミノ酸におけるアルギニン残基によるグリシン残基の置換を含む、上記項 4 4 に記載の方法。

## [ 項 4 6 ]

前記患者が、骨格成長遅滞障害と診断されている、上記項 3 7 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 4 7 ]

前記患者が、四肢短縮、短い胴体、O 脚、動搖性歩行、頭蓋異形、クローバー葉頭蓋、頭蓋骨縫合早期癒合症、ウォルム骨、手の奇形、足の奇形、ヒッチハイカーの親指、および胸部奇形からなる群より選択される前記骨格成長遅滞障害の 1 つ以上の症状を呈する、上記項 3 7 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

## [ 項 4 8 ]

前記患者が、前記ポリペプチドの投与後に前記骨格成長遅滞障害の 1 つ以上の症状の改善を呈する、上記項 4 7 に記載の方法。

## [ 項 4 9 ]

前記患者が、ポリペプチドを予め投与されていない、上記項 3 7 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

## [ 項 5 0 ]

前記患者が、幼児、小児、若年者および成人からなる群より選択される、上記項 3 7 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 5 1 ]

前記患者がヒトである、上記項 3 7 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 5 2 ]

前記ポリペプチドを、患者に約 0 . 0 0 2 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量で投与する、上記項 3 7 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 5 3 ]

前記ポリペプチドを、患者に約 0 . 0 0 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の用量で投与する、上記項 5 2 に記載の方法。

30

## [ 項 5 4 ]

前記ポリペプチドを、患者に 1 日 1 回以上、週 1 回以上、月 1 回以上、または年 1 回以上投与する、上記項 3 7 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 5 5 ]

前記ポリペプチドを、患者に週 7 回、週 6 回、週 5 回、週 4 回、週 3 回、週 2 回、週 1 回、2 週間に 1 回、または月 1 回投与する、上記項 3 7 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 5 6 ]

前記ポリペプチドを、患者に約 0 . 2 5 m g / k g ~ 約 2 0 m g / k g の用量で、少なくとも約週 1 回または 2 回以上投与する、上記項 5 5 に記載の方法。

40

## [ 項 5 7 ]

前記ポリペプチドを、患者に約 2 . 5 m g / k g または約 1 0 m g / k g の用量で、週 1 回または 2 回投与する、上記項 5 6 に記載の方法。

## [ 項 5 8 ]

前記ポリペプチドを、患者に薬学的に許容可能な賦形剤、担体または希釈剤を含む組成物中で投与する、上記項 3 7 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 5 9 ]

前記組成物を、患者に皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内または腹腔内投与する、上記項 5 8 に記載の方法。

50

## [ 項 6 0 ]

前記組成物を、患者に皮下注射により投与する、上記項 5 9 に記載の方法。

## [ 項 6 1 ]

前記ポリペプチドが、約 2 時間～約 2 5 時間のインビボ半減期を有する、上記項 5 9 または 6 0 に記載の方法。

## [ 項 6 2 ]

前記ポリペプチドの投与が、患者の生存率を増加させる、上記項 3 7 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 6 3 ]

前記ポリペプチドの投与が、患者のロコモーションを改善する、上記項 3 7 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

## [ 項 6 4 ]

前記ポリペプチドの投与が、患者における腹式呼吸を改善する、上記項 3 7 から 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 6 5 ]

前記ポリペプチドの投与が、患者の体長および／または骨長を増加させる、上記項 3 7 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

## [ 項 6 6 ]

前記ポリペプチドの投与が、患者における頭蓋比を改善し、および／または大後頭孔形状を回復させる、上記項 3 7 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 6 7 ]

前記ポリペプチドの発現を生じさせるために好適な条件下で培養培地中で上記項 2 3 から 2 5 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し、前記培養培地から前記ポリペプチドを回収することを含む、上記項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチドの產生方法。

## [ 項 6 8 ]

前記回収がクロマトグラフィーを含む、上記項 6 7 に記載の方法。

## [ 項 6 9 ]

前記クロマトグラフィーが、親和性クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーを含む、上記項 6 8 に記載の方法。

30

## [ 項 7 0 ]

前記親和性クロマトグラフィーが、イオン交換クロマトグラフィーまたは抗 F L A G クロマトグラフィーを含む、上記項 6 9 に記載の方法。

## [ 項 7 1 ]

前記抗 F L A G クロマトグラフィーが、免疫沈降を含む、上記項 7 0 に記載の方法。

## [ 項 7 2 ]

患者における骨格成長遅滞障害を治療するための、上記項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## [ 項 7 3 ]

前記骨格成長遅滞障害が、F G F R 3 関連骨格疾患である、上記項 7 2 に記載のポリペプチド。

40

## [ 項 7 4 ]

前記 F G F R 3 関連骨格疾患が、軟骨無形成症、T D I 、T D I I 、S A D D A N 、軟骨低形成症、頭蓋骨縫合早期癒合症候群および C A T S H L からなる群より選択される、上記項 7 3 に記載のポリペプチド。

## [ 項 7 5 ]

前記 F G F R 3 関連骨格疾患が、軟骨無形成症である、上記項 7 4 に記載のポリペプチド。

## [ 項 7 6 ]

前記頭蓋骨縫合早期癒合症候群が、M u e n k e 症候群、クルーゾン症候群およびクルーゾン皮膚骨格症候群からなる群より選択される、上記項 7 5 に記載のポリペプチド。

## [ 項 7 7 ]

50

前記 F G F R 3 関連骨格疾患が、構成的に活性な F G F R 3 の前記患者における発現により引き起こされる、上記項 7 3 ~ 7 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 7 8 ]

前記構成的に活性な F G F R 3 が、配列番号 5 の 3 8 0 位のアミノ酸におけるアルギニン残基によるグリシン残基の置換を含む、上記項 7 7 に記載のポリペプチド。

[ 項 7 9 ]

前記患者が、前記骨格成長遅滞障害と診断されている、上記項 7 2 から 7 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 8 0 ]

前記患者が、四肢短縮、短い胴体、O 脚、動搖性歩行、頭蓋異形、クローバー葉頭蓋、頭蓋骨縫合早期癒合症、ウォルム骨、手の奇形、足の奇形、ヒッチハイカーの親指、および胸部奇形からなる群より選択される前記骨格成長遅滞障害の 1 つ以上の症状を呈する、上記項 7 2 から 7 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

[ 項 8 1 ]

前記患者が、前記 s F G F R 3 ポリペプチドの投与後に前記骨格成長遅滞障害の 1 つ以上の症状の改善を呈する、上記項 8 0 に記載のポリペプチド。

[ 項 8 2 ]

前記患者が、前記ポリペプチドを予め投与されていない、上記項 7 2 から 8 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 8 3 ]

前記患者が、幼児、小児、若年者および成人からなる群より選択される、上記項 7 2 から 8 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

20

[ 項 8 4 ]

前記患者がヒトである、上記項 7 2 から 8 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 8 5 ]

前記患者に約 0 . 0 0 2 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量で投与される、上記項 7 2 から 8 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 8 6 ]

前記患者に約 0 . 0 0 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の用量で投与される、上記項 8 5 に記載のポリペプチド。

30

[ 項 8 7 ]

前記患者に 1 日 1 回以上、週 1 回以上、月 1 回以上、または年 1 回以上投与される、上記項 7 2 から 8 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 8 8 ]

前記患者に週 7 回、週 6 回、週 5 回、週 4 回、週 3 回、週 2 回、週 1 回、2 週間に 1 回、または月 1 回投与される、上記項 7 2 から 8 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

[ 項 8 9 ]

前記患者に約 2 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の用量で、週 2 回投与される、上記項 8 8 に記載のポリペプチド。

[ 項 9 0 ]

前記患者に、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、または希釈剤を含む組成物中で投与される、上記項 7 2 から 8 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

40

[ 項 9 1 ]

前記組成物が、前記患者に非経口、腸内、または局所投与される、上記項 9 0 に記載のポリペプチド。

[ 項 9 2 ]

前記組成物が、前記患者に皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、または腹腔内投与される、上記項 9 1 に記載のポリペプチド。

[ 項 9 3 ]

前記組成物が、前記患者に皮下注射により投与される、上記項 9 2 に記載のポリペプチド。

50

## [ 項 9 4 ]

線維芽細胞成長因子1 ( FGF1 ) 、線維芽細胞成長因子2 ( FGF2 ) 、線維芽細胞成長因子9 ( FGF9 ) 、線維芽細胞成長因子18 ( FGF18 ) 、線維芽細胞成長因子19 ( FGF19 ) 、または線維芽細胞成長因子21 ( FGF21 ) に結合する、上記項72から93のいずれか一項に記載のポリペプチド。

## [ 項 9 5 ]

FGFR3ポリペプチドからシグナルペプチド、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインの一部を欠失させることを含む、上記項1から8のいずれか一項に記載のポリペプチドを製造する方法。

## [ 項 9 6 ]

前記細胞内ドメインの前記一部が、配列番号32のアミノ酸残基436～806からなる、上記項95に記載の方法。

## [ 項 9 7 ]

配列番号1の253位におけるシステイン残基を除去するアミノ酸置換を導入することを含む、上記項9から12のいずれか一項に記載のポリペプチドを製造する方法。

## [ 項 9 8 ]

上記項1から16のいずれか一項に記載のポリペプチド、上記項17から19のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、上記項20から22のいずれか一項に記載のベクター、または上記項23から25のいずれか一項に記載の宿主細胞を含むキットであって、場合により、前記キットの使用説明書を含む、キット。

上記明細書に挙げられる全ての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により全体として組み込まれることが具体的および個別的に示されるのと同一の程度に参照して本明細書に組み込まれる。本発明の記載の方法、医薬組成物、およびキットの種々の改変および変形は、本発明の範囲および主旨から逸脱せずに当業者に明らかである。本発明を具体的な実施形態と関連付けて記載してきたが、それがさらに改変され得ることおよび特許請求される本発明がそのような具体的な実施形態に過度に限定されるべきでないことが理解される。実際、当業者に明らかな記載の本発明の実施方式の種々の改変は、本発明の範囲であるものとする。本出願は、一般に、本発明の原理に従って本発明の任意の変形、使用、または適合を包含し、本開示からのそのような逸脱は、本発明が属する分野内の公知の慣習的な実務の範囲内に収まるものとし、本明細書に上記の必須の特徴部に適用することができる。

## 【図面】

【図1A】

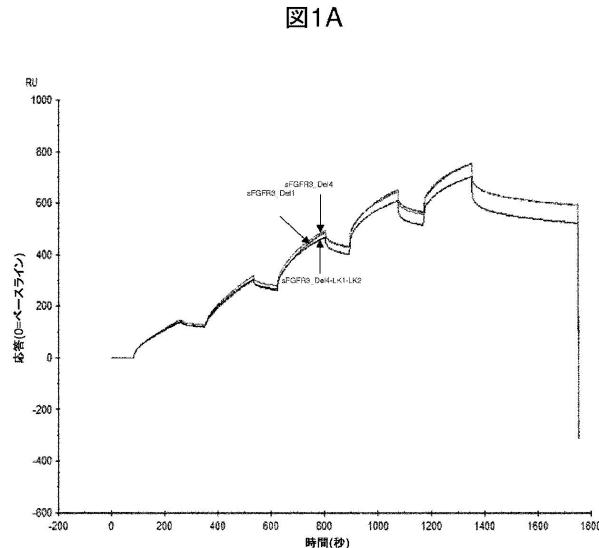


図1A

【図1B】

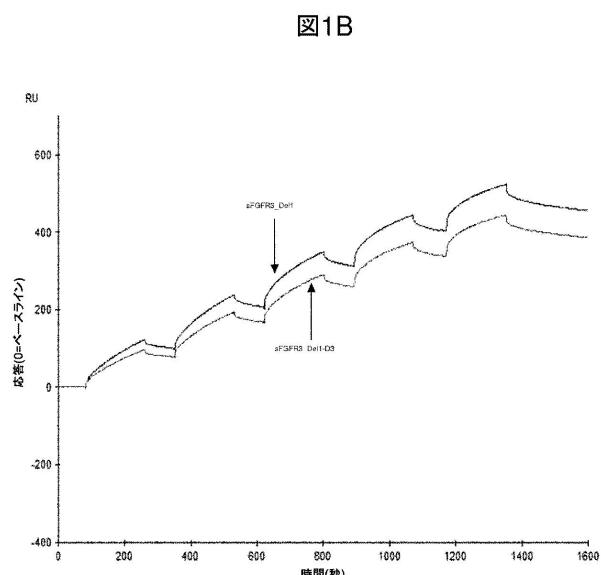


図1B

10

20

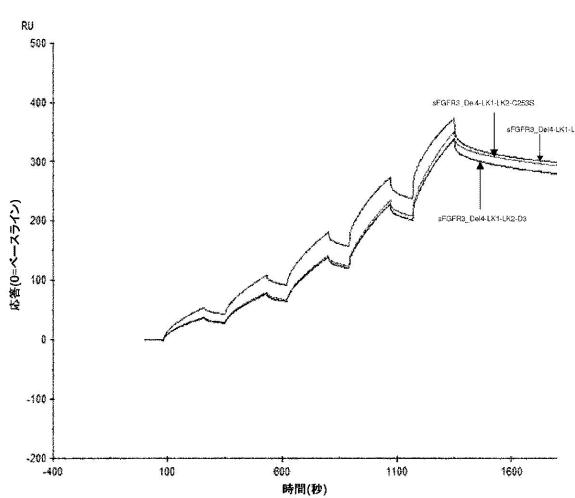
30

40

50

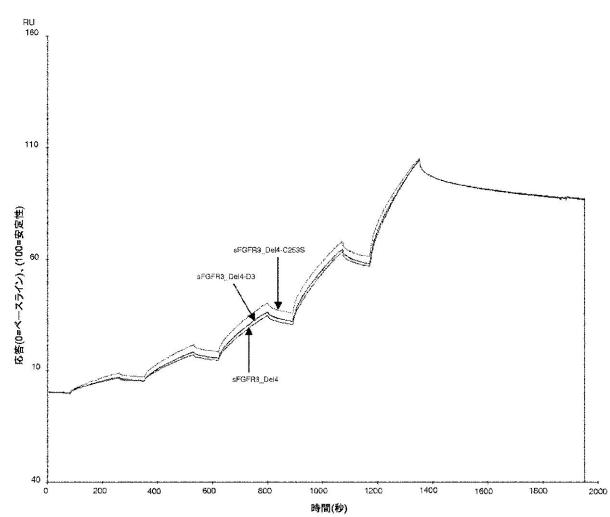
【図 1 C】

図1C



【図 1 D】

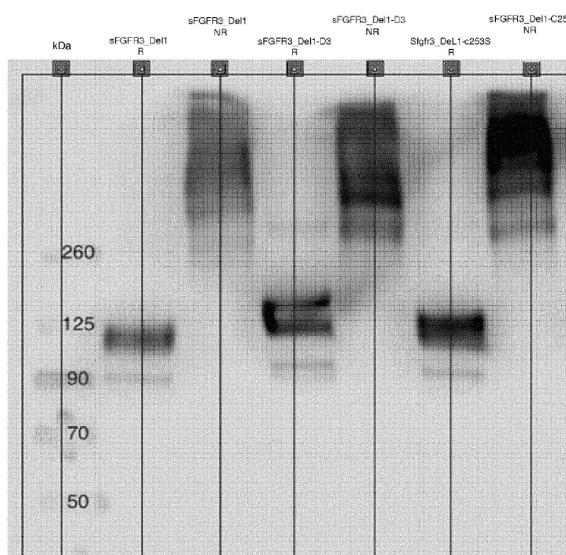
図1D



10

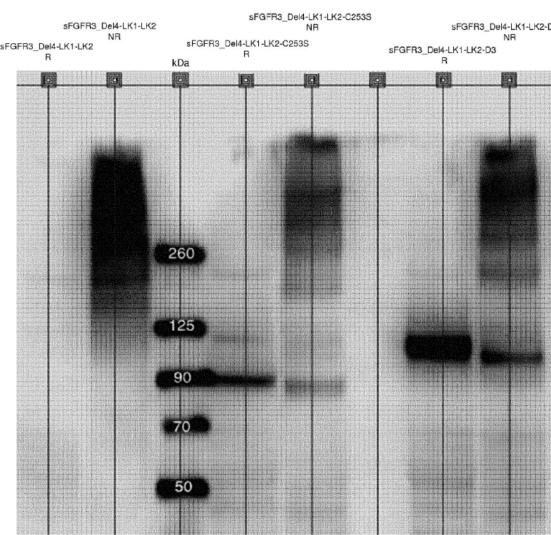
【図 2 A】

FIG. 2A



【図 2 B】

FIG. 2B



20

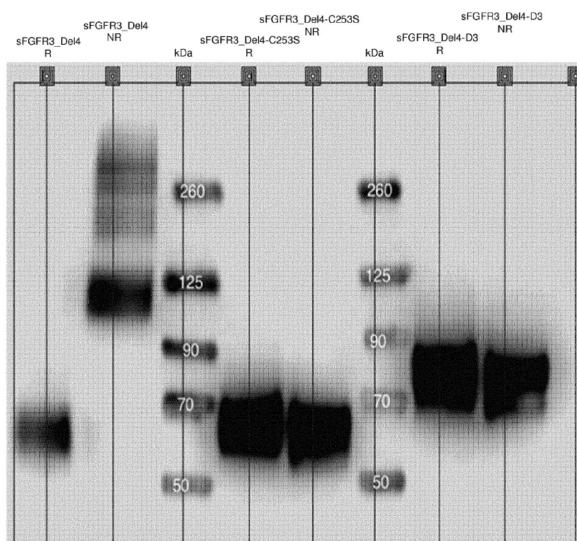
30

40

50

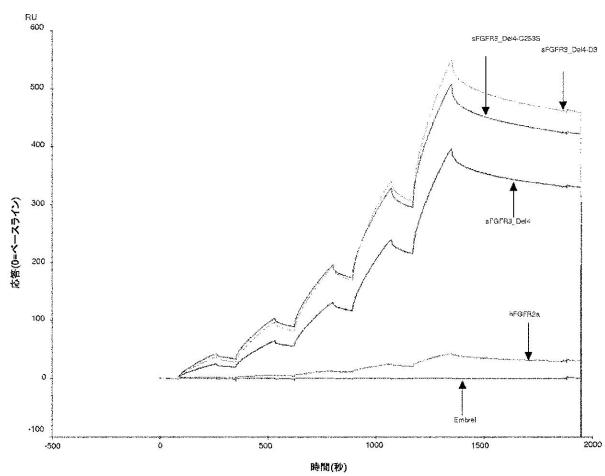
【図 2 C】

FIG. 2C



【図 3 A】

図3A



10

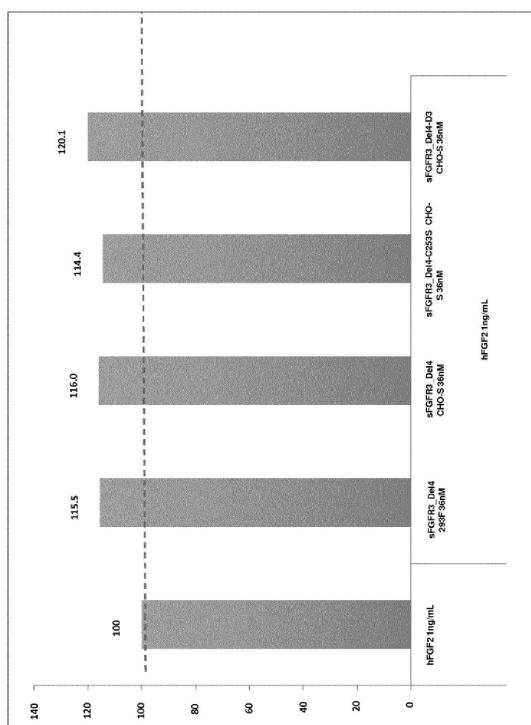
20

30

40

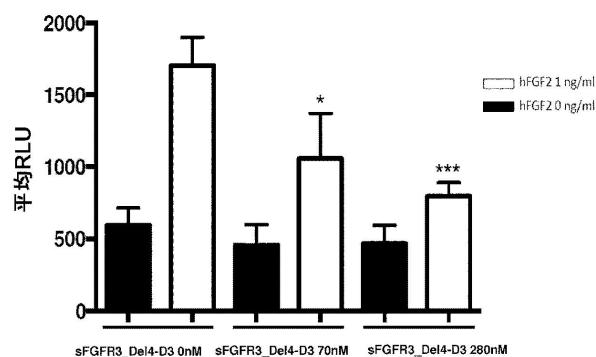
【図 3 B】

FIG. 3B



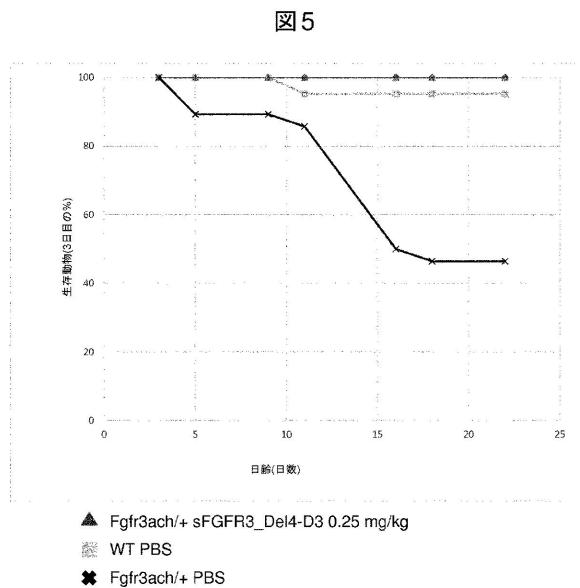
【図 4】

図4

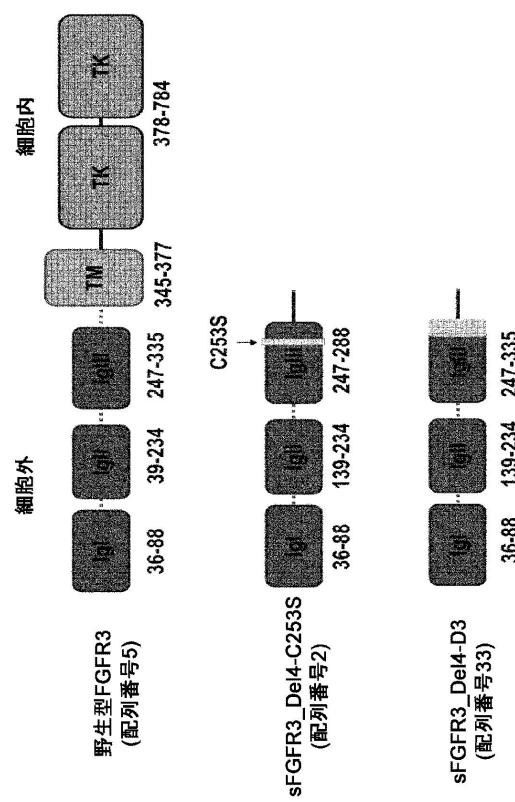


50

【図 5】

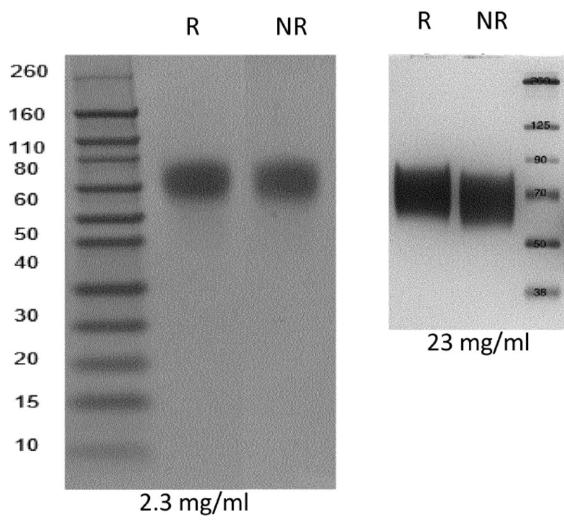


【図 6】



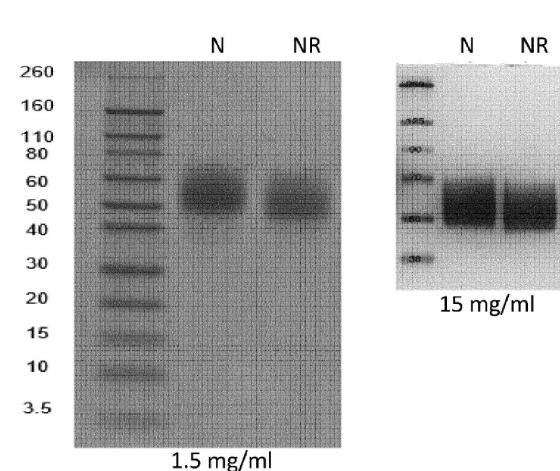
【図 7 A】

FIG. 7A



【図 7 B】

FIG. 7B



10

20

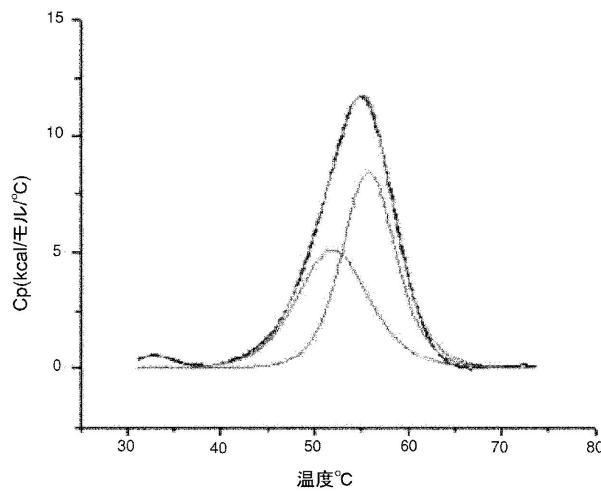
30

40

50

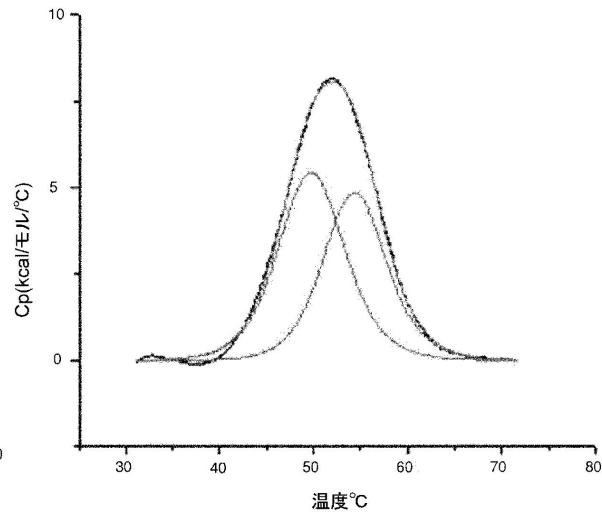
【図 8 A】

図8A



【図 8 B】

図8B

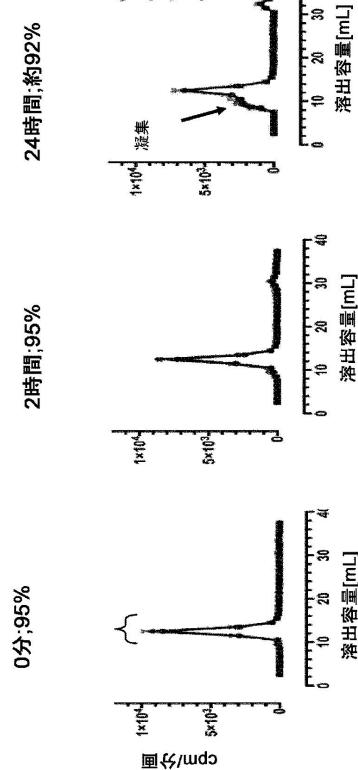


10

20

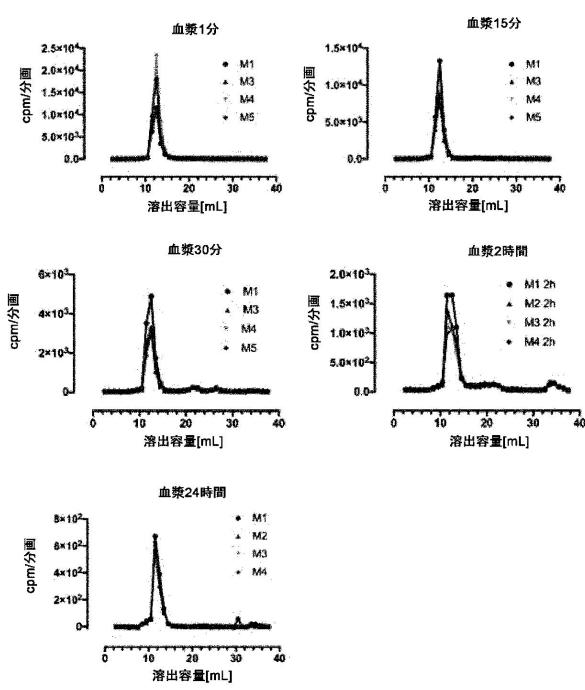
【図 9 A】

図9A



【図 9 B - 1】

図9B



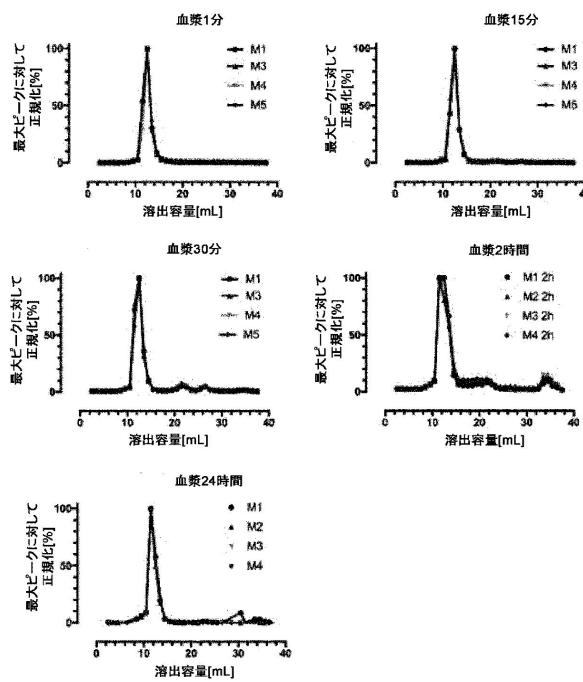
30

40

50

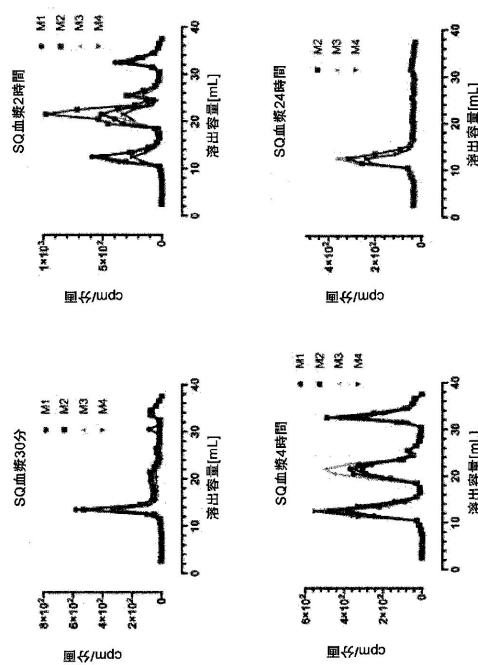
【図 9 B - 2】

図9B 続き



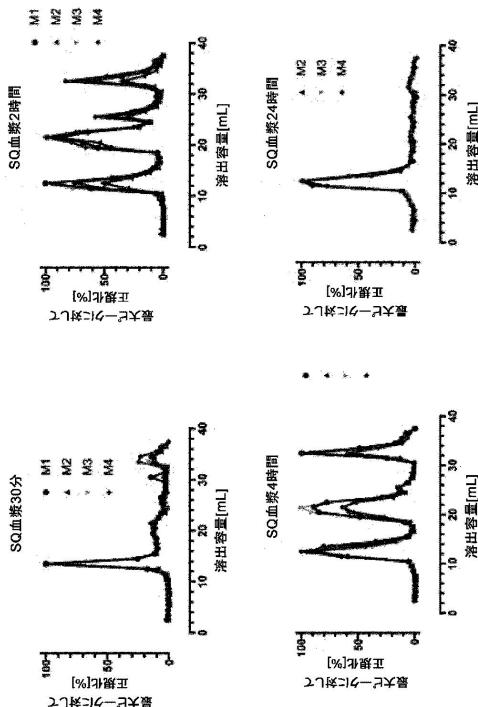
【図 9 C - 1】

図9C



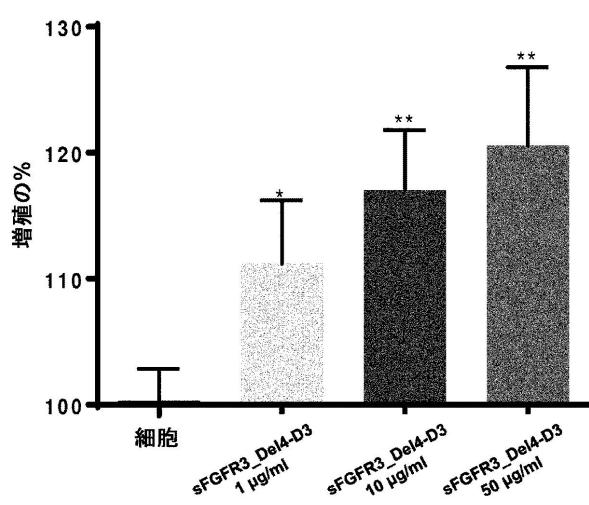
【図 9 C - 2】

図9C 続き



【図 10 A】

図10A



10

20

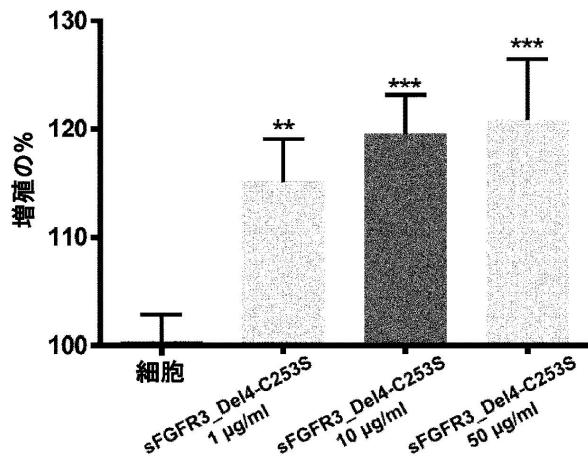
30

40

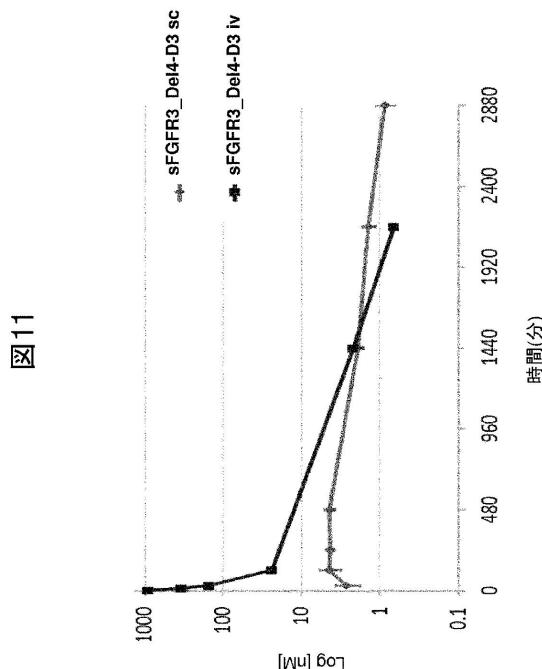
50

【図 10B】

図10B

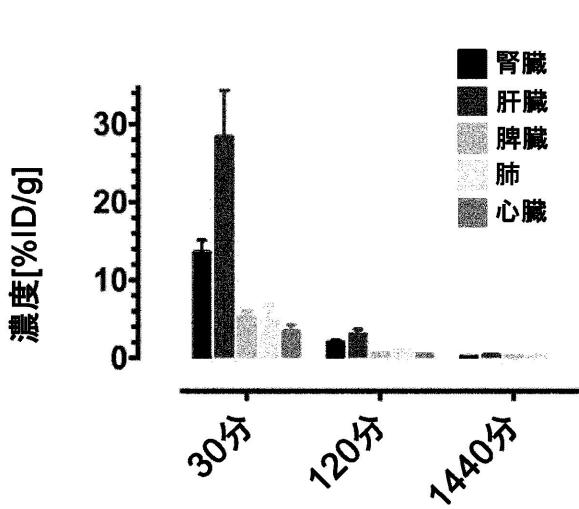


【図 11】



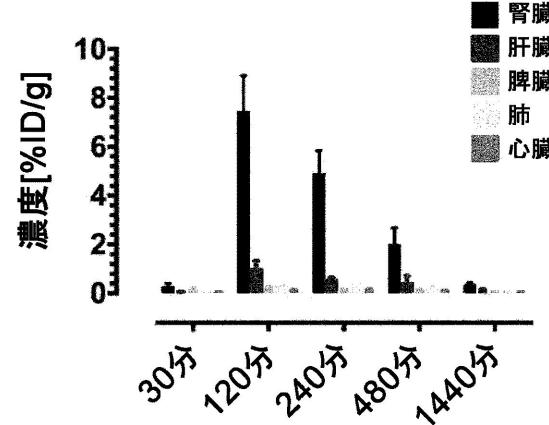
【図 12】

図12



【図 13】

図13



10

20

30

40

50

【図14A】

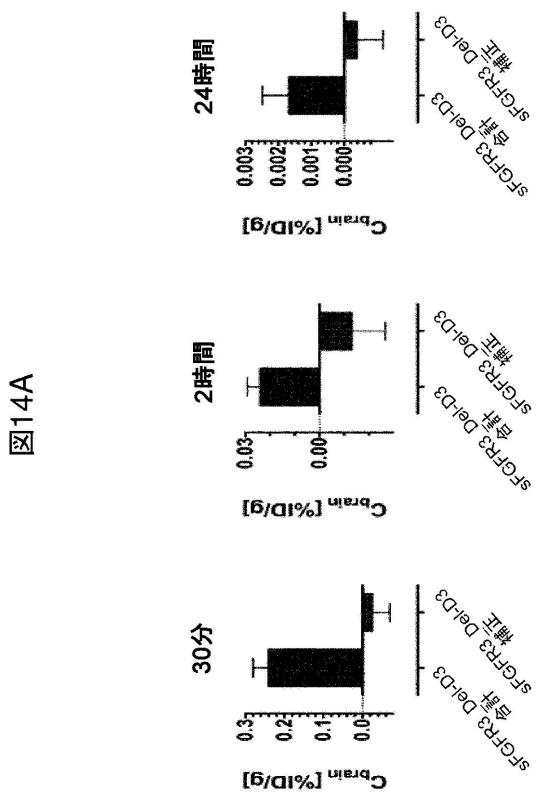


図14A

【図14B】

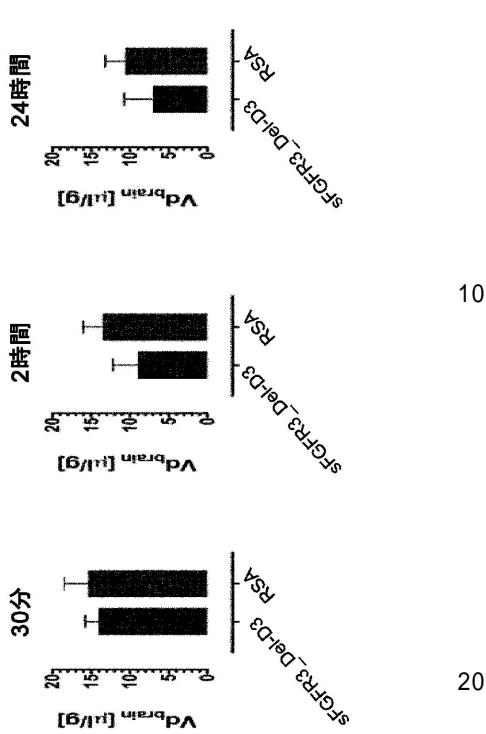


図14B

【図15】

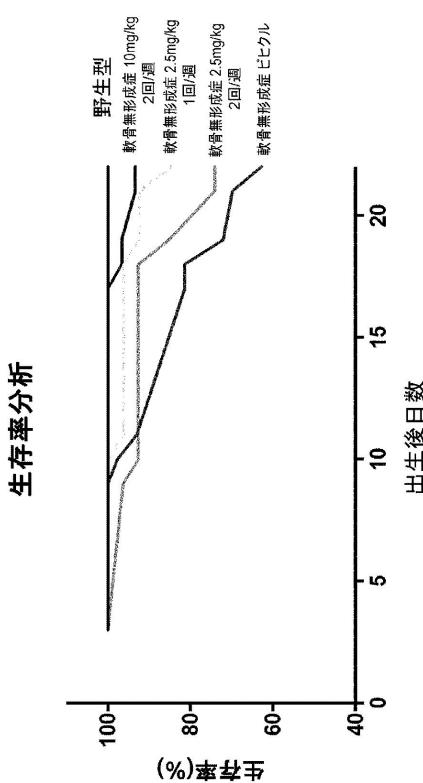


図15

【図16】

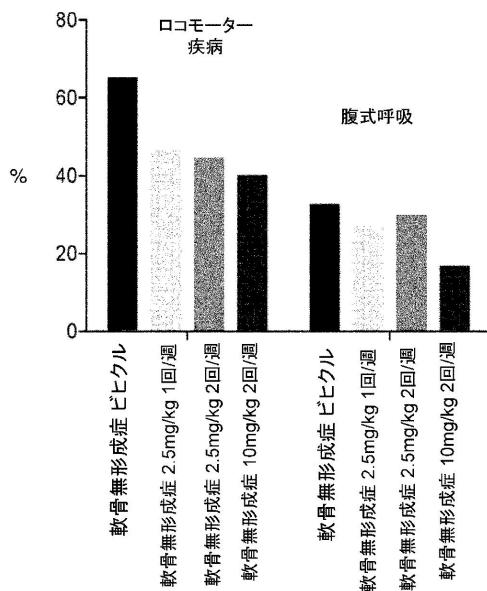
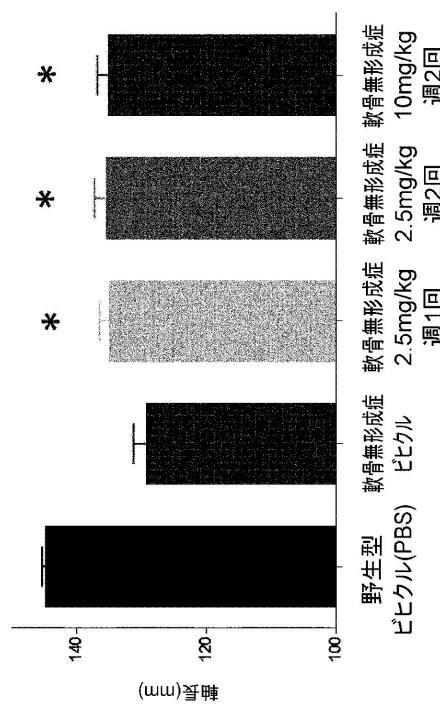


図16

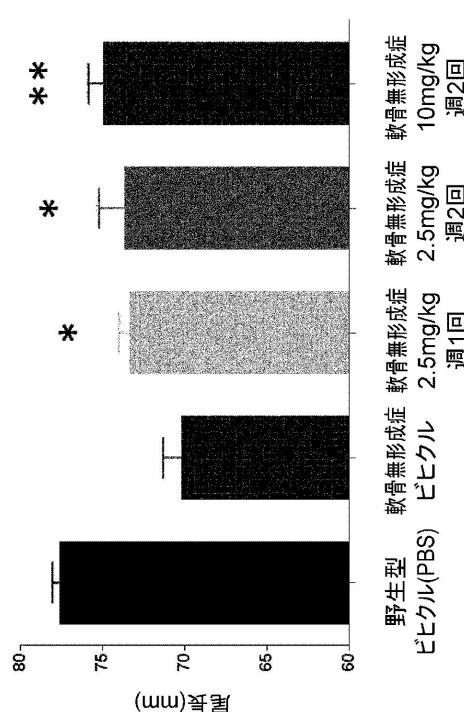
【図 17 A】

図17A



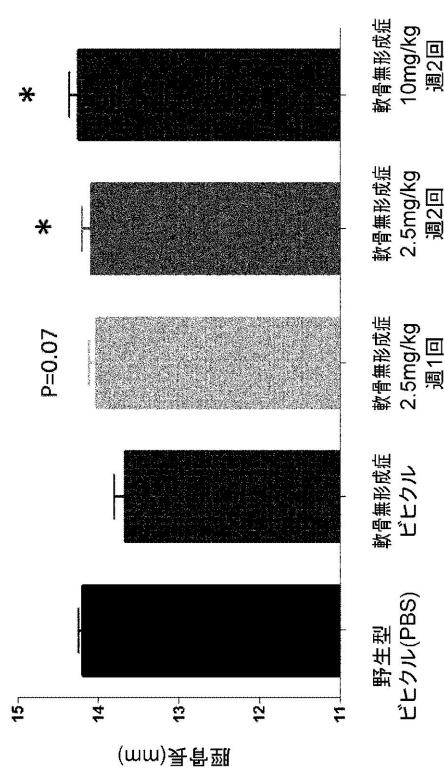
【図 17 B】

図17B



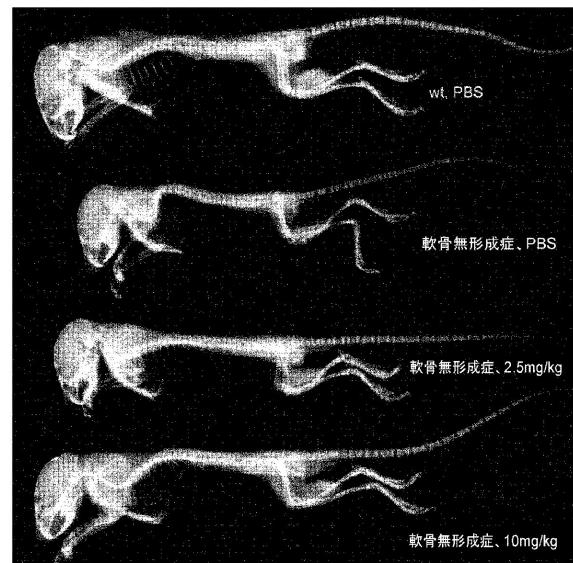
【図 17 C】

図17C



【図 17 D】

図17D



10

20

30

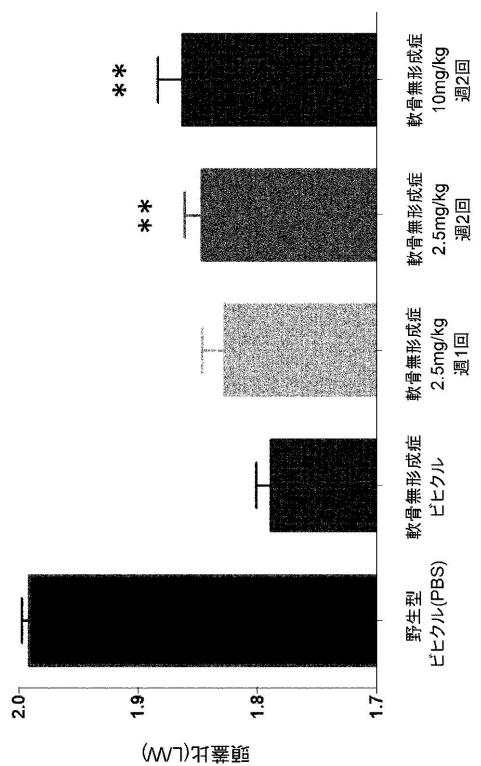
40

50

【図18A】

【図18B】

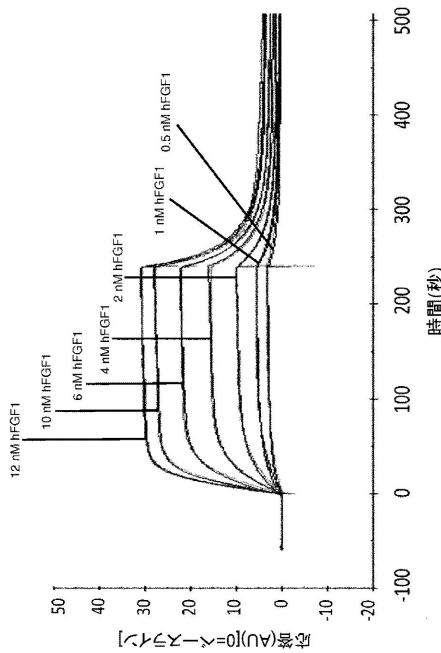
FIG. 18B



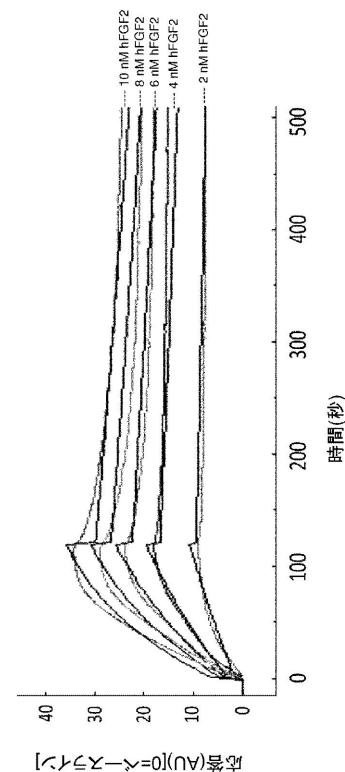
【図19A】

### 【図19B】

19A

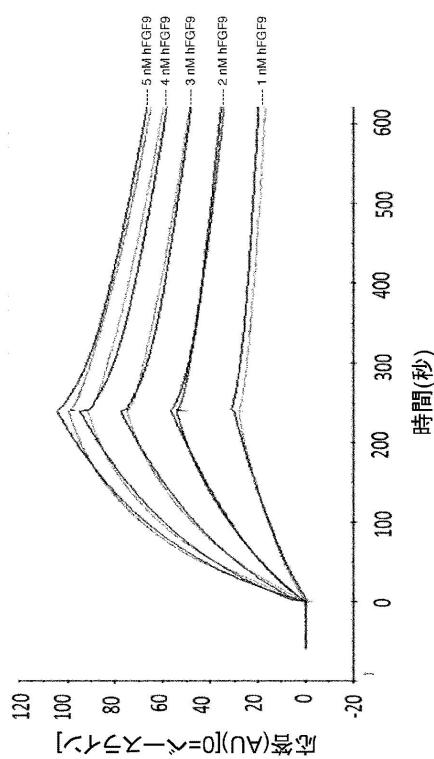


19B



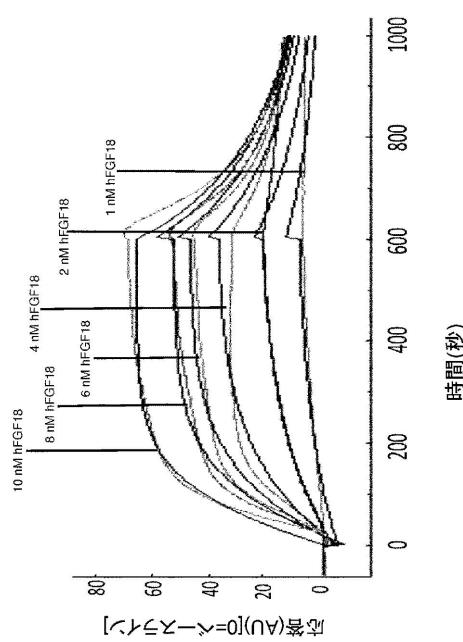
【図 19C】

図19C



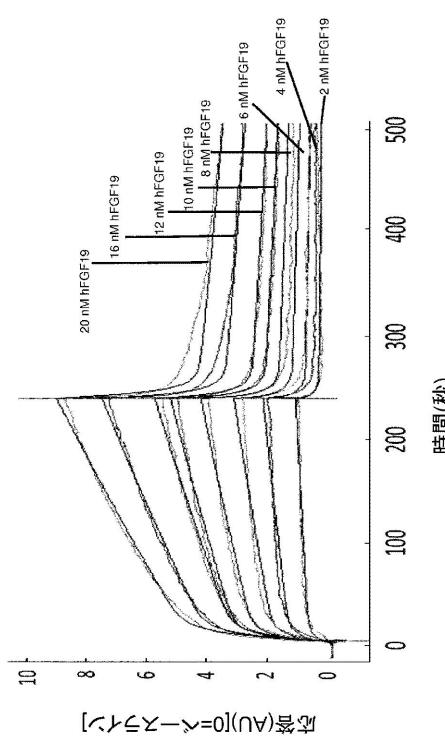
【図 19D】

図19D



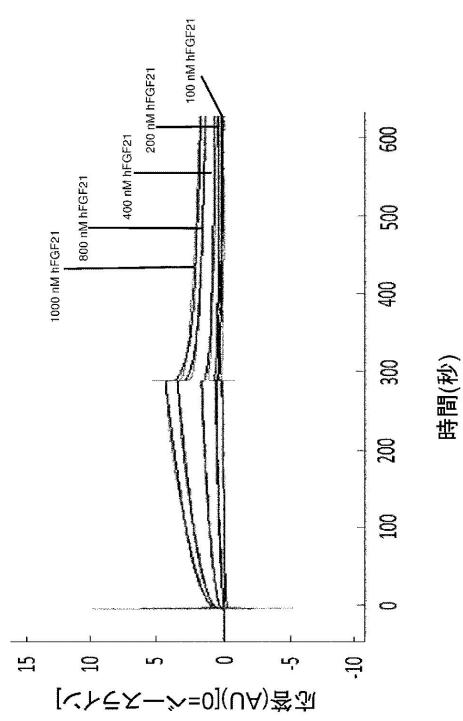
【図 19E】

図19E



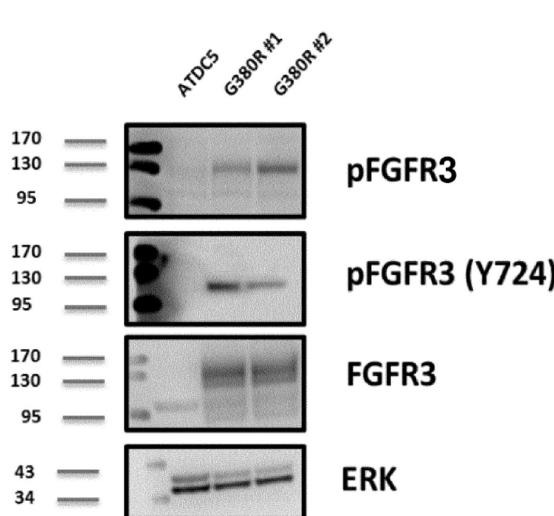
【図 19F】

図19F



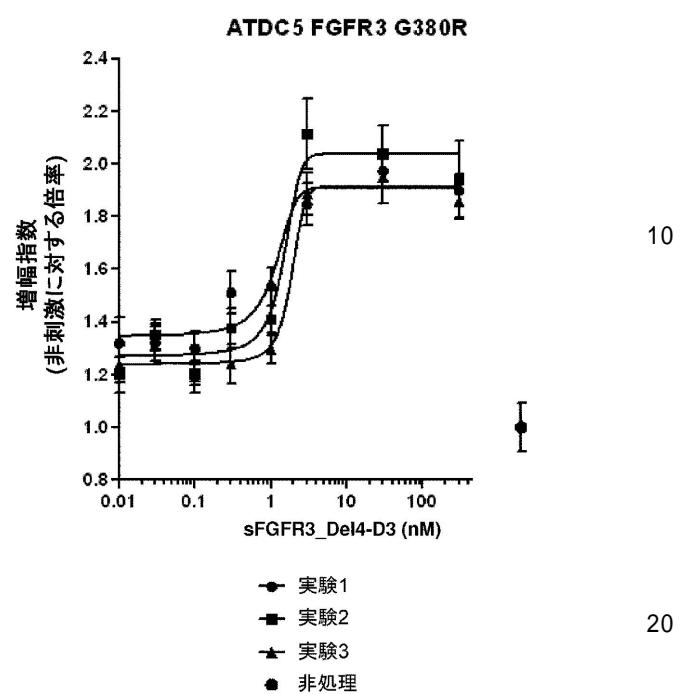
【図 2 0】

FIG. 20



【図 2 1】

図21



【配列表】

00070469030000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F	I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

2、アヴニュ・ヴァルローズ28番、グラン・シャトー

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100165892

弁理士 坂田 啓司

(72)発明者 エルヴィール・グーズ

フランス06620ヴァロリス、シュマン・デ・ダルブシェール420番

(72)発明者 ステファニー・ガルシア

フランス06200ニース、コルニッショ・フルーリー51番、イムーブル・アポジエ・ベ2

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表2011-529705(JP, A)

特表2016-506912(JP, A)

国際公開第2011/084711(WO, A2)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 0 7 K 14/00 - 14/825

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

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