

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-500373

(P2008-500373A)

(43) 公表日 平成20年1月10日(2008.1.10)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	Z N A 4 C 0 8 4
A61K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	D 4 C 0 8 5
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 C 0 8 6
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	Y 4 H 0 4 5
A61K 31/711 (2006.01)	A 61 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-515450 (P2007-515450)	(71) 出願人	506297005 アクセルロン ファーマ インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成17年5月27日 (2005.5.27)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月26日 (2006.12.26)		1 3 9, ケンブリッジ, エミリー ス
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/018928		トリート 2 4
(87) 國際公開番号	W02005/115439	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(87) 國際公開日	平成17年12月8日 (2005.12.8)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	60/575,062	(72) 発明者	クノッフ ジョン アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 カーライル ロビンス ドライブ 1 4 7
(32) 優先日	平成16年5月27日 (2004.5.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ケルベロス (Cerberus) / ココ (Coco) 誘導体およびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、ミオスタチン、ノダル (Nodal)、およびGDF-11に関連する疾患の治療において使用するための、ケルベロス (Cerberus)/ダン (Dan)/グレムリン (gremlin) ポリペプチドまたはその変種に関する。好ましいポリペプチドは、ココ (Coco) またはケルベロス誘導体である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ケルベロス(Cerberus)/ダン(Dan)/グレムリン(Gremlin)ポリペプチドまたはその変種のミオスタチン結合ドメインを含むミオスタチニアントゴニストタンパク質を含み、ミオスタチニアントゴニストタンパク質がノダル(nodal)および/またはミオスタチンの1つまたは複数に結合してこれを中和する薬学的調製物であって、ヒト治療薬または獣医治療薬として投与するのに適切であるように発熱物質を実質的に含まない薬学的調製物。

【請求項 2】

ミオスタチニアントゴニストタンパク質が筋組織の成長を促進する、請求項1記載の薬学的調製物。

10

【請求項 3】

ミオスタチン結合ドメインが、ケルベロス配列またはその変種配列、およびココ(Coco)配列またはその変種配列からなる群より選択される、請求項1記載の調製物。

【請求項 4】

ミオスタチニアントゴニストタンパク質が、対応する野生型ケルベロス/ダン/グレムリンポリペプチドと比較して、BMP-4を中和する能力が減少している、請求項1記載の調製物。

【請求項 5】

ミオスタチン結合ドメインが、以下を含む、野生型ケルベロスタンパク質のN末端切断誘導体であって、該誘導体がミオスタチン、GDF-11、および/またはノダルと結合するが、BMP-4とは実質的に結合しない、請求項4記載の調製物：

20

(a) ヒトケルベロスの106～119残基のいずれか1つに相当する位置から開始する配列；および

(b) ヒトケルベロスの240残基の後の任意の残基に相当する位置で終了する配列。

【請求項 6】

ミオスタチン結合ドメインが、高ストリンジエンシー条件下でヒトケルベロスまたはヒトココのコード配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、請求項1記載の調製物。

20

【請求項 7】

ミオスタチニアントゴニストタンパク質が、 $1\mu M$ 以下の K_d でミオスタチンと結合する、請求項1記載の調製物。

30

【請求項 8】

ミオスタチニアントゴニストタンパク質が、インビボ安定性、インビボ半減期、接取/投与、組織局在性もしくは分布、タンパク質複合体の形成、および/または精製の1つまたは複数を増強する1つのさらなるポリペプチド部分を含む融合タンパク質である、請求項3記載の調製物。

【請求項 9】

融合タンパク質が免疫グロブリンFcドメインを含む、請求項8記載の調製物

【請求項 10】

融合タンパク質が、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジン配列、およびGST融合物から選択される精製サブ配列を含む、請求項8記載の調製物。

40

【請求項 11】

ミオスタチニアントゴニストタンパク質が、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合したアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合したアミノ酸から選択される1つまたは複数の修飾アミノ酸残基を含む、請求項1記載の調製物。

【請求項 12】

ミオスタチニアントゴニストタンパク質が、A204レポーター遺伝子アッセイにおいてアクチビンAシグナル伝達を実質的に阻害しない、請求項1記載の調製物。

【請求項 13】

50

ミオスタチンアンタゴニストタンパク質が第2のミオスタチン阻害剤ドメインをさらに含む融合タンパク質であり、第2のミオスタチン阻害剤ドメインが、ミオスタチンに選択的に結合してALK7またはALK4受容体の結合と競合するポリペプチド親和性試薬である、請求項1記載の調製物。

【請求項14】

親和性試薬が抗体剤である、請求項13記載の調製物。

【請求項15】

抗体剤が、組換え抗体；モノクローナル抗体； V_H ドメイン； V_L ドメイン；scFv；Fab断片；Fab'断片； $F(ab')_2$ ；Fv；またはジスルフィド結合したFvである、請求項14記載の調製物。

10

【請求項16】

抗体剤が、完全なヒト抗体もしくはヒト化キメラ抗体、またはそれらの抗原結合断片である、請求項15記載の調製物。

【請求項17】

親和性試薬が、ミオスタチンに選択的に結合して、ALK7またはALK4受容体の結合と競合するペプチドまたは足場ペプチドである、請求項13記載の調製物。

【請求項18】

親和性試薬がALK7またはALK4のミオスタチン結合ドメインである、請求項13記載の調製物。

【請求項19】

親和性試薬が、ミオスタチンに選択的に結合して、ALK7またはALK4受容体の結合と競合する小有機分子である、請求項13記載の調製物。

20

【請求項20】

以下を含む、哺乳動物における使用に適した薬学的調製物：

- (1) 請求項1~12のいずれか一項記載のミオスタチンアンタゴニストタンパク質のコード配列を含むベクター；
- (2) 該哺乳動物の筋組織の成長を促進するのに有効な量で、インビボにおいて該ミオスタチンアンタゴニストタンパク質の発現をもたらす転写調節配列；および
- (3) 薬学的に許容される担体。

【請求項21】

ヒト患者の筋組織の成長を促進する薬剤を調製するための、ノダルおよび/またはミオスタチンの1つまたは複数に結合してこれを中和する、ケルベロス/ダン/グレムリンポリペプチドまたはその変種のミオスタチン結合ドメインを含むミオスタチンアンタゴニストタンパク質の使用。

30

【請求項22】

非ヒト哺乳動物の筋組織の成長を促進する薬剤を調製するための、ノダルおよび/またはミオスタチンの1つまたは複数に結合してこれを中和する、ケルベロス/ダン/グレムリンポリペプチドまたはその変種のミオスタチン結合ドメインを含むミオスタチンアンタゴニストタンパク質の使用。

【請求項22】

請求項1記載の薬学的調製物を投与する段階を含む、動物の筋細胞または脂肪組織細胞におけるミオスタチンシグナル伝達を阻害する方法。

【請求項23】

薬学的調製物が、少なくとも一部について、対象における筋組織または脂肪組織の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする、病的状態の重症度を軽減するのに有効な量で投与される、請求項22記載の方法。

【請求項24】

薬学的調製物が、消耗性疾患の予防、改善、または重症度を軽減するのに有効な量で投与される、請求項22記載の方法。

【請求項25】

40

50

消耗性疾患が、加齢による消耗、悪液質、食欲不振、DMD症候群、BMD症候群、エイズ消耗性症候群、筋ジストロフィー、神経筋疾患からなる群より選択される、請求項24記載の方法。

【請求項26】

薬学的調製物が、代謝疾患の予防、改善、または重症度を軽減するのに有効な量で投与される、請求項22記載の方法。

【請求項27】

代謝疾患が肥満症またはII型糖尿病からなる群より選択される、請求項26記載の方法。

【請求項28】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物を投与する段階を含む、動物における脂肪生成分化を誘導する方法。 10

【請求項29】

対象の体脂肪比率を下げるために使用される、請求項28記載の方法。

【請求項30】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物を投与する段階を含む、動物の筋組織の成長を促進する方法。

【請求項31】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を、それを必要とする患者に投与する段階を含む、うつ血性心不全を治療または予防する方法。

【請求項32】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を、それを必要とする患者に投与する段階を含む、加齢に関連した虚弱性を軽減する方法。

【請求項33】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、対象の骨密度を増加させるまたは骨折修復を促進する方法。

【請求項34】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、対象のタンパク質異化反応を減じる方法。

【請求項35】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者の筋ジストロフィーの重症度を治療または軽減する方法。 30

【請求項36】

筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー(EDMD)、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHまたはFSHD)(ランドジー・デジェリー又としても知られる)、筋緊張性ジストロフィー(MMD)(スタイナート病としても知られる)、眼咽頭型筋ジストロフィー(OPMD)、遠位型筋ジストロフィー(DD)、先天性筋ジストロフィー(CMD)、先天性ミオトニー(MC)、先天性パラミオトニア(PC)、中心コア病(CCD)、ネマリンミオパシー(NM)、筋細管ミオパシー(MTMまたはMM)、および周期性麻痺(PP)からなる群より選択される、請求項35記載の方法。 40

【請求項37】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者の運動ニューロン疾患の重症度を治療または軽減する方法。

【請求項38】

運動ニューロン疾患が、筋萎縮性側索硬化症(ALS)(ルー・ゲーリック病としても知られる)、乳児進行性脊髄性筋萎縮症(SMA、SMA1、またはWH)(1型SMA、ウェルドニッヒ・ホフマンとしても知られる)、間欠性脊髄性筋萎縮症(SMAまたはSMA2)(2型SMAとしても知られる)、若年性脊髄性筋萎縮症(SMA、SMA3、またはKW)(3型SMA、クーゲルバーグ・ウェランダーとしても知られる)、延髄性筋萎縮症(SBMA)(ケネディ病およびX連鎖SBMAとしても知られる)、および成人脊髄性筋萎縮症(SMA)からなる群より選択される、請求項37記載の方 50

法。

【請求項 39】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者の炎症性筋疾患の重症度を治療または軽減する方法。

【請求項 40】

炎症性筋疾患が、皮膚筋炎(PM/DM)、多発性筋炎(PM/DM)、および封入体筋炎(IBM)からなる群より選択される、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者の神経筋接合部疾患の重症度を治療または軽減する方法。

10

【請求項 42】

神経筋接合部疾患が、重症筋無力症(MG)、ランバート・イートン症候群(LES)、および先天性筋無力症症候群(CMS)からなる群より選択される、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者における内分泌異常に起因する筋疾患の重症度を治療または軽減する方法。

20

【請求項 44】

内分泌異常に起因する筋疾患が、甲状腺機能亢進性筋疾患(HYPTM)および甲状腺機能低下性筋疾患(HYPOTM)からなる群より選択される、請求項43記載の方法。

【請求項 45】

請求項1、2、3、または20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者の末梢神経疾患の重症度を治療または軽減する方法。

【請求項 46】

末梢神経疾患が、シャルコー・マリー・トゥース病(CMT)、デジエリーヌ・ソッタス病(DS)、およびフリードライヒ失調症(FA)からなる群より選択される、請求項45記載の方法。

【請求項 47】

請求項1~20のいずれか一項記載の薬学的調製物の有効量を投与する段階を含む、患者の代謝疾患の重症度を治療または軽減する方法。

30

【請求項 48】

代謝疾患が、ホスホリラーゼ欠損症(MPDまたはPYGM)、酸性マルターゼ欠損症(AMD)、ホスホフルクトキナーゼ欠損症(PFKM)、脱分枝酵素欠損症(DBD)、ミトコンドリア筋症(MIT0)、カルニチン欠損症(CD)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症(CPT)、ホスホグリセリン酸キナーゼ欠損症(PGK)、ホスホグリセリン酸ムターゼ欠損症(PGAMまたはPGAMM)、乳酸脱水素酵素欠損症(LDHA)、およびミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症(MAD)からなる群より選択される、請求項47記載の方法。

40

【請求項 49】

野生型ケルベロスタンパク質と1つまたは複数のアミノ酸残基が異なる変種ケルベロスポリペプチドであって、(i) ノダルおよび/またはミオスタチンの1つまたは複数に結合してこれを中和し、かつ(ii) BMP-4を中和する能力が野生型ケルベロスタンパク質と比較して減少している変種ケルベロスポリペプチドで対象を治療する段階を含む、少なくとも一部について、対象における筋組織または脂肪組織の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする病的状態の重症度を軽減する方法。

【請求項 50】

その目的が、骨吸収を阻害するため、骨形成を刺激するため、骨ミネラル密度を増加させるため、からなる群より選択される1つまたは複数の他の化合物の同時投与を含む、請求項22~48のいずれか一項記載の方法。

【請求項 51】

ビスフォスフォネートの同時投与を含む、請求項22~48のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 52】

グルタミン酸拮抗薬、ポリペプチド増殖因子、神経栄養因子の産生を増加させる薬物、抗炎症剤、カスパーゼ阻害剤、プロテインキナーゼC阻害剤、ビタミンE、補酵素Q10、およびクレアチンからなる群より選択される1つまたは複数の他の化合物の同時投与を含む、請求項22~48のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願

本出願は、2004年5月27日に出願した米国仮特許出願第60/575,062号（特許文献1）の利益を主張する。上記出願の教示はすべて、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0002】

発明の背景

トランスフォーミング増殖因子-スーパーファミリータンパク質は、TGF- β 、アクチビン、インヒビン、骨形成タンパク質(BMP)、およびミュラー管抑制物質(MIS)を含むサイトカインの大きなファミリーを表す(総説に関しては、Massague et al., Trends Cell Biol. 7:187-192, 1997(非特許文献1)を参照されたい)。これらのタンパク質は保存されたC末端シスチンノットモチーフを含み、原形質膜受容体の多様なファミリーのリガンドとして機能する。TGF- β ファミリーのメンバーは、多種多様な細胞種に対して広範な生物学的效果を及ぼす。例えば、それらは、細胞増殖、分化、基質産生、およびアポトーシスを制御する。それらの多くは、胚発生期にパターン形成および組織特異化において重要な機能を有し；成体では、組織修復および免疫系の調節などの過程に関与する。

20

【0003】

TGF- β スーパーファミリータンパク質の活性は、様々な手段によって制御される。BMPサブファミリーのタンパク質の負の制御の1つは、いわゆる骨形成タンパク質(BMP)アンタゴニスト/抑制因子の比較的大きなファミリーを介する。これらのBMP抑制因子は、BMPと結合して、BMPがそれらの膜受容体に結合するのを妨げ、それによって発生および形態形成期のBMPの活性を遮断するタンパク質の亜群を表す。

【0004】

BMP抑制因子は、構造解析、特にC末端の特徴的な「Cysノット」構造における構造的に保存されたCys残基の数に基づいて、3群のタンパク質：8員環、9員環、または10員環CysノットBMP抑制因子にさらに分類され得る。8員環(キャン(CAN)サブファミリー)抑制因子は、さらなるシステイン残基の保存された配置に基づいて4つの亜群にさらに分類され得る グレムリン(gremlin)およびPRDC、ケルベロスおよびココ、およびダン(DAN)、ならびにUSAG-1およびスクレロスチン(sclerostin)。いくつかのモデル生物のゲノムにおける、これらのヒトBMPアンタゴニストのオルソログもまた同定されており、それらの系統発生関係が解析されている(Avsian-Kretchmer and Hsueh, Mol Endocrinol. 18(1): 1-12, 2004. Epub 2003 Oct 02(非特許文献2)、参照により本明細書に組み入れられる)。

30

【0005】

ミオスタチンまたは増殖/分化因子8(GDF-8)もまた、トランスフォーミング増殖因子-(TGF- β)スーパーファミリーに属する(McPherron et al., Nature 387:83-90 (1997)(非特許文献3))。ヒトミオスタチン遺伝子はクローニングされており(Nestor et al. Proc. Natl Acad. Sci. 95:14938-43 (1998)(非特許文献4))、ミオスタチン免疫反応性が1型および2型線維中のヒト骨格筋で検出され得ることが報告されている。機能に関しては、ミオスタチンは、骨格筋の成長および発達を負に制御する上で役割を果たし得る(Nestor et al.、前記)。

40

【0006】

ミオスタチンノックアウトマウスを用いた研究から、ミオスタチンが筋発達の重要な負の制御因子であるという初めての証拠が提供された(McPherron et al., Nature 387:83-90 (1997)(非特許文献3))。ミオスタチン・ヌルマウスでは、動物は野生型マウスよりも有意に大きく、骨格筋量の大きくかつ広範囲に及ぶ増加を有した。さらに、筋量の増加を

50

特徴とする2血統のウシは、ミオスタチンコード配列内に変異を有する(McPherron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12457-61 (1997) (非特許文献5))。ヒト小児の天然で生じるミオスタチン機能減少変異は、総筋肉肥大および並外れた力の家族歴と関連がある(Williams MS, N Engl J Med. 2004 Sep 2;351(10):1030-1; author reply 1030-1 (非特許文献6))。

【0007】

さらに、免疫反応性ミオスタチンの血清濃度および筋肉内濃度は、健常人と比較して筋萎縮を有するHIV感染患者で増加しており、除脂肪量指数と逆の相関があることに留意されたい。これらのデータから、ミオスタチンは成人における骨格筋成長の負の制御因子であり、HIV感染患者の筋萎縮に寄与するという仮説が支持される(Nestor et al.、前記)。

10

【0008】

上記の知見を考慮すると、特に、例えば、加齢、自己免疫不全症候群(エイズ(AIDS))、多発性硬化症、および癌などの病態または疾患状態の結果として筋萎縮を認める個体において、ミオスタチン活性を制御する方法の必要性が存在する。本発明は、そのような筋萎縮状態を認める個体を助けるために利用し得る方法および組成物を提供し、またミオスタチン遺伝子発現の制御へのさらなる洞察を提供する。

【0009】

【特許文献1】米国仮特許出願第60/575,062号

【非特許文献1】Massague et al., Trends Cell Biol. 7:187-192, 1997

【非特許文献2】Avsian-Kretchmer and Hsueh, Mol Endocrinol. 18(1): 1-12, 2004. E 20 pub 2003 Oct 02

【非特許文献3】McPherron et al., Nature 387:83-90 (1997)

【非特許文献4】Nestor et al. Proc. Natl Acad. Sci. 95:14938-43 (1998)

【非特許文献5】McPherron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12457-61 (1997)

【非特許文献6】Williams MS, N Engl J Med. 2004 Sep 2;351(10):1030-1; author rep ily 1030-1

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

本発明の1つの局面は、ノダル(Nodal)、ミオスタチン、およびBMPの機能/シグナル伝達を阻害するための、ケルベロス、ココ、またはケルベロス/ダン/グレムリンスーパーファミリー(本明細書では、まとめて「CDGタンパク質」と総称する)に由来する他のポリペプチドの薬学的調製物を提供する。本CDGポリペプチドの例示的な調製物には、ノダル、ミオスタチン、および/または別のBMP(BMP-4など)に対する親タンパク質の結合親和性を実質的に保持する変種ケルベロスまたはココ配列が含まれ得る。例えば、本発明は、ケルベロス/ダン/グレムリンポリペプチドまたはその変種の(少なくとも)ミオスタチン結合ドメインを含むミオスタチンアンタゴニストタンパク質を含む、ミオスタチンを阻害するための薬学的調製物を提供する。ミオスタチンアンタゴニストタンパク質は、ノダルおよび/またはミオスタチンの1つまたは複数に結合して、これを中和する。好ましくは、薬学的調製物は、ヒト治療薬または獣医治療薬として投与するのに適切であるように、発熱物質を実質的に含まない。

30

【0011】

これらの薬学的調製物は、少なくとも一部について、対象における筋組織または脂肪組織の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする病的状態の重症度を軽減するために使用することができる。例えば、本発明の薬学的調製物は、悪液質、食欲不振、DMD症候群、BMD症候群、エイズ消耗性症候群、筋ジストロフィー、神経筋疾患、運動ニューロン疾患、神経筋接合部疾患、および炎症性筋疾患などの消耗性疾患の重症度を予防、改善、または軽減するのに有効な量で投与することができる。これらの薬学的調製物はまた、少なくとも一部について、筋肉、腱、および韌帯などの組織における異所性骨化の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする病的状態；骨棘および滑膜肥厚の発生を含む変形性関

40

50

節症(OA)；卵巣癌；進行性骨化性線維形成異常症(FOP)；アテローム性動脈硬化症、特に損傷易発性領域におけるアテローム発生の初期段階の炎症反応；および頭蓋骨癒合症の重症度を軽減するために使用することも可能である。

【0012】

本発明の別の局面は、BMP(BMP-4など)シグナル伝達を実質的に損なうことなく(例えば、BMP-4にも他のBMPにも結合しない)、ノダルおよび/またはミオスタチン機能を特異的に阻害するための、CDGタンパク質誘導体の薬学的調製物を提供する。本発明のこの局面の例示的な調製物には、ケルベロスもしくはココのN末端切断型またはシステインコアを含む他の断片を含むポリペプチドが含まれる。これらのいわゆる「N末端切断CDG誘導体」は、少なくとも一部について、対象における筋組織または脂肪組織の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする病的状態の重症度を軽減するために使用することができる。例えば、本発明の薬学的調製物は、悪液質、食欲不振、DMD症候群、BMD症候群、エイズ消耗性症候群、筋ジストロフィー、神経筋疾患、運動ニューロン疾患、神経筋接合部疾患、および炎症性筋疾患などの消耗性疾患の重症度を予防、改善、または軽減するのに有効な量で投与することができる。10

【0013】

特定の態様において、ミオスタチン阻害剤は、CDGタンパク質のミオスタチン結合ドメインを含むポリペプチドである。例えば、ケルベロスタンパク質変種はヒト、マウス、または他の種のケルベロスに由来し得り、これには、ヒトまたはマウスケルベロスタンパク質と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%もしくはそれ以上の配列類似性または同一性を共有し、かつ野生型ケルベロスのミオスタチンに対する結合親和性を実質的に保持するヒトまたはマウスケルベロス変種配列が含まれる。同様に、ココタンパク質変種も、ヒト、マウス、または他の種のココに由来し得り、これには、ヒトまたはマウスココタンパク質と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%もしくはそれ以上の配列類似性または同一性を共有し、かつ野生型ココのミオスタチンに対する結合親和性を実質的に保持するヒトまたはマウスココ変種配列が含まれる。20

【0014】

特定の関連する態様において、ミオスタチン阻害剤はCDGタンパク質のミオスタチン結合ドメインを含むポリペプチドであり、このポリペプチドはBMP-4(および他のBMP)と実質的に結合しない。例えば、ミオスタチン結合ドメインは、ヒト、マウス、または他の種のN末端切断ケルベロスに由来し得り、これには、US 2002/0164682 A1のSEQ ID NO:2または8の106～119残基(以下を参照されたい)のいずれか1つから開始し、US 2002/0164682 A1のSEQ ID NO:2または8の241残基の後の任意の残基で終了する、好ましくはUS 2002/0164682 A1のSEQ ID NO:2または8の241と267残基との間の任意の残基で終了するアミノ酸残基を有するヒトまたはマウスケルベロス誘導体が含まれる(残基番号はすべて両端の残基を含む)。30

【0015】

例えば、ヒトケルベロスの106～119残基は、以下の通りである：

PPGTQSLIQPIDGM

【0016】

ヒトケルベロスの241～267残基は、以下の通りである：40

CKVKTEHEDGHILHAGSQDSFIPGVSA

【0017】

例えば、ミオスタチン結合活性を保持するが、他のBMP結合活性を喪失したケルベロスのN末端切断ミオスタチン結合ドメインのような、ケルベロス由来変種配列もまた含まれる。変種配列は、阻害剤の選択性を変更する(例えば、GDF-8、GDF-11、またはノダル結合に関して)、ミオスタチンに関する他の結合特性(K_d 、および/または K_{off} もしくは K_{off} 速度)を変更する、または生体内分布もしくはインビボにおけるもしくは保存中の半減期を改善する方法として望ましいと考えられる。50

【0018】

特定の好ましい態様において、ミオスタチン結合ドメインを含むケルベロスリペプチド(全長またはN末端切斷型)は、 $1\mu M$ 以下の K_d 、より好ましくは $100 nM$ 、 $10 nM$ 、またはさらには $1 nM$ 以下の K_d でミオスタチンと結合する。

【0019】

特定の関連する態様において、ミオスタチン阻害剤は、図3またはGenBankアクセション番号22749329に示されるヒトココタンパク質のようなココタンパク質のミオスタチン結合ドメインを含むポリペプチドである。例示的なヒトココタンパク質配列は、

1	MLLGQLSTLL	CLLSGALPTG	SGRPEPQSPR	PQS WAAANQT	WAL GPGALPP
	LVP PASALGSW				
61	KAFLGLQKAR	QLGMGRLQRG	QDEVAAVTLP	LNPQEVIQGM	CKAVPFVQVF
	SRPGCSAIRL				
121	RNHLCFGHCS	SLYIPGSDPT	PLVLCNSCMP	ARKRWAPVVL	WCLTGSSASR
	RRVKISTMLI				
181	EGCHCSPKA				

10

20

20

30

40

50

である。

【0020】

特定の好ましい態様において、ミオスタチン結合ドメインを含むココポリペプチド(全長またはN末端切斷型)は、 $1\mu M$ 以下の K_d 、より好ましくは $100 nM$ 、 $10 nM$ 、またはさらには $1 nM$ 以下の K_d でミオスタチンと結合する。

【0021】

特定の態様において、ミオスタチン結合ドメインは、ミオスタチン結合ドメインに加えて、インビボ安定性、インビボ半減期、接取/投与、組織局在性もしくは分布、タンパク質複合体の形成、および/または精製の1つまたは複数を増強する1つまたは複数のポリペプチド部分を含む融合タンパク質の一部である。例えば、融合タンパク質は免疫グロブリンFcドメインを含み得る。融合タンパク質は、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジン配列、またはGST融合物などの精製サブ配列を含み得る。

【0022】

特定の態様において、ミオスタチン結合ドメインは、グリコシリ化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシリ化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合したアミノ酸、または有機誘導体化剤に結合したアミノ酸などの、1つまたは複数の修飾アミノ酸残基を含むタンパク質の一部である。

【0023】

特定の態様において、本変種CDGポリペプチドは、例えばGDF-11および/またはノダルと比較して、ミオスタチンの結合および阻害に関して選択的である。例えば、変種CDGポリペプチドは、ミオスタチン結合に関して、GDF-11および/またはノダルと結合する際の解離定数(K_d)よりも少なくとも2倍低い、さらにより好ましくは少なくとも5、10、100、またはさらには1000倍低い K_d を有するものであってよい。結合反応速度のためであろうと生体内分布のためであろうと、本変種CDGポリペプチドはまた、ミオスタチン活性または特定の生理的結果(筋成長の促進、骨密度の促進、または脂肪細胞分化の誘導など)に関して、GDF-11および/またはノダル活性を阻害する際の EC_{50} よりも少なくとも2倍低い、さらにより好ましくは少なくとも5、10、100、またはさらには1000倍低い EC_{50} を有する阻害剤のように、相対的なインビボでの能力に基づいて選択され得る。

【0024】

特定の態様において、本変種CDGポリペプチドは、例えばBMP-4などの他のBMPタンパク質と比較して、ミオスタチンの結合および阻害に関して選択的である。例えば、変種CDGポリペプチドは、ミオスタチン結合に関して、BMP-4と結合する際の解離定数(K_d)よりも少なくとも2倍低い、さらにより好ましくは少なくとも5、10、100、またはさらには1000倍低い K_d を有するものであってよい。結合反応速度のためであろうと生体内分布のためであろうと、本変種CDGポリペプチドはまた、ミオスタチン活性または特定の生理的結果(筋成長の促進、骨密度の促進、または脂肪細胞分化の誘導など)に関して、BMP-4および/またはノダル活性を阻害する際の EC_{50} よりも少なくとも2倍低い、さらにより好ましくは少なくとも5、10、100、またはさらには1000倍低い EC_{50} を有する阻害剤のように、相対的なインビボでの能力に基づいて選択され得る。

筋成長の促進、骨密度の促進、または脂肪細胞分化の誘導など)に関して、BMP-4活性を阻害する際のEC₅₀よりも少なくとも2倍低い、さらにより好ましくは少なくとも5、10、100、またはさらには1000倍低いEC₅₀を有する阻害剤のように、相対的なインビボでの能力に基づいて選択され得る。

【0025】

特定の好ましい態様において、変種CDGポリペプチド結合ドメインは、1 μM以下それ未満のK_d、より好ましくは100 nM、10 nM、またはさらには1 nM以下のK_dでミオスタチンと結合する。

【0026】

一般に、本ミオスタチン阻害剤調製物は、ヒト患者での使用に適している。好ましい態様において、変種CDGポリペプチドの本調製物は、ヒト患者への投与に適切であるように、発熱物質を実質的に含まない。

10

【0027】

他の態様において、本変種CDGポリペプチドは、非ヒト動物、特に他の哺乳動物に投与することができる。例えば、本発明の化合物は、ニワトリ、シチメンチョウ、家畜動物(ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシなど)、ペット動物(例えば、ネコおよびイヌ)に投与することができ、または成長を促進するおよびタンパク質/脂肪比を改善するために水産養殖において役立ち得る。さらに説明すると、本変種ケルベロスポリペプチドは、枝肉の品質を改善するために食肉生産用動物の成長を促進するもしくは飼料効率を亢進するため、または乳牛の乳生産を増加させるために使用することができる。

20

【0028】

本発明の別の局面は、本明細書に記載する変種CDGポリペプチドの薬学的調製物、およびヒト患者において筋組織の成長促進に使用するためのラベルまたは説明書を含む包装された調合薬に関する。

【0029】

本発明のさらに別の局面は、本明細書に記載する変種CDGポリペプチドの薬学的調製物、および非ヒト哺乳動物において筋組織の成長促進に獣医師が使用するためのラベルまたは説明書を含む包装された調合薬に関する。

【0030】

本発明の別の局面は、本変種CDGポリペプチドの1つまたは複数の薬学的調製物を投与することにより、インビボでミオスタチンシグナル伝達を阻害する方法に関する。本方法を用いて、ヒト患者または非ヒト動物において筋成長を促進すること、脂肪生成分化を促進すること、および/または骨成長もしくは骨石灰化を促進することができる。

30

【0031】

特定の態様においては、本発明の治療法を用いて、少なくとも一部について、対象における筋組織または脂肪組織の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする病的状態の重症度を軽減することができる。例えば、本発明の薬学的調製物は、悪液質、食欲不振、DMD症候群、BMD症候群、エイズ消耗性症候群、筋ジストロフィー、神経筋疾患、運動ニューロン疾患、神経筋接合部疾患、および炎症性筋疾患などの消耗性疾患の重症度を予防、改善、または軽減するのに有効な量で投与することができる。

40

【0032】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る例示的な筋ジストロフィーには、以下のものが含まれる：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー(EDMD)、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHまたはFSHD)(ランドジー・デジエリーヌとしても知られる)、筋緊張性ジストロフィー(MMD)(スタイナート病としても知られる)、眼咽頭型筋ジストロフィー(OPMD)、遠位型筋ジストロフィー(DD)、および先天性筋ジストロフィー(CMD)。

【0033】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る例示的な運動ニューロン疾患には、以下

50

のものが含まれる：筋萎縮性側索硬化症(ALS)(ルー・ゲーリック病としても知られる)、乳児進行性脊髄性筋萎縮症(SMA、SMA1、またはWH)(1型SMA、ウェルドニッヒ・ホフマンとしても知られる)、間欠性脊髄性筋萎縮症(SMAまたはSMA2)(2型SMAとしても知られる)、若年性脊髄性筋萎縮症(SMA、SMA3、またはKW)(3型SMA、クーゲルバーグ・ウェランダーとしても知られる)、延髄性筋萎縮症(SBMA)(ケネディ病およびX連鎖SBMAとしても知られる)、および成人脊髄性筋萎縮症(SMA)。

【0034】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る例示的な炎症性筋疾患には、以下のものが含まれる：皮膚筋炎(PM/DM)、多発性筋炎(PM/DM)、および封入体筋炎(IBM)。

【0035】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る例示的な神経筋接合部疾患には、以下のものが含まれる：重症筋無力症(MG)、ランバート・イートン症候群(LES)、および先天性筋無力症症候群(CMS)。

【0036】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る、内分泌異常に起因する例示的な筋疾患には、以下のものが含まれる：甲状腺機能亢進性筋疾患(HYPTM)および甲状腺機能低下性筋疾患(HYPOTM)。

【0037】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る例示的な末梢神経疾患には、以下のものが含まれる：シャルコー・マリー・トゥース病(CMT)、デジエリーヌ・ソッタス病(DS)、およびフリードライヒ失調症(FA)。

【0038】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得るその他の例示的な筋疾患には、以下のものが含まれる：先天性ミオトニー(MC)、先天性パラミオトニア(PC)、中心コア病(CCD)、ネマリンミオパシー(NM)、筋細管ミオパシー(MTMまたはMM)、および周期性麻痺(PP)。

【0039】

本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る筋肉の例示的な代謝疾患には、以下のものが含まれる：ホスホリラーゼ欠損症(PMDまたはPYGM)、酸性マルターゼ欠損症(AMD)、ホスホフルクトキナーゼ欠損症(PFKM)、脱分枝酵素欠損症(DBD)、ミトコンドリア筋症(MITO)、カルニチン欠損症(CD)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症(CPT)、ホスホグリセリン酸キナーゼ欠損症(PGK)、ホスホグリセリン酸ムターゼ欠損症(PGAMまたはPGAMM)、乳酸脱水素酵素欠損症(LDHA)、およびミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症(MAD)。

【0040】

本発明はまた、例えば肥満症またはII型糖尿病の治療などにおいて、代謝疾患の予防、改善、または重症度を軽減するために使用することができる。さらに説明すると、本変種CDGポリペプチド調製物は、対象の体脂肪比率を下げるために使用することができる。

【0041】

さらに別の態様では、変種CDGポリペプチド調製物は、うっ血性心不全を治療または予防する；加齢に関連した虚弱性を軽減する；骨密度を増加させる(骨粗鬆症の治療のために)または骨折修復を促進する；成長遅延を治療する、生理的低身長症を治療する、大手術後などのタンパク質異化反応を減じる；慢性疾患によるタンパク質損失を軽減する；創傷治癒を促進する；熱傷患者または大手術を受けた患者の回復を促進する；皮膚の厚みの維持；代謝ホメオスタシスおよび腎ホメオスタシスの維持などの方法の一部として使用することができる。本変種CDGポリペプチドのさらなる他の使用には、成長ホルモン欠損成人の治療および糖質コルチコイドの異化的副作用の予防が含まれる。

【0042】

本薬学的組成物はまた、脊椎損傷および脳卒中などのCNS損傷/疾患、およびPNS損傷/疾患を含む、多くの神経系疾患状態を治療するためのミオスタチンアンタゴニストとして使用することも可能である。

10

20

30

40

50

【0043】

本発明はまた、上記の疾患または治療適応症を治療する試みにおいて有用な1つまたは複数の他の化合物と併用した、本ミオスタチン製剤の使用も意図する。これらの組み合わせにおいて、治療剤と本発明の変種CDGポリペプチドは、独立しておよび連続して投与されてもよく、同時に投与されてもよい。骨吸収を阻害する、骨粗鬆症を予防する、骨格破壊を減少させる、骨折治癒を強化する、骨形成を促進する、および骨ミネラル密度を増加させるための併用療法は、ビスフォスフォネートと本発明の変種CDGポリペプチドの併用によって達成され得る。これらの有用性を有するビスフォスフォネートには、これらに限定されるわけではないが、アレンドロネート、チルドロネート、ジメチル-APD、リセドロネート、エチドロネート、YM-175、クロドロネート、パミドロネート、およびBM-210995(10イバンドロネート)が含まれる。

【0044】

本ミオスタチン阻害剤は、哺乳動物エストロゲンアゴニスト/アンタゴニストと併用され得る。エストロゲンアゴニスト/アンタゴニストという用語は、エストロゲン受容体と結合し、骨代謝回転を阻害し、骨減少を防ぐ化合物を指す。特に、エストロゲンアゴニストは、本明細書では、哺乳動物組織においてエストロゲン受容体部位に結合し、1つまたは複数の組織においてエストロゲンの作用を模倣し得る化合物と定義する。エストロゲンアンタゴニストは、本明細書では、哺乳動物組織においてエストロゲン受容体部位に結合し、1つまたは複数の組織においてエストロゲンの作用を遮断し得る化合物と定義する。様々なこれらの化合物を以下に記載して言及するが、他のエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストも当業者に周知であると考えられる。例示的なエストロゲンアゴニスト/アンタゴニストには、ドロキシフェンおよび関連化合物(米国特許第5,047,431号を参照されたい)、タモキシフェンおよび関連化合物(米国特許第4,536,516号を参照されたい)、4-ヒドロキシタモキシフェン(米国特許第4,623,660号を参照されたい)、ラロキシフェンおよび関連化合物(米国特許第4,418,068号を参照されたい)、ならびにイドキシフェンおよび関連化合物(米国特許第4,839,155号を参照されたい)が含まれる。

【0045】

本ミオスタチン阻害剤はまた、以下の薬剤の1つまたは複数と併用することも可能である:グルタミン酸拮抗薬(部分的拮抗薬を含む)、例えばリルゾールおよびトピラメート;ポリペプチド増殖因子、例えば成長ホルモン(GH)およびインスリン様増殖因子1(IGF-1)、または神経栄養因子の身体自体での産生を増加させる薬物、例えばキサリプロデン;抗炎症薬、例えばセレコキシブ(セレブレックス)および他のCOX-2阻害剤;抗生物質、例えばミノサイクリン(ミノシン、ダイナシン)またはカスパーゼ酵素を阻害する他の薬剤;プロテインキナーゼC阻害剤、例えばタモキシフェン(ノルバデックス);ならびにビタミンE、補酵素Q10、およびクレアチンを含む様々な市販の物質。

【0046】

発明の詳細な説明

I. 概要

ケルベロスは、発生過程において前方内中胚葉で発現する(Bouwmeester et al., *Nature* 382: 595-601, 1996; Piccolo et al., *Nature* 397: 707-10, 1999; Rodriguez et al., *Nature* 401: 243-51, 1999)。ニワトリオルソログであるカロンテ(caronte)は、ニワトリ胚の左右非対称性に関与する(Rodriguez、前記)。ケルベロスは、細胞外間隙において多価増殖因子アンタゴニストとして機能し、BMP-4、ノダル、およびWntによるシグナル伝達を阻害する(Belo et al., *Genesis* 26: 265-70, 2000)。マウスケルベロスは、独立した部位を介してBMPタンパク質およびノダルに結合するが(Piccolo、前記)、ツメガエルケルベロスはまたWntタンパク質にも結合し、それらの作用を阻害する(Belo、前記)。ケルベロスは、軸幹構造が不在の場合に異所性頭部を誘導する独特の特性を有する(Piccolo、前記)。原腸形成期のケルベロスの発現は、内胚葉におけるノダル関連シグナルにより、およびシュペーマンオーガナイザー因子により活性化される(Yamamoto et al., *Dev Biol* 257: 190-204, 2003)。

10

20

30

40

50

【0047】

ケルベロスのオルソログはニシツメガエル(*Xenopus tropicalis*)およびトラフグ(*Fugu rubripes*)に見出されるが、無脊椎動物には存在しない。トラフグでは、ケルベロスに対してオルソログが1つしか存在しない。ケルベロスのオルソログ遺伝子はすべて、2つのエキソンを有する；シスチンノットドメインの最初の8アミノ酸は第1エキソンの3'末端によってコードされ、モチーフの残りの部分は第2エキソンによってコードされる。いくつかのオルソログでは、推定タンパク質切断部位が、シスチンノットドメインの先頭の上流に認められ得る。

【0048】

ココは、ノダルシグナル伝達を阻害するケルベロス/ダンファミリーのタンパク質の別のメンバーである。10

【0049】

ひとつに、本発明は、ノダル、GDF-11、および/またはミオスタチン機能を阻害するためのココまたはケルベロス誘導体を提供する。特定の態様において、ココおよびケルベロス誘導体は、BMP(BMP-4など)シグナル伝達を実質的に損なうことなく(例えば、BMP-4にも他のBMPにも結合しない)、ノダル、GDF-11、および/またはミオスタチン機能を阻害する。本ケルベロス誘導体はまた、BMP(BMP-4など)シグナル伝達を阻害するために使用することも可能である。

【0050】

本発明の例示的な調製物には、ケルベロスのN末端切断型を含むケルベロスピリペプチド誘導体が含まれる。これらのいわゆる「ケルベロス誘導体」は、少なくとも一部について、対象における筋組織または脂肪組織の異常な量、発達、または代謝活性を特徴とする病的状態の重症度を軽減するために使用することができる。例えば、本発明の薬学的調製物は、悪液質、摂食障害、DMD症候群、BMD症候群、エイズ消耗性症候群、筋ジストロフィー、神経筋疾患、運動ニューロン疾患、神経筋接合部疾患、および炎症性筋疾患などの消耗性疾患の予防、改善、または重症度を軽減するのに有効な量で投与することができる。20

【0051】

II. 定義

本明細書で使用する用語は一般に、本発明の状況および各用語が用いられる特定の状況における、当技術分野での通常の意味を有する。本発明の組成物および方法、ならびにそれらの作製および使用方法の記載に際して、実施者にさらなる手引きが提供されるように、特定の用語を以下または本明細書の他所で考察する。用語のいかなる使用の範囲および意味も、その用語が用いられる特定の状況から明らかになると考えられる。30

【0052】

「約」および「およそ」は一般に、測定の性質または精度を前提として測定された量の許容可能な誤差の程度を意味するものとする。典型的には、例示的な誤差の程度は、所与の値または値域の20パーセント(%)以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内である。

【0053】

または、特に生物系においては、「約」および「およそ」という用語は、所与の値の1オーダー以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内の値を意味し得る。本明細書で示す数量は、特記されない限り近似値であり、明確に記載されない場合でも、「約」または「およそ」という用語が推測され得ることを意味する。40

【0054】

本発明の方法は、野生型配列と1つまたは複数の変異体/配列変種をはじめとする、配列を相互に比較する段階を含み得る。そのような比較は典型的に、例えば当技術分野において周知である配列アライメントプログラムおよび/またはアルゴリズム(いくつか例を挙げると、例えば、BLAST、FASTA、およびMEGALIGN)を用いた、ポリマー配列のアライメントを含む。変異が残基の挿入または欠失を含むアライメントにおいて、配列アライメントは、挿入または欠失残基を含まないポリマー配列中に「ギャップ」(典型的には、ダッシュ

記号または「A」で表される)を導入することを当業者は容易に理解できる。

【0055】

「相同意的」という用語は、その文法形態および綴りの変化形のすべてにおいて、同じ生物種のスーパーファミリーに由来するタンパク質、および異なる生物種に由来する相同タンパク質を含む、「共通の進化の起源」を有する2つのタンパク質間の関係を指す。このようなタンパク質(およびそれらをコードする核酸)は、パーセント同一性の点からであろうと、特定の残基もしくはモチーフおよび保存された位置の存在によるものであろうと、それらの配列類似性に反映される配列相同性を有する。

【0056】

「配列類似性」という用語は、その文法形態のすべてにおいて、共通の進化の起源を共有する可能性があるかまたはない核酸またはアミノ酸配列間の同一性または一致の程度を指す。

【0057】

しかし、一般的な使用および本出願において、「相同意的」という用語は、「高度に」などの副詞で修飾される場合には、配列類似性を指し得り、共通の進化の起源と関連する場合もあればそうでない場合もある。

【0058】

温度および溶液イオン強度の適切な条件下で、一本鎖形態の核酸分子が他の核酸分子にアニールし得る場合に、核酸分子はcDNA、ゲノムDNA、またはRNAなどの別の核酸分子に「ハイブリダイズし得る」(Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照されたい)。温度およびイオン強度の条件によって、ハイブリダイゼーションの「ストリンジエンシー」が決まる。相同核酸の予備スクリーニングには、55 °CのT_m(融解温度)に相当する低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件、例えば5xSSC、0.1% SDS、0.25%乳、およびホルムアミドなし；または30%ホルムアミド、5xSSC、0.5%SDSを使用することができる。

【0059】

中程度のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件は、より高いT_mに相当し、例えば5xまたは6xSSCを伴う40%ホルムアミドである。高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、最も高いT_mに相当し、例えば50%ホルムアミド、5xまたは6xSSCである。SSCは、0.15M NaCl、0.015M Na-クエン酸である。

【0060】

「高ストリンジエント条件」は、構造的に関連のある核酸のハイブリダイゼーションは可能にするが、構造的に似ていない核酸のハイブリダイゼーションは可能にしないハイブリダイゼーションの条件を包含することが、当技術分野において十分に理解される。「ストリンジエント」という用語は、高度に相補的な核酸のみのアニーリングを可能にする多くの選択的なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件のいずれかを説明するための、当業者によって理解される専門用語である。

【0061】

例示的な高ストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、約1M塩中で形成されるDNA二本鎖の融解温度(T_m)よりも約20~27 °C低いT_mに相当する。多くの等価な手順が存在し、いくつかの一般的な分子クローニング手引き書が、ストリンジエントハイブリダイゼーションの適切な条件について記載しており、さらに、これらの条件下で安定であると予測されるハイブリッドの長さを計算するための式を提供している(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6もしくは13.6.6；またはSambrook, et al. (1989) Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Pressの9.47-9.57ページを参照されたい)。

【0062】

ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が相補的配列を含むことを必要とするが、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに応じて、塩基間のミスマッチが可能である。

10

20

30

40

50

核酸をハイブリダイズするための適切なストリンジエンシーは、当技術分野において周知の変数である、核酸の長さおよび相補性の程度に依存する。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が高いほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドの T_m 値は高くなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対的安定性(T_m の高さに対応する)は、以下の順に低下する: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。100ヌクレオチド長を超えるハイブリッドに関して、 T_m を算出するための式が導かれている(Sambrook et al.、前記、9.51を参照されたい)。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションでは、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さによってその特異性が規定される(Sambrook et al.、前記、11.8を参照されたい)。ハイブリダイズし得る核酸の最小長は、少なくとも約10ヌクレオチド; 好ましくは少なくとも約15ヌクレオチドであり; より好ましくは、その長さは少なくとも約20ヌクレオチドである。

10

【0063】

特記しない限り、「標準的なハイブリダイゼーション条件」という用語は約55 の T_m を指し、上記の条件を利用する。好ましい態様において、 T_m は60 ; より好ましい態様において、 T_m は65 である。特定の態様において、「高ストリンジエンシー」とは、0.2×SSCにおける68 での、50%ホルムアミド、4×SSCにおける42 での、またはこれら2つのいずれかの条件下で見られるハイブリダイゼーションレベルと同等のレベルを与える条件下でのハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件を指す。

20

【0064】

オリゴヌクレオチド(例えば、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー)の適切なハイブリダイゼーション条件は、オリゴヌクレオチドの低い融解温度が理由で、典型的に全長核酸(例えば、全長cDNA)の条件とは若干異なる。オリゴヌクレオチドの融解温度は関連するオリゴヌクレオチド配列の長さに依存するため、適切なハイブリダイゼーション温度は用いるオリゴヌクレオチド分子に依存して変動することになる。例示的な温度は、37 (14塩基オリゴヌクレオチドに対して)、48 (17塩基オリゴヌクレオチドに対して)、55 (20塩基オリゴヌクレオチドに対して)、および60 (23塩基オリゴヌクレオチドに対して)であってよい。オリゴヌクレオチドの例示的な適切なハイブリダイゼーション条件には、6×SSC、0.05%ピロリン酸ナトリウム中の洗浄、または同等のハイブリダイゼーションレベルを与える他の条件が含まれる。

30

【0065】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、「ペプチド結合」と称する化学結合によって結合されたアミノ酸鎖を説明するために互換的に使用される。酵素をはじめとするタンパク質またはポリペプチドは、天然で生じたことを意味する「天然型」または「野生型」であってよく; あるいは天然タンパク質または別の変異体から作製、改変、導出されるか、またはそれらと何らかの方法で異なるかもしくは変化していることを意味する、「変異体」、「変種」、または「改変体」であってよい。

【0066】

本明細書で使用する「ケルベロス/ダン/グレムリンス-ペーパーファミリータンパク質」および「CDGタンパク質」という用語はいずれも、ケルベロス、ココ、および他の関連タンパク質を含むタンパク質ファミリーを意味するために用いられる。

40

【0067】

「ケルベロスまたはケルベロス様タンパク質」は、マウス(NCBI参照配列番号NP_034017)またはヒト(NCBI参照配列番号NP_005445)ケルベロスタンパク質(それぞれ、US 2002/0164682 A1のSEQ ID NO:2または8もまた参照されたい、これらの内容は参考により本明細書に組み入れられる)、および哺乳動物ケルベロスタンパク質のC末端部分の高度に保存されたシステインパターンと配列相同性を共有する他のタンパク質などの、哺乳動物ケルベロスおよびケルベロス様タンパク質を指す。ケルベロスタンパク質の例示的なアミノ酸配列には、以下のものが含まれる

マウスケルベロスタンパク質(NCBI参照配列番号NP_034017) :

1 mhlllvqllv llplgkadlc vdgcqsqgsl sfpllergrr dlhvanheea edkpdlfvav
 61 phlmgttslag egqrqrgkml srlgrfwkjp etefypprdv esdhvssgmq avtqpadgrk
 121 versplqeea krfwhrfmfr kgpafqgvil pikshevhwe tcrtvpfnat iahedcqkv
 181 vqnnlcfgkc ssirfpgega dahsfcschcs ptkfttvhlm lnctsptpvv kmvmqveecq
 241 cmvktergee rlllagsqgs fipglpaskt np

ヒトケルベロスタンパク質(NCBI参照配列番号NP_005445) :

1 mhlllfqllv llplgktrh qdgrqnqssl spvllprnqr elptgnheea eekpdlfvav
 61 phlvatspag egqrqrekml srfgrfwkjp eremhpsrds dsepfppgtq sliqpidgmk
 121 meksplreea kkfwhhfmpfr ktpasqgvil pikshevhwe tcrtvpfsqt ithegcekvv
 181 vqnnlcfgkc gsvhfpqaaq hshtscshcl pakfttmhlp lnctelssvi kvvmlveecq
 241 ckvktehedg hilhagsqds fipgvs

10

【 0 0 6 8 】

マウスおよびヒトケルベロスは、SEQ ID N0:1および7としてUS 2002/0164682 A1に開示されている通りである(参照により本明細書に組み入れられる)。

NCBI参照配列番号NM_005454.1(ヒトケルベロスmRNA)。

1 atgcatctcc tcttatttca gctgctggta ctcctgcctc tagaaaagac cacacggcac
 61 caggatggcc gccagaatca gagttctt tccccgtac tcctgccaag gaatcaaaga
 121 gagttccca caggcaacca tgaggaagct gaggagaagc cagatctgtt tgtcgactg
 181 ccacaccctt tagccaccag ccctgcaggg gaaggccaga ggcagagaga gaagatgctg
 241 tccagatttgcaggttctg gaagaagcct gagagagaaa tgcattccatc cagggactca
 301 gatagtggc ccttcccacc tgggaccagg tccctcatcc agccataga tggaatggaaa
 361 atggagaaat ctcttcttcg ggaagaagcc aagaaattct ggcaccactt catgttcaga
 421 aaaactccgg ttctcagggt ggtcatctt cccatcaaaa gccatgaagt acattggag
 481 acctgcagga cagtgcctt cagccagact ataaccacg aaggctgtga aaaagttagtt
 541 gttcagaaca acctttgc ttggaaatgc gggctgttc attttcctgg agccgcgcag
 601 cactccata cctcctgctc tcactgtttg cctgccaagt tcaccacgt gcacttgcca
 661 ctgaactgca ctgaacttcc tccctgtatc aagggtgtga tgctgggtga ggagtgcag
 721 tgcaagggtga agacggagca tgaagatgga cacatcctac atgctggctc ccaggattcc
 781 tttatccca gagtttcagc ttga

20

NM_009887.1(マウスケルベロスmRNA)。

1 ggggggggggg ggggtcagag ggagctttct tttaggcccg tccatctgtg aatctaacct
 61 cagtttctgg gaatcaggaa gcatgcacat cctcttagtt cagctgcttg ttctcttgcc
 121 tctggggaaag gcagacactat gtgtggatgg ctgccagagt cagggcttctt tattccttcc
 181 tctcctagaa aggggtcgca gagatctcca cgtggccaaac cacgaggagg cagaagacaa
 241 gccggatctg tttgtggccg tgccacacact catgggcacc agcctggctg gggaaaggcca
 301 gaggcagaga gggaaagatgc tgcaggct tggaaagatcc tggaaagaaaac ctgagaccga
 361 attttacccc ccaaggatg tggaaagcga tcatgtctca tcggggatgc aggccgtgac
 421 tcagccagca gatgggagga aagtggagag atcacctcta cagggaggaa ccaagaggaa
 481 ctggcatcg ttcatgttca gaaaggcccc ggcgttccag ggagtcatcc tgcccatcaa
 541 aagccacgaa gtacactggg agacactgcag gactgtggcc ttciaaccaga ccattggcca
 601 tgaagactgt caaaaaagtgc ttgtccagaa caaccttgc tttggcaaat gcagttccat
 661 tcgtttccc ggagaagggg cagatgcccc cagcttgc tcccaactgct cgccccaccaa
 721 attcaccacc gtgcacttga tgctgaactg caccagccca accccctgg tcaagatggt
 781 gatgcaagta gaagagtgta agtgcattgtt gaagacggaa cgtggagagg agcgcctcct
 841 actggctggt tcccaagggtt ctttcattccc tggacttcca gcttcaaaaaa caaaccatg
 901 aattaccta acagaaagca aaacctaaca agaataagt aggtttttc aatctgaaaa
 961 tggatgtga gttatataaa gatcagtggaa aaatatctt ctctctccct ctctccct
 1021 ctctctctc tctatttct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctca
 1081 cacacacaca cacacacaca cacacacaca catgtttgtg ttttagacagg gtcttatgta
 1141 ttctcagctg gcctcaaact cacaatgtgg ctggggatga ttttaaactc ctgatccaaat
 1201 tcctgagtgc tgggattaca gacatgctcc ataanacata gctcccgaa ggattttaa
 1261 aagagattt gcatgttca aagttgcctt tgagactcag aaatattttg atntattgaa
 1321 tggccttgcc acagatgtgg gaggcagctt gcttgggtggc ccaagttttt tttttttgtt
 1381 cggtcagaat tctccacatg aagttttac tggatgttctt ctggcgttga agaaggaata
 1441 gtgaaggtac ttttaacagt ttacacgtgg aaggggctca ggcacttagga accaaccctt
 1501 tcccggaaata tgagggaaat acatgaacag tattagagtc acttgaggaa gttacttagga
 1561 aacgcataa gtctccaagt acattgtgag tcattttgaa ggacaatcgt gtatataagac
 1621 gaaatcttct actcgtatgc ttttgaatct tctagcaagt tagtttcta tggatggct
 1681 tcttcatttctt gtctaagagt atgtgtgaca aattcaacct gacaaatacc tcaatggcaa
 1741 attctgaccc tg

10

20

30

40

【0069】

また、ケルベロス関連タンパク質は、ツメガエル、およびショウジョウバエ、線虫、ゼブラフィッシュ、ならびにすべての哺乳動物(例えば、ラット、マウス、および非ヒト霊長類)におけるファミリーメンバーを含め、他の種においても存在することが予測される。「ケルベロスまたはケルベロス様タンパク質」には、ミオスタチン結合活性を保持するケルベロスタンパク質の変種、例えば、対立遺伝子変種または突然変異誘発もしくは欠失により誘発された変種、およびミオスタチン結合活性を保持するケルベロスタンパク質の断片もまた含まれる。「ケルベロス様タンパク質」は、本明細書においてさらに説明するタンパク質を含む、構造的および/または機能的類似性を共有するタンパク質のファミリーを示すためにも用いられる。そのようなタンパク質は、ヒトもしくはマウスケルベロスの全長にわたって、またはヒトもしくはマウスケルベロスの少なくともミオスタチン結合ドメイン内で、ヒトまたはマウスケルベロスのコード配列、特にミオスタチン結合ドメインのコード配列部分とハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれる。ケルベロス誘導体またはケルベロス変種配列は、N末端BMP結合ドメインを欠いている場合もあれば、そうでない場合もある。

【0070】

「ココまたはココ様タンパク質」は、GenBankアクセション22749329のヒトココタンパク質、および哺乳動物ココタンパク質のC末端部分の高度に保存されたシステインパターンと配列相同性を共有する他のタンパク質などの、哺乳動物ココタンパク質および関連相同体を指す。ヒトココタンパク質の例示的なアミノ酸配列は、

1	MLLGQLSTLL	CLLSGALPTG	SGRPEPQSPR	PQSWAAANQT	WALGPGALPP
	LVPASALGSW				
61	KAFLGLQKAR	QLGMGRILQRG	QDEVAAVTLP	LNPQEVIQGM	CKAVPFVQVF
	SRPGCSAIRL				
121	RNHLCFGHCS	SLYIPGSDPT	PLVLCNSCMP	ARKRWAPVVL	WCLTGSSASR
	RRVKISTMLI				
181	EGCHCSPKA				

である。

【0071】

ヒトコココード配列は、GenBankアクセション22749328に開示されている(参照により 10
本明細書に組み入れられる)。

```

1 agtccggaca gacagacagg cagacagacg cacggacaag.cagatgctcc ttggccagct
61 atccactctt ctgtgcctgc ttagcggggc cctgcctaca ggctcaggga ggcctgaacc
121 ccagtctcct cgacctcagt cctgggctgc agccaatcag acctggcgc tgggcccagg
181 ggccctgccc ccactgggtc cagcttcgc ccttgggagc tggaaaggcct tcttggcct
241 gcagaaaagcc aggcagctgg ggatgggcag gctgcagcgt gggcaagacg aggtggctgc
301 tgtgactctg ccgctgaacc ctcaggaagt gatccagggg atgtgttaagg ctgtgccctt
361 cgttcaggtg ttctcccgcc ccggctgctc agccatacgc ctccgaaatc atctgtgctt
421 tggtcattgc tcctctctat acatccctgg ctcggaccccc accccactag tcctgtgcaa
481 cagctgtatg cctgctcgca agcgttgggc acccgtggc ctgtgggtc tcactggcag
541 ctcagcctcc cgtcgacggg tgaagatatac caccatgctg atcgaggggt gtcactgcag
601 cccaaaagca tgaactgagc atcgtggatg ggtgcacgga gacacgcacc ttggagaat
661 gaggggagat ggaccaagaa agacgtggac ctggatgatg tactctgggt caagagacca
721 gggatgcagg gttaggcaga caggtcccca gagtccctcac cctgctccccc agacagtaga
781 cacagtgccc gtcctggagt tgcaccactg atagtacacg cacacaatga ttgacaactc
841 actttttttt ttttttttga gatggagtct cgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg
901 cgcaatctca gtcactgca agtcccacct cccgggttta tgccattctc ctgtctcagc
961 ctcccgagta gctgggacta caggcacccg ccaacacgccc cggttaattt ttctgtat
1021 tagtaaaagac agggtttccac cgtgttagcc aggatggct ctatctcctg acctcgat
1081 ctgcctgcct tggccttatt atttttttt ttaaggaca gagtctctt ctgtcacc
1141 ggctggagtg caatggcgcg atcttggctc actgttaactt ccacttgcca ggctcaagca
1201 gttctctgc ctcagcctcc tgagtagctg ggactacagg cacccggcc catgcccagc
1261 taattttgt attttagta gagacagagt ttcaccatat tagcctggct ggtctcaa
1321 tcctggcctc agtgatctg cccacctcg cctcccaaag tgctggatc aaatccactg
1381 ttaatcatta ggctgaactg tctcttatag aatgaggtca aagacactcc cagttgcagg
1441 gagggtagat ggccccaccc agaccgagag acacagtgt gacccctcgg tagggacacc
1501 aaaaaaaaaaaaaaaa cccaaaccaa aaacgcacaa caaagcaggc aggcagacag
1561 ctgctggggg aaatcctggg gtcctgaga cagaggcagg accctcgtgt tcccagctgc
1621 ctcttgccct gatagtggtg ctgtgcctc ctcagaccccc ccacctgagt ctccacagag
1681 ccccacccct ggcattggcat tccacagaaa ccataaagggt tggctgagtc c

```

【0072】

また、ココ関連タンパク質は、ツメガエル、およびショウジョウバエ、線虫、ゼブラフィッシュ、ならびにすべての哺乳動物(例えば、ラット、マウス、および非ヒト靈長類)におけるファミリーメンバーを含め、他の種においても存在することが予測される。「ココまたはココ様タンパク質」には、ミオスタチン結合活性を保持する天然ココタンパク質の変種、例えば、対立遺伝子変種または突然変異誘発もしくは欠失により誘発された変種、およびミオスタチン結合活性を保持するココタンパク質の断片もまた含まれる。「ココ様タンパク質」は、本明細書においてさらに説明するタンパク質を含む、構造的および/または機能的類似性を共有するタンパク質のファミリーを示すためにも用いられる。そのようなタンパク質は、ヒトココの全長にわたって、またはヒトココの少なくともミオスタチン結合ドメイン内で、ヒトココタンパク質と顕著な配列同一性(例えば、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれ以上)を共有するアミノ酸配列を有し得る。ココ様タンパク質にはまた、ストリンジメントな条件下で、ヒトココのコード配列、特にミオスタチン結合ドメインのコード配列部分とハイブリダイズする核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれる。ココ誘導体またはココ変種配列は、N末端BMP結合ドメインを欠いている場合もあれば、そうでない場合もある。

【 0 0 7 3 】

特記する場合を除き、「ケルベロス(誘導体)治療薬」またはその文法上の変形物には、全長またはN末端切断型のケルベロス治療薬が含まれる。

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用する「ケルベロスまたはケルベロス様活性」という用語は、本発明の哺乳動物ケルベロス様タンパク質によって示される活性の1つまたは複数を指す。特に、「ケルベロスまたはケルベロス様活性」には、ニューロンならびに/または脳細胞、シュワン細胞、グリア細胞、およびアストロサイトなどの関連神経細胞および組織の形成、成長、増殖、分化、維持を誘導、強化、および/もしくは阻害する能力が含まれる。「ケルベロスまたはケルベロス様活性」には、OTX2、H-CAM、MASH、クロモグラニン、およびAP2などの神経内分泌または外胚葉組織の分子マーカーを誘導する能力、ならびにニューロンおよび/または脳細胞、シュワン細胞、グリア細胞、およびアストロサイトなどの関連神経細胞および組織の形成を誘導する能力もまた含まれる。「ケルベロスまたはケルベロス様活性」には、リガンドとそれらのタンパク受容体との相互作用を制御する能力もまた含まれ得る。「ケルベロスまたはケルベロス様活性」にはさらに、例えば結合組織、器官のような他の細胞および/または組織の形成、分化、増殖、および/または維持、ならびに創傷治癒を制御する能力も含まれ得る。特に、「ケルベロスまたはケルベロス様活性」には、心臓、脾臓、肝臓、肺臓、胃、腎臓、肺、および脳の細胞および組織、ならびに骨芽細胞および骨、軟骨細胞および軟骨、腱、表皮および筋肉の形成、成長、増殖、分化、および/または維持を強化および/または阻害する能力が含まれ得る。「ケルベロスまたはケルベロス様活性」には、本実施例および本明細書に記載するアッセイにおけるケルベロスおよびケルベロス様タンパク質の活性もまた含まれる。10
20

【 0 0 7 5 】

マウスおよびヒトのケルベロスおよびケルベロス様ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:1 および7としてUS 2002/0164682 A1に開示されている通りである(参照により本明細書に組み入れられる)。NCBI参照配列番号NM_005454.1(ヒト)およびNM_009887.1(マウス)もまた参照されたい。20

【 0 0 7 6 】

特定の関連する態様において、ミオスタチン阻害剤は、図3またはGenBankアクセション番号22749329に示されるヒトココタンパク質のようなココタンパク質のミオスタチン結合ドメインを含むポリペプチドである。例示的なヒトココタンパク質は、30

1	MLLGQLSTLL	CLLSGALPTG	SGRPEPQSPR	PQSWAAANQT	WALGPGALPP
	LVPASALGSW				
61	KAFLGLQKAR	QLGMGRLQRG	QDEVAAVTLP	LNPQEVIQGM	CKAVPFVQVF
	SRPGCSAIRL				
121	RNHLCFGHCS	SLYIPGSDPT	PLVLCNSCMP	ARKRWAPVVL	WCLTGSSASR
	RRVKISTMLI				
181	EGCHCSPKA				

である。

【 0 0 7 7 】

「抗体」および「抗体剤」という用語は本明細書において互換的に使用され、液性応答のインビトロまたはインビボ生成によって得られる免疫グロブリン分子を指し、これにはポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。この用語には、キメラ抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロ結合抗体(例えば、二重特異性抗体)、および組換え一本鎖Fv断片(scFv)のような、遺伝子操作された形態もまた含まれる。「抗体」という用語には、抗体の抗原結合形態(例えば、Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG、および反転IgG)もまた含まれる。40

【 0 0 7 8 】

「抗原結合断片」という用語には、標的エピトープに結合する抗体の任意の部分が含まれる。抗原結合断片は、例えば、CDR3領域を含むポリペプチド、またはミオスタチンエピ50

トップの親和性および特異性を保持する免疫グロブリン分子の他の断片であってよい。

【0079】

「特異的に結合する」には、標的分子を欠く組成物に関して、リガンドと特定の標的分子(すなわち、「結合パートナー」または「結合部分」)との全体または一部における優先的な会合への参照が含まれる。当然のことながら、本ミオスタチン中和抗体と他のタンパク質との間には、ある程度の非特異的相互作用が生じ得ることが認識される。それにもかかわらず、特異的結合は、ミオスタチンタンパク質の特異的な認識を介して媒介されるとして区別され得る。典型的には、特異的結合は、抗体と他のタンパク質(例えば、GDF11)との間よりも、抗体とミオスタチンタンパク質との間ではるかに強い会合を生じる。このような条件下におけるミオスタチンに対する抗体による特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について選択される抗体を必要とする。同種の一価抗原に対する抗体結合部位の親和定数(K_d の対語として、 K_a)は、少なくとも $10^7 M$ 、通常は少なくとも $10^8 M$ 、好ましくは少なくとも $10^9 M$ 、より好ましくは少なくとも $10^{10} M$ 、および最も好ましくは少なくとも $10^{11} M$ である。ミオスタチンと特異的に反応する抗体を選択するには、種々の免疫測定形式が適している。例えば、タンパク質と特異的に反応するモノクローナル抗体を選択するには、固相ELISA免疫測定法が日常的に使用される。特異的反応性を決定するために使用され得る免疫測定法の形式および条件の記載については、Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参考されたい。

【0080】

競合結合形式の免疫測定法を用いて、例えば被験抗体がミオスタチン中和抗体であるかどうかを同定するために、抗体とミオスタチンとの交差反応性を決定することができる。例えば、ミオスタチンタンパク質またはその断片を固体支持体に固定化する。被験抗体をアッセイに添加し、固定化抗原に対してTGF受容体(ActRIIまたはALK7など)の結合と競合させる。被験抗体が、固定化ミオスタチン抗原に対するTGF受容体の結合と競合する能力を比較する。

【0081】

同様に、競合結合形式の免疫測定法を用いて、例えばミオスタチン中和抗体の特異性を決定するために、交差反応性を決定することができる。例えば、ミオスタチンタンパク質またはそのミオスタチンエピトープを固体支持体に固定化する。他のタンパク質(GDF-11、ノダル、もしくはBMP-4、またはミオスタチンと配列相同性を有する他のタンパク質など)のエピトープをアッセイに添加して、固定化抗原に対する潜在的ミオスタチン中和抗体の結合と競合させる。被験ペプチドが、潜在的ミオスタチン中和抗体と固定化ミオスタチン抗原との結合と競合する能力を比較する。標準的な計算により、他の抗原に対する潜在的ミオスタチン中和抗体のパーセント交差反応性を計算する。特定の好ましい態様において、本ミオスタチン中和抗体は、GDF-11と10%未満の交差反応性を有する。他の好ましい態様において、本ミオスタチン中和抗体は、BMP-4と1%、5%、または10%未満の交差反応性を有する。

【0082】

III. 例示的なケルベロスおよびココ誘導体

特定の態様において、ミオスタチン阻害剤は、ヒトまたはマウスケルベロスタンパク質の全長にわたって、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれ以上の配列同一性を共有するケルベロスポリペプチドである(後掲)。

【0083】

特定の他の態様において、ミオスタチン阻害剤は、ケルベロスのN末端切断型を含む、ヒト、マウス、もしくは他の種から得られるケルベロス配列、またはそれらの変種を含むポリペプチドである。全長マウスおよびヒトケルベロスタンパク質は、それぞれUS 2002/0164682 A1のSEQ ID N0:2および8に開示されているが、これらをまたNCBI参照配列形式で以下に開示する：

ヒトケルベロス全長タンパク質：

10

20

30

40

50

1 MHLLLQQLLV LLPLGKTTRH QDGRQNQSSL SPVLLPRNQR ELPTGNHEEA EEKPDLFVAV
 61 PHLVATSPAG EGQRQREKML SRFGRFWKKP EREMHPSRDS DSEPFPPGTQ SLIQPIDGMK
 121 MEKSPLREEA KKFWHHFMFR KTPASQGVIL PIKSHEVHWE TCRTVPFSQT ITHEGCEKVV
 181 VQNNLCFGKC GSVHFPGAAQ HSHTSCSHCL PAKFTTMHLP LNCTELSSVI KVVMLVEECQ
 241 CKVKTEHEDG HILHAGSQDS FIPGVSA

【 0 0 8 4 】

106~119残基(これらの残基のいずれか1つから、本ケルベロス誘導体が開始し得る)および241~267残基(これらの残基のいずれか1つで、本ケルベロス誘導体が終了し得る)に下線を引いてある。

【 0 0 8 5 】

マウスケルベロス全長タンパク質 :

1 MHLLLVQQLLV LLPLGKADLC VDGCQSQGSL SFPLLERGRR DLHVANHEEA EDKPDLFVAV
 61 PHLMGTSLAG EGQRQRGKML SRLGRFWKKP ETEFYPPRDV ESDHVSSGMQ AVTQPADGRK
 121 VERSPLQEEA KRFWHRFMFR KGPAFQGVIL PIKSHEVHWE TCRTVPFNQT IAHEDCQKV
 181 VQNNLCFGKC SSIRFPGEKA DAHSFCSHCS PTKFTTVHLM LNCTSPTPVV KMVMQVEECQ
 241 CMVKTERGEE RLLLAGSQGS FIPGLPASKT NP

10

【 0 0 8 6 】

106~119残基(これらの残基のいずれか1つから、本ケルベロス誘導体が開始し得る)および241~272残基(これらの残基のいずれか1つで、本ケルベロス誘導体が終了し得る)に下線を引いてある。マウスタンパク質が、C末端の付加的な5残基を別として、配列全体にわたりヒトタンパク質と概して相同意であることに留意されたい。したがって、非ヒトケルベロス誘導体が用いられる場合、残基番号はヒト配列に対応する残基番号を指す。

20

【 0 0 8 7 】

上記のように、特定の態様において、ヒトケルベロス誘導体タンパク質の好ましい断片は、N末端において106~119残基(両端の残基を含めて)のいずれかから開始し、残基241の後のいずれかで終了する断片である。

20

【 0 0 8 8 】

ミオスタチン結合活性を保持し、任意にBMP-4結合を実質的に喪失した、野生型ミオスタチン結合ドメインの変異体または変種を含む、ケルベロス由来変種配列もまた含まれる。BMP結合親和性をもたない変種配列は、阻害剤の選択性を変更する(例えば、GDF-11またはノダル結合に関してであり、タンパク質の一方に対して優先的な結合が起こる。ミオスタチンに対するより選択性(野生型よりも親和性の高い)結合、またはBMP-4に対するより差別的な(野生型切断型よりも親和性の低い)結合もまた含まれる)、ミオスタチンに関する他の結合特性(K_d 、および/または K_{on} もしくは K_{off} 速度)を変更する、または生体内分布もしくはインビボにおけるもしくは保存中の半減期を改善する方法として望ましいと考えられる。

30

【 0 0 8 9 】

同定されているタンパク質のデータベースにおける相同性検索に基づいた特定の他のケルベロス配列を以下に記載するが、本変種ケルベロスポリペプチドはそのようなタンパク質に由来してもよい。これらの配列はインターネット上で利用できる公的データベースから検索されるため、これらのデータベースが更新されるにつれて、他の種におけるタンパク質のさらなる相同体も得られる可能性がある。さらに、他の種のケルベロスタンパク質、特に哺乳動物のケルベロスタンパク質は、PCR、低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション、標的種において同定されるケルベロス相同体と交差反応する抗体を使用する、発現ライブラリーのAb介在性スクリーニングなどの、標準的な分子生物学的手順によって容易に得ることができる。

40

【 0 0 9 0 】

例えは、DNAStarのMegaAlign(前記)などのソフトウェアを用いた配列アラインメントにより、タンパク質ファミリーの既知メンバー内で最も保存された領域が同定され得る。次いで、そのような最も保存された領域にわたる縮重オリゴ、および標的生物に由来する鑄

50

型DNAを用いて、PCRを行い得る。好ましい態様において、そのような保存された領域には、キナーゼドメインおよび/またはリガンド結合ドメインが含まれる。

【0091】

これらの同様の保存された領域を用いて、中程度～低度のストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件で核酸ライブラリーをスクリーニングするためのプローブを作製することも可能である(定義の項を参照されたい)。

【0092】

ツメガエル相同体：gi|1513088。

【0093】

トラフグ相同体：FuguGenscan_32561 / SINFRUP00000076662。

10

【0094】

特定の態様において、ミオスタチン阻害剤は、ヒトまたはマウスケルベロスタンパク質の全長にわたって、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれ以上の配列同一性を共有するケルベロスポリペプチドである(後掲)。

【0095】

特定の他の態様において、ミオスタチン阻害剤は、ココのN末端切断型を含む、ヒト、マウス、もしくは他の種から得られるココ配列、またはそれらの変種を含むポリペプチドである。全長ヒトココタンパク質は、上記に開示してある。

【0096】

様々なケルベロスおよびココポリペプチドは、融合タンパク質として調製され得る。融合タンパク質は、インビボ安定性、インビボ半減期、接取/投与、組織局在性もしくは分布、タンパク質複合体の形成、および/または精製の1つまたは複数を増強する1つまたは複数のさらなるポリペプチド部分を含み得る。例えば、融合タンパク質は、免疫グロブリンFcドメインならびに/またはエピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジン配列、およびGST融合物から選択される精製サブ配列を含み得る。ミオスタチンアンタゴニストタンパク質は、グリコシリ化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシリ化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合したアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合したアミノ酸から選択される1つまたは複数の修飾アミノ酸残基を含み得る。

20

【0097】

融合タンパク質または結合タンパク質系(例えば、架橋による非融合共有結合)はまた、ミオスタチンに選択的に結合して、ALK7またはALK4受容体の結合と競合するポリペプチド親和性試薬である、第2のミオスタチン阻害剤ドメインを含み得る。親和性試薬は抗体剤であってよい。抗体剤は、例えば、組換え抗体；モノクローナル抗体；VHドメイン；VLドメイン；scFv；Fab断片；Fab'断片；F(ab')2；Fv；またはジスルフィド結合したFv、完全なヒト抗体もしくはヒト化キメラ抗体、またはそれらの抗原結合断片であってよい。親和性試薬は、ミオスタチンに選択的に結合して、ALK7またはALK4受容体の結合と競合するペプチドまたは足場ペプチドである。親和性試薬は、ALK7またはALK4のミオスタチン結合ドメインを含み得る。例えば、ALK7またはALK4(好ましくは、ヒトALK7またはALK4)の細胞外ドメインが用いられ得る。親和性試薬は、ミオスタチンに選択的に結合して、ALK7またはALK4受容体の結合と競合する小有機分子であってもよい。

30

【0098】

ヒトALK7ミオスタチン結合ドメインの例を以下に示す：

LKCVCLLCDSSNFTCQTEGACWASVMLTNGKEQVIKSCVSLPELNAQVFCHSSNNVTKTECCFTDFCNNITLHLP

40

【0099】

ヒトALK4ミオスタチン結合ドメインの例を以下に示す：

ALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPFYCLSSEDLRNTHCCYTDY

50

【0100】

本明細書に示すように、カロンテ、したがってヒトケルベロスおよびおそらくはココもまた、A204レポーター遺伝子アッセイにおいてアクチビンAシグナル伝達を実質的に阻害しない。そのため、そのようなミオスタチンアンタゴニストは、好ましくは、アクチビンA介在性シグナル伝達との相互作用をほとんど示さないと考えられる。

【0101】

IV. 例示的な治療用途

全長およびN末端切断ケルベロス誘導体またはココ誘導体などの本変種ココおよびケルベロスポリペプチドは、ミオスタチンの存在によって生じるかまたはその存在によって悪化する多くの疾患を治療するための、多くの治療の場において使用され得る。

10

【0102】

特定の態様において、本ポリペプチドおよびその誘導体は、筋ジストロフィーの治療の一部として用いられる。「筋ジストロフィー」という用語は、骨格筋ならびに場合によっては心筋および呼吸筋の段階的な衰弱および悪化を特徴とする変性性筋疾患の群を指す。筋ジストロフィーは、筋肉の顕微鏡的变化で始まる、進行性の筋萎縮および筋衰弱を特徴とする遺伝性疾患である。時間とともに筋肉が変性するにつれ、人の筋力は低下する。本ミオスタチンを含む療法を用いて治療し得る例示的な筋ジストロフィーには、以下のものが含まれる：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー(EDMD)、肢帶型筋ジストロフィー(LGMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHまたはFSHD)(ランドジー・デジェリーヌとしても知られる)、筋緊張性ジストロフィー(MMD)(スタイルート病としても知られる)、眼咽頭型筋ジストロフィー(OPMD)、遠位型筋ジストロフィー(DD)、先天性筋ジストロフィー(CMD)。

20

【0103】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、1860年代にフランス人神経学者Guillaume Benjamin Amand Duchenneによって初めて記載された。ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)は、1950年代にDMDのこの変種について初めて記載したドイツ人医師Peter Emil Beckerにちなんで命名されている。DMDは男性における最も頻度の高い遺伝性疾患の1つであり、男児3,500人に1人が罹患する。DMDは、X染色体の短腕上に位置するジストロフィン遺伝子が損傷を受けた場合に発症する。男性はX染色体を1コピーしかもたないため、ジストロフィン遺伝子も1コピーしか存在しない。ジストロフィンタンパク質が存在しないと、筋肉は収縮および弛緩の周期中に容易に損傷を受ける。疾患の初期には筋肉は再生によって補われるが、その後は、筋肉前駆細胞が損傷の進行に対応することができず、健常な筋肉が非機能的な線維脂肪組織に置き換えられる。

30

【0104】

DMDでは、男児は3歳程度で筋衰弱の徵候を示し始める。この疾患は、腕、脚、および軀幹の骨格筋または随意筋を徐々に衰弱させる。10代前半までには、またはそれよりも早く、男児の心筋および呼吸筋も同様に冒され得る。BMDは、DMDのはるかに軽症な形態である。その発症は通常10代または成人早期であり、経過はDMDの経過よりも遅く、またDMDの経過よりもはるかに予測しにくい(DMDおよびBMDはほぼ例外なく男児に発症するが、まれに女児が発症する場合もある)。

40

【0105】

1980年代まで、いずれの種類の筋ジストロフィーも、その原因についてはほとんどわかつていなかつた。1986年に、DMDの原因としてジストロフィン遺伝子欠損が同定された。BMDは、これと同じ遺伝子内の異なる変異によって起こる。BMD患者はある程度のジストロフィンを有するが、その量が不十分であるか、または質が不良である。ある程度のジストロフィンが存在するため、BMD患者の筋肉は、DMD患者の筋肉のようなひどいまたは急速な変性から保護される。

【0106】

最近の研究により、インビボでのミオスタチン機能の遮断または除去が、DMDおよびBMD患者の少なくとも一部の症状を効果的に治療し得ることが実証されている(Bogdanovich e

50

t al.、前記；Wagner et al.、前記)。したがって、本ケルベロス誘導体、特にそのN末端切斷型は、DMDおよびBMD患者においてインビボでミオスタチン機能を遮断する別の手段を構成する。

【0107】

同様に、本ココまたはケルベロス誘導体、特にそのN末端切斷型は、筋肉の成長を必要とする他の疾患状態において筋量を増加させる有効な手段を提供する。例えば、Gonzalez-Cadavid et al.(前記)は、ミオスタチン発現がヒトの除脂肪量指数と逆の相関があること、およびミオスタチン遺伝子の発現増加がエイズ消耗性症候群患者の体重減少と関連があることを報告した。エイズ患者においてミオスタチン機能を阻害することで、完全に除去されないとしても、エイズの少なくとも一部の症状が緩和され得り、したがってエイズ患者の生活の質が顕著に改善される。10

【0108】

ミオスタチン機能の喪失はまた、栄養摂取の減少を伴わない脂肪消失とも関連があるため(Zimmers et al.、前記；McPherron and Lee、前記)、本ココまたはケルベロス誘導体、特にそのN末端切斷型はさらに、肥満症およびII型糖尿病の発症を遅延させるまたは予防する治療薬としても使用され得る。

【0109】

癌性食欲不振-悪液質症候群は、最も衰弱させかつ生命にかかわる癌の局面の1つである。癌性食欲不振-悪液質症候群における進行性の体重減少は、多くの種類の癌に共通する特徴であり、生活の質の低さおよび化学療法への応答不良ばかりでなく、体重減少を伴わない同等の腫瘍を有する患者で見られるよりも短い生存期間の原因となる。食欲不振、脂肪および筋組織の萎縮、心理的苦悩、ならびに生活の質の低さに関連して、悪液質は癌と宿主の間の複雑な相互作用から生じる。悪液質は癌患者の間で最も多く見られる死因の1つであり、死亡時には80%で存在する。悪液質は、タンパク質、炭水化物、および脂肪代謝に影響する代謝無秩序の複合例である。腫瘍は直接的および間接的異常を生じて、食欲不振および体重減少をきたす。現在のところ、この過程を調節するまたは回復させる治療は存在しない。20

【0110】

癌性食欲不振-悪液質症候群は、サイトカイン産生、脂質動員因子およびタンパク質分解誘導因子の放出、ならびに中間代謝の変化に影響を及ぼす。食欲不振はよく見られるが、食物摂取の減少のみで、癌患者に見られる身体組成の変化を説明することはできず、栄養摂取量の増加で消耗性症候群を回復することはできない。発病前の体重の5パーセントを超える非自発的体重減少が6ヶ月の期間内に生じた場合に、癌患者で悪液質が疑われるべきである。30

【0111】

成体マウスにおけるミオスタチンの全身性過剰発現によって、ヒト悪液質症候群に見られる著しい筋肉および脂肪消失と類似した消失が誘導されることが認められたため(Zimmers et al.、前記)、薬学的組成物としての本ココおよびケルベロス誘導体、特にそのN末端切斷型は、筋成長が望まれる悪液質症候群の症状を予防、治療、または緩和するためのミオスタチンアンタゴニスト/遮断剤として有利に用いられ得る。40

【0112】

特定の態様において、本変種ココまたはケルベロスポリペプチド、特にN末端切斷ケルベロス誘導体は、神経変性が関与する疾患の宿主の症状を予防、治療、または緩和するために有利に用いられ得る。いかなる特定の理論に縛られることも望まないが、本ケルベロス誘導体は、野生型ALK7受容体を介して媒介される抑制性のフィードバック機構を遮断し得り、新たなニューロンの成長および分化を可能にする。薬学的組成物としての本ケルベロス誘導体は、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病などを含む、神経変性を伴う疾患の症状を予防、治療、または緩和するために、有利に用いられ得る。

【0113】

10

20

30

40

50

アルツハイマー病(AD)は、徐々に起こり、記憶喪失、異常挙動、人格変化、および思考能力の低下をきたす、慢性の、不治で、かつ制止できない中枢神経系(CNS)疾患である。これらの喪失は、特定の種類の脳細胞の死滅およびそれらの間の連絡の断絶に関連している。

【0114】

ADは、幼児期の発達の逆行として説明されている。大部分のAD患者では、60歳後に症状が現れる。初発症状には、近時記憶の喪失、誤判断、および人格変化が含まれる。疾患後期には、AD患者は、手を洗うなどの単純な課題を行う方法も忘れ得る。最終的に、AD患者はすべての推論能力を失い、日々の世話を他の人に依存するようになる。ついには、この疾患は衰弱性となって、患者は寝たきりになり、典型的に合併症を発症する。AD患者は、最も多くは、疾患の発症から8~20年後に肺炎で死亡する。

【0115】

パーキンソン病(PD)は、徐々に起こり、身体運動の制御不能、硬直、振戦、および歩行困難をきたす、慢性の、不治で、かつ制止できないCNS疾患である。これらの運動系の問題は、筋活動の調節を助ける化学物質であるドーパミンを産生する脳の領域における脳細胞の死滅に関連している。

【0116】

大部分のPD患者では、症状は50歳後に現れる。PDの初期症状は、四肢、特に手、または唇に起こる顕著な振戦である。それに続くPDの特徴的な症状は、運動の硬直または緩慢化、引きずり歩行、前屈姿勢、およびバランス障害である。記憶喪失、認知症、鬱、情緒変化、嚥下困難、異常発語、性機能障害、ならびに膀胱および腸障害など、広範囲にわたる二次的症候が存在する。これらの症状は、フォークを握るまたは新聞を読むなどの日常活動を妨げ始める。最終的に、PD患者は重度障害となって、寝たきりになる。PD患者は通常、肺炎で死亡する。

【0117】

筋萎縮性側索硬化症(ALS；ルー・ゲーリック病；運動ニューロン疾患)は、脳を骨格筋に結びつけるCNSの成分、運動ニューロンを攻撃する、慢性の、不治で、かつ制止できないCNS疾患である。ALSでは、運動ニューロンが変質して最終的には死滅するため、患者の脳は通常、十分に機能し続けかつ機敏なままであるが、運動の命令が筋肉に到達しない。

【0118】

ALSに罹患する大部分の患者は、40~70歳である。衰弱する最初の運動ニューロンは、腕または脚に至る運動ニューロンである。ALS患者は歩行困難を有し得り、物を落とす、転倒する、不明瞭に発音する、および制御不可能に笑ったり泣いたりする場合がある。最終的に、四肢の筋肉は、使われないために萎縮し始める。この筋力低下が衰弱性となり、患者は車椅子を必要とするか、またはベッドの外で機能できなくなる。大部分のALS患者は、疾患の発症から3~5年後に、呼吸不全または肺炎に似た人工呼吸器支援の合併症で死亡する。

【0119】

これらの神経疾患の原因は、大部分が依然として不明である。これらは従来異なる疾患として定義されているが、基本的な経過において並外れた類似性を明らかに示し、偶然のみから予想されるよりもはるかに多くの重複した症状を示す。現行の疾患の定義は、重複の問題を適切に扱うことができず、神経変性疾患の新たな分類が求められている。

【0120】

ハンチントン病(HD)は、脳の特定領域にあるニューロンの、遺伝的にプログラムされた変性によって生じる別の神経変性疾患である。この変性は、無制御運動、知的能力の喪失、および情緒障害をきたす。HDは、野生型遺伝子における優性変異を通して親から子へ伝わる家族性疾患である。HDのいくつかの初期症状は、気分変動、鬱、短気、または運動、新しいことの学習、事実の記憶、もしくは意思決定の困難である。疾患が進行するにつれ、知的課題への集中が次第に困難になり、患者は自力で食べることおよび飲み込むことも困難となり得る。疾患の進行速度および発症年齢は、人によって異なる。

10

20

30

40

50

【0121】

ティ・サックス病およびサンドホフ病は、リソソーム -ヘキソサミニダーゼの欠如によって起こる糖脂質蓄積疾患である(Gravel et al., in The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, New York, pp. 2839-2879, 1995)。いずれの疾患においても、G_{M2} ガングリオシドおよび -ヘキソサミニダーゼの関連糖脂質基質が神経系に蓄積し、急性神経変性を誘発する。最も重篤な形態では、症状の発症は早期乳児期に始まる。次いで急激な神経変性経過が続き、罹患乳児は、運動機能障害、てんかん発作、視力喪失、および聴覚障害を示す。通常、2~5歳までに死亡する。アポトーシス機構を介したニューロンの喪失が実証されている(Huang et al., Hum. Mol. Genet. 6: 1879-1885, 1997)。

10

【0122】

アポトーシスが、免疫系においてエイズ発症の一因となることは周知である。しかし、HIV-1はまた神経疾患も誘発する。Shi et al.(J. Clin. Invest. 98: 1979-1990, 1996)は、インビトロモデルおよびエイズ患者の脳組織において、中枢神経系(CNS)のHIV-1感染によって誘導されるアポトーシスについて調べ、初代脳培養物のHIV-1感染により、インビトロにおいてニューロンおよびアストロサイトでアポトーシスが誘導されることを見出した。ニューロンおよびアストロサイトのアポトーシスはまた、HIV-1認知症患者5/5および非認知症患者4/5を含むエイズ患者10/11の脳組織でも検出された。

20

【0123】

ニューロンの喪失はまた、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病、ウシのBSE(狂牛病)、ヒツジおよびヤギのスクレイピー病、ならびにネコの猫海綿状脳症(FSE)などのプリオン病の顕著な特徴である。

30

【0124】

N末端切断ケルベロス誘導体をはじめとする本ケルベロス誘導体はまた、以下に記載するような様々なPNS疾患の症状を予防、治療、および緩和するのにも有用である。PNSは、CNSに至るまたはCNSから分岐する神経から構成される。末梢神経は、感覚機能、運動機能、および自律機能を含む、身体の多様な機能をつかさどる。個体が末梢神経障害を有する場合、PNSの神経は損傷を受けている。神経損傷は、疾患、肉体的損傷、中毒、または栄養不良などの多くの原因から起こり得る。これらの病因は、求心性神経または遠心性神経を冒し得る。損傷の原因によって、神経細胞軸索、その保護的な髓鞘、またはその両方が損傷または破壊され得る。

30

【0125】

末梢神経障害という用語は、脳および脊髄外の神経 末梢神経 が損傷された広範な疾患を包含する。末梢神経障害はまた末梢神経炎とも称され得り、または多くの神経が関与する場合には、多発性神経障害もしくは多発性神経炎という用語が使用され得る。

40

【0126】

末梢神経障害は広範な障害であり、根底には多くの原因が存在する。これらの原因には、糖尿病のように一般的なものもあれば、アクリルアミド中毒および特定の遺伝性疾患など、極めて稀なものもある。末梢神経障害の最もよく見られる世界的な原因是、ハンセン病である。ハンセン病は、罹患患者の末梢神経を攻撃する細菌、ライ菌(*Mycobacterium leprae*)によって起こる。世界保健機構によって収集された統計によると、世界的に見て、推定115万人の人がハンセン病に罹患している。

【0127】

米国では、ハンセン病は極めて稀であり、糖尿病が末梢神経障害の最も一般的な既知原因である。米国およびヨーロッパでは、1千7百万人を超える人が、糖尿病関連多発性神経障害を患っていると推定されている。多くの神経障害は特発性であり、既知の原因を見出すことができない。米国で最も多く見られる遺伝性末梢神経障害はシャルコー・マリー・トゥース病であり、約125,000人の人がこの疾患に罹患している。

【0128】

よく知られた別の末梢神経障害はギラン・バレー症候群であり、これは、サイトメガロ

50

ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)などのウイルス疾患、またはカンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)およびライム病を含む細菌感染に伴う合併症から生じる。世界的な発生率は、年間で100,000人当たり約1.7症例である。末梢神経障害のよく知られたその他の原因には、慢性アルコール依存症、水痘帯状疱疹ウイルス感染、ボツリヌス中毒、および灰白髄炎が含まれる。末梢神経障害は一次症状として発現する場合もあれば、別の疾患が原因である場合もある。例えば、末梢神経障害は、アミロイドニューロパシー、特定の癌、または遺伝性神経障害などの疾患の唯一の症状である。そのような疾患は、末梢神経系(PNS)および中枢神経系(CMS)、ならびに他の身体組織を冒し得る。

【0129】

10

本ケルベロス誘導体、特にN末端切断ケルベロスで治療し得る他のPNS疾患には、以下のものが含まれる：腕神経叢神経障害(頸部および第一胸部神経根、神経幹、神経束、ならびに腕神経叢の末梢神経成分の疾患。臨床症状には、上肢の局所疼痛、知覚異常；筋衰弱、および感覚低下が含まれる。この疾患は、出生時外傷をはじめとする外傷；胸郭出口症候群；新生物、神経炎、放射線治療；および他の病態に関連している可能性がある。Adams et al., *Principles of Neurology*, 6th ed, pp1351-2を参照されたい)；糖尿病性神経障害(糖尿病に関連した末梢神経、自律神経、および脳神経障害。この病態は、通常、神経を満たす小血管(神経栄養血管)を含む、糖尿病性微小血管損傷に起因する。糖尿病性神経障害に関連していると考えられる、比較的よく見られる病態には、第三神経麻痺；単神経障害；多発性単神経炎；糖尿病性筋萎縮症；有痛性多発性神経障害；自律神経障害；および胸腹部神経障害が含まれる。Adams et al., *Principles of Neurology*, 6th ed, pp1325を参照されたい)；単神経障害(分離した、または広汎性末梢神経障害の証拠に対して不釣り合いな、单一の末梢神経が関与する疾患または外傷。多発性単神経炎は、複数の分離した神経損傷を特徴とする病態を指す。単神経障害は、虚血；外傷；圧迫；結合組織病；蓄積外傷疾患；およびその他の病態を含む多種多様な原因に起因し得る)；神経痛(末梢神経または脳神経の進路または分布に沿って起こる激痛またはうずく痛み)；末梢神経系新生物(末梢神経組織から生じる新生物。これには、神経線維腫；シュワン腫；顆粒細胞腫；および悪性末梢神経鞘腫瘍が含まれる。DeVita Jr et al., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th ed, pp1750-1を参照されたい)；神経圧迫症候群(内因または外因による、神経または神経根の力学的圧迫。これは、例えば髄鞘機能障害または軸索消失に起因して、神経インパルスの伝導ブロックをきたし得る。神経および神経鞘の損傷は、虚血；炎症；または直接的な力学的影響によって起こり得る)；神経炎(末梢神経または脳神経の炎症を示す一般用語。臨床症状には、疼痛；知覚異常；不全麻痺；または感覚鈍麻が含まれる)；多発性神経障害(複数の末梢神経の疾患。影響を受ける神経の種類により(例えば、感覚、運動、または自律)、神経損傷の分布により(例えば、遠位 対 近位)、主に影響を受けた神経成分により(例えば、脱髓性 対 軸索)、病因により、または遺伝のパターンにより、様々な形態が分類される)。

【0130】

30

特定の態様において、本全長ココもしくはケルベロスポリペチド、またはその変種は、以下に記載するような、BMPの過剰なまたは望ましくないレベルによって特徴づけられる疾患または病態の治療の一部として使用される。

40

【0131】

50

筋肉、腱、および韌帯の異所性骨化は、整形外科医が直面する、頻繁に起こる問題である。Hannallah et al.(J Bone Joint Surg Am. 2004 Jan; 86-A(1):80-91)は、ノギン(BMP[骨形成タンパク質]アンタゴニスト)が、異所性骨化を阻害する能力について検討した。3つの異なる用量のノギン発現筋肉由来幹細胞は、BMP-4発現筋肉由来幹細胞によって誘発される異所性骨化を阻害した。3つの異なる用量のノギン発現筋肉由来幹細胞はそれぞれ、脱灰骨基質によって誘発される異所性骨化も有意に阻害した。アキレス腱切除した11匹の動物はすべて、対照肢の損傷部位に異所性骨化を生じた。対照的に、ノギン発現筋肉由来幹細胞で処置した肢では、異所性骨化が83%減少し、11匹の動物のうち8匹では、X線撮

影による異所性骨化の証拠は見られなかった($P<0.05$)。このように、筋肉由来幹細胞によって媒介されるノギンの送達は、動物モデルにおいて、BMP-4、脱灰骨基質、および外傷によって起こる異所性骨化を阻害し得り、BMP阻害因子(ノギンまたはケルベロス)を送達する遺伝子療法が、身体の標的領域における異所性骨化を阻害する有力な方法となり得ることが示される。Glaser et al.(J Bone Joint Surg Am. 2003 Dec; 85-A(12):2332-42)もまた参照されたい。

【0132】

変形性関節症(OA)は、骨棘発生、線維症、および関節軟骨損傷を特徴とする関節疾患である。外因性のトランスフォーミング増殖因子(TGF-)アイソフォームおよび骨形成タンパク質(BMP)の影響から、OAの発症におけるこれらの増殖因子の役割が示唆される。Scharstuhl et al.(Arthritis Rheum. 2003 Dec; 48(12):3442-51)は、TGF- α -アンタゴニストおよびBMPアンタゴニストのアデノウイルスによる過剰発現を用いて、TGF- α およびBMPのシグナル伝達を遮断した。試験した阻害因子には、マウス潜伏関連ペプチド1(mLAP-1)と称される分泌性汎特異的TGF- α -アンタゴニスト、細胞内抑制性Smad6(BMPアンタゴニスト)、およびSmad7(TGF- β /BMP阻害因子)が含まれる。パパインの関節内注射により、滑膜および軟骨において、いくつかのTGF- α およびBMPアイソフォームのタンパク質発現増加が起こった。関節内にアデノウイルスをトランスフェクトすると、滑膜被覆において導入遺伝子が強力に発現された。mLAP-1、Smad6、およびSmad7の過剰発現により、骨棘形成が対照と比較して有意に減少した。Smad6およびSmad7の過剰発現により、滑膜肥厚も有意に減少した。さらに、分泌性TGF- α 阻害因子mLAP-1により、関節軟骨のPG減少が増加した。これらの結果から、骨棘および滑膜肥厚の発生における過剰な内因性TGF- α およびBMPの極めて重要な役割が示され、OAの発症における過剰な内因性TGF- α およびBMPが意味づけられる。対照的に、内因性TGF- α による軟骨損傷の阻止により、関節軟骨におけるTGF- α の保護的役割が示唆される。したがって、本ココまたはケルベロス薬学的組成物をBMPアンタゴニストとして使用して、骨棘および滑膜肥厚の発生を含むOAを治療することができる。

【0133】

正常卵巣表面上皮(OSE)および卵巣癌(OC)細胞の解析において、Shepherd and Nachtigal(Endocrinology. 2003 Aug; 144(8):3306-14)は、BMP4 mRNA発現を認め、初代OC細胞が成熟BMP4を産生することを見出した。さらに、下流シグナル伝達経路の各メンバーが、初代OSEおよびOC細胞で発現された。BMP4による処理に際し、正常OSEおよびOC細胞において、Smad1はリン酸化され、核移行を起こした。興味深いことに、BMP標的遺伝子ID1およびID3は、正常OSEでは2~3倍の増加であるのに対して、初代OC細胞では10~15倍上方制御された。いくつかの初代OC細胞の増殖は、BMP4処理によってあまり変化しなかった。しかし、初代OC細胞を長期的にBMP4で処理すると、細胞密度の減少、ならびに細胞の伸展および接着の増加が起こった。これらのデータから、正常OSEおよびOC細胞におけるBMPシグナル伝達の存在および推定上の機能が実証され、よって、本ケルベロス薬学的調製物を用いて、OC発症におけるBMP4シグナル伝達を制御することができる。

【0134】

異所性骨形成を特徴とする稀な遺伝性身体障害疾患である進行性骨化性線維形成異常症(FOP)は、その発症に関する骨形成タンパク質(特にBMP-4)が、骨格形態形成において役割を果たすことが知られており、BMP-4に対する遺伝子アンタゴニスト(ノギンなど)が層板骨形成の阻止に有用であり得ることから、一般薬に関して特に興味がもたれる。Blaszczyk et al.(Eur J Dermatol. 2003 May-Jun; 13(3):234-7)を参照されたい。したがって、本ケルベロス治療薬はまた、FOPを治療するためにも使用できる。

【0135】

アテローム性動脈硬化症は、現在、分岐した動脈における、振動性剪断応力(OS)をはじめとする乱れた流動条件に曝露された動脈において優先的に起こる炎症性疾患と見なされている。Sorescu et al.(J Biol Chem. 278(33):31128-35, 2003)は、BMP4が、損傷易発性領域におけるアテローム発生の初期段階において重要な役割を果たす、機械感覚性炎症

10

20

30

40

50

性因子であることを示唆している。したがって、本ケルベロス治療薬を用いて、このような領域におけるアテローム形成の初期段階で、BMP-4誘導性炎症応答を調節することが可能である。

【0136】

頭蓋発生過程では、頭蓋結合組織の下部構造が膜内骨化を起こして、頭蓋骨(頭蓋冠)を形成する。頭蓋冠骨が脳を覆うように進展するにつれ、頭蓋冠板の間に線維性縫合が形成される。脳の拡大は、頭蓋縫合複合体内の一連の組織相互作用を介して、頭蓋冠の成長と共に進行している。頭蓋骨癒合症または早期頭蓋縫合癒合は、異常な頭部形態、失明、および精神遅滞をきたす。最近の研究により、線維芽細胞増殖因子受容体(fgfr)の機能獲得変異が、症候性型の頭蓋骨癒合症と関連があることが実証されている。骨形成タンパク質(BMP)のアンタゴニストであるノギンは、胚の神経幹、体節、および骨格のパターン形成に必要である。Warren et al.(Nature. 2003 Apr 10; 422(6932):625-9)は、ノギンが、開存性の頭蓋縫合の縫合間充織において出生後に発現されるが、癒合した頭蓋縫合の縫合間充織では発現されないこと、ならびにノギン発現がFGF2および症候性fgfrシグナル伝達によって抑制されることを示している。ノギンの誤発現はインビトロおよびインビボにおいて頭蓋縫合癒合を妨げるため、症候性のfgfr媒介性頭蓋骨癒合症は、ノギン発現の不適切な下方制御のために、異常に高いBMP活性が生じた結果であることが示唆される。したがって、本ケルベロス治療薬を使用して、そのような病態を予防または治療するために、BMP活性を下方制御することができる。

【0137】

V. 例示的な製剤

本組成物は、単独で、または他の化合物/薬学的組成物との併用療法の一部として使用することができる。

【0138】

本方法で使用するための、N末端切断ケルベロス誘導体治療薬をはじめとする可溶性ココまたはケルベロス誘導体治療薬は、水、緩衝生理食塩水、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)、またはそれらの適切な混合物などの生物学的に許容される媒体を用いて、投与用に簡便に製剤化され得る。選択された媒体中での有効成分の最適濃度は、薬化学者に周知の手順に従って、実験により決定することができる。本明細書で用いる「生物学的に許容される媒体」には、薬学的調製物の所望の投与経路に適していると考えられるあらゆる溶媒、分散媒体などが含まれる。薬学的に活性のある物質に対するそのような媒体の使用は、当技術分野において周知である。従来の媒体または薬剤が治療薬の活性と適合しない場合を除き、本発明の薬学的調製物におけるその使用が意図される。適切な賦形剤および他のタンパク質を含めたこれらの製剤化は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA 1985)という本に記載されている。これらの賦形剤には、注射用「デポー(deposit)製剤」が含まれる。

【0139】

本発明の薬学的製剤には、動物用組成物、例えば、家畜(live stock)(ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、およびウマなど)または家畜(domestic animal)(例えば、ネコおよびイヌ)を治療するためなど、動物への使用に適したココまたはケルベロス誘導体治療薬の薬学的調製物などもまた含まれ得る。

【0140】

本発明の方法はまた、再充填可能な、または生分解性の装置により提供され得る。近年、様々な徐放性ポリマー装置が開発されており、タンパク質性生物薬剤をはじめとする薬物の制御送達に関して、インビボで試験が行われている。生分解性および非分解性ポリマーを含む様々な生体適合性ポリマー(ヒドロゲルを含む)を用いて、特定の標的部位において治療薬を持続放出するためのインプラントを形成することができる。

【0141】

本発明による薬学的組成物は、単回用量または複数回用量として投与され得る。本発明

10

20

30

40

50

の薬学的組成物は、個々の治療薬として、または他の治療薬と併用して投与され得る。本発明の治療は従来の治療法と併用することができ、これらは順次的にまたは同時に投与され得る。本発明の薬学的組成物は、ココまたはケルベロス誘導体を標的細胞/組織/器官に到達させ得る任意の手段によって投与することができる。いくつかの態様において、投与経路には、経口、膀胱内、静脈内、動脈内、腹腔内投与、標的細胞が存在する器官の血液供給への局所投与、または細胞への直接投与からなる群より選択される投与経路が含まれる。静脈内投与が好ましい投与方法である。これは、注入ポンプを使用して達成され得る。

【0142】

本明細書で使用する「非経口投与」および「非経口投与する」という語句は、腸内投与および局所投与以外の、一般に注射による投与方法を意味し、これには、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内注射および注入が含まれる。

【0143】

本明細書で使用する「全身投与」、「全身投与する」、「末梢投与」、および「末梢投与する」という語句は、それが患者の全身に進入して、代謝および他の同様の過程に供されるような、中枢神経系への直接投与以外の、化合物、薬物、または他の物質の投与(例えば、皮下投与)を意味する。

【0144】

これらの化合物は、経口、膀胱内、例えば噴霧剤によるような経鼻、直腸、腔内、非経口、槽内、ならびに口腔内および舌下を含む、粉末剤、軟膏剤、またはドロップ剤によるような局所投与を含む、任意の適切な投与経路により、治療目的でヒトおよび他の動物に投与することができる。

【0145】

選択した投与経路に関係なく、適切な水和形態で使用することができる本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物は、下記のような、または当業者に周知の他の従来法により説明されるような薬学的に許容される剤形に製剤化される。

【0146】

本発明の薬学的組成物中の有効成分の実際の投薬量レベルは、患者に毒性をもたらすことなく、特定の患者、組成物、および投与方法に対し所望の治療応答を達成するのに効果的な有効成分の量を得るように変動し得る。

【0147】

選択される投薬量レベルは、使用する本発明の特定の化合物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用する特定の化合物の排泄率、治療期間、使用する特定の治療薬と併用して使用する他の薬物、化合物、および/または物質、治療を受ける患者の年齢、性別、体重、病状、全体的な健康状態、および以前の病歴、ならびに医学の技術分野において周知である同様の要因を含む様々な要因に依存することになる。

【0148】

当技術分野において通常の技術を有する医師または獣医師は、必要な薬学的組成物の有効量を容易に決定し処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物で使用される本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルより低いレベルから開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることができる。

【0149】

一般に、本発明の化合物の適切な一日用量は、治療効果を得るために有効な最低用量の化合物量である。そのような有効用量は、一般に、上記の要因に依存することになる。一般に、患者に対する本発明の化合物の静脈内、脳室内、および皮下用量は、約0.0001~約100 mg/kg体重/日である。

【0150】

10

20

30

40

50

必要に応じて、活性化合物の有効一日用量は、任意に単位剤形で、終日かけて適切な間隔で別個に投与する2、3、4、5、6、またはそれ以上の下位用量として投与してもよい。

【 0 1 5 1 】

「治療」という用語は、予防、治療法、および治癒もまた包含することを意図する。

【 0 1 5 2 】

この治療を受ける患者は、一般的に、靈長類(特にヒト)、ならびにウマ、ウシ、ブタ、およびヒツジなどの他の非ヒト哺乳動物；ならびに家禽およびペットを含む、それを必要としている任意の動物である。

【 0 1 5 3 】

本発明の化合物は、それ自体で、または薬学的に許容される担体との混合物として投与され得り、また同様に、ペニシリン、セファロスポリン、アミノグリコシド、および糖ペプチドなどの他の抗菌剤と併用して投与され得る。したがって併用療法は、次の投与時に、最初に投与された活性化合物の治療的効果が完全に消失していない方法での、活性化合物の順次的、同時、および別個の投与を含む。

【 0 1 5 4 】

特定の製剤と併用することで、本ココまたはケルベロス誘導体は有効な可溶性薬剤となり得る。治療ポリペプチドは、溶解度を促進する第2ペプチドとの融合ペプチドとして提供され得る。例えば、本発明のケルベロス誘導体は、溶解度および/または血清安定性を促進し得る免疫グロブリンのヒンジまたはFc部分のすべてまたは断片を伴う融合ポリペプチドの一部として提供され得る。

【 0 1 5 5 】

本発明は、本明細書に記載する本ポリペプチド誘導体のペプチド模倣配列もまた意図する。

(0 1 5 6)

一般に、本明細書において使用する命名法および本発明において利用する実験手順は、分子的技術、生化学的技術、微生物学的技術、および組換えDNA技術を含む。そのような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 Sambrook et al., (1989); 「Current Protocols in Molecular Biology」 Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号; 第4,683,202号; 第4,801,531号; 第5,192,659号、および第5,272,057号に記載の方法; 「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); 「Current Protocols in Immunology」 Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W. H. Freeman and Co., New York (1980)を参照されたい; 利用できる免疫測定法は、特許および科学文献に広範囲に記載されており、例えば、米国特許第3,791,932号; 第3,839,153号; 第3,850,752号; 第3,850,578号; 第3,853,987号; 第3,867,517号; 第3,879,262号; 第3,901,654号; 第3,935,074号; 第3,984,533号; 第3,996,345号; 第4,034,074号; 第4,098,876号; 第4,879,219号; 第5,011,771号、および第5,281,521号; 「Oligonucleotide Synthesis」 Gait, M. J., ed. (1984); 「Nucleic Acid Hybridization」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); 「Transcription and Translation」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); 「Animal Cell Culture」 Freshney, R. I., ed. (1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」 IRL Press (1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」 Perbal, B., (1984)、および「Methods in Enzymology」 Vol. 1-317, Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Acad-

demic Press, San Diego, Calif. (1990); Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」 CSHL Press (1996)を参照されたい。これらはすべて、本明細書において完全に記載されているがごとく、参照により組み入れられる。他の一般的な参考文献は、本文書中を通して提供されている。参考文献中の手順は当技術分野において周知であると考えられ、読者の利便性のために提供するものである。参考文献に含まれる情報はすべて、参照により本明細書に組み入れられる。

【0157】

実施例

ここに本発明を広く説明したが、本発明は、以下の実施例を参照することによってより容易に理解されると考えられる。以下の実施例は、本発明の特定の態様および態様を単に説明する目的で含めるものであって、本発明を限定することを意図していない。

【0158】

実施例1. カロンテおよびヒトケルベロスタンパク質の供給源。

ヒトケルベロス配列を、ヒトCMV由来発現ベクターにクローニングした。この構築物を、ポリエチレンイミン(PEI)を用いて、HEK293細胞に一過性にトランスフェクトした。培養後、細胞を回収し、精製のために馴化培地を収集した。

【0159】

カロンテ(ニワトリ由来)は、R&D Systems(ミネソタ州、ミネアポリス)から入手した。

【0160】

実施例2. GDF-11に対するカロンテの結合。

GDF-11は、神経過程を制御するミオスタチンの近縁相同体である。標準的なアミンカッティング手順を用いて、GDF-11をBiaCore CM5チップ上に固定化した。追跡：カロンテ(200 μg/ml; R&D Systems)を、GDF-11を結合したチップ上に注入した。図4の追跡から、GDF-11に対するカロンテの結合が示される。

【0161】

実施例3. GDF-11およびミオスタチン介在性シグナル伝達を阻害するカロンテおよびヒトケルベロス。

A-204レポーター遺伝子アッセイを用いて、GDF-11、ミオスタチン、およびアクチビンAによるシグナル伝達に及ぼすカロンテおよびケルベロスの影響を評価した。細胞株：ヒト横紋筋肉腫(筋肉由来)。レポーターベクター：pGL3(CAGA)12(Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100に記載されている)。図5を参照されたい。CAGA12モチーフがTGF-応答遺伝子(PAI-1遺伝子)内に存在するため、このベクターは、Smad2およびSmad3を介してシグナル伝達する因子に一般的に有用である。

1日目：A-204細胞を48ウェルプレートに分割する。

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

3日目：因子(培地+0.1% BSAに希釀)を添加する。阻害因子は、細胞に添加する1時間前に、因子と共にプレインキュベートしておく必要がある。6時間後、細胞をPBSですすぎ、細胞を溶解する。

【0162】

この後ルシフェラーゼアッセイを行う。阻害因子が存在しない場合、アクチビンAはレポーター遺伝子発現の10倍の促進、およびED50~2 ng/mlを示した。GDF-8: ED50: ~5 ng/ml、15倍の促進。GDF-11: 16倍の促進、ED50: ~1.5 ng/ml。

【0163】

図6に示すように、A204レポーター遺伝子アッセイにおいて、カロンテはGDF-11シグナル伝達を阻害する。ActRIIA-Fc(「IIA muG2a」)融合物もまた、GDF-11シグナル伝達を阻害する。図7に示すように、A204レポーター遺伝子アッセイにおいて、カロンテはアクチビンAを阻害しない。ActRIIA-Fc融合物(「IIA muG2a」)は、予想通り、アクチビンAシグナル伝達を阻害する。したがって、カロンテはGDF-11/ミオスタチンの選択的阻害因子で

10

20

30

40

50

あり、アクチビンAシグナル伝達に影響しない。この種類の選択性により、カロンテ、ケルベロス、およびココが、治療薬として使用した場合に、比較的副作用が少ないことが示唆される。予想される通り、ケルベロスはカロンテと非常によく似た挙動を示し、ミオスタチンシグナル伝達を阻害した。図8を参照されたい。

【0164】

同等物

当業者は、通常の実験のみを使用して、本明細書に記載した本発明の特定の態様との多くの同等物を認識し、または確認することができると考えられる。このような同等物も、特許請求の範囲に含まれることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0165】

【図1】完全なC末端Cysノットドメインを示す、全長およびN末端切斷型のケルベロスの模式図である。下のパネルは、BMP-7に結合したノギン(Noggin)の結晶構造に基づいた、ケルベロスのN末端欠失の予測位置を示す。

【図2】Wnt、ノダル、およびBMPが結合するケルベロスの位置の模式図を示す。BMP-2および高度に近縁のBMP-4は、おそらく同じ領域で、ケルベロスと競合的に結合する。TGF-1、EGF、およびPDGFなどの、他のより遠縁のまたは非関連のタンパク質は、BMP-4と競合しない。N末端切斷型のケルベロスは、なおXnr-1(マウスノダルのツメガエル相同体)と結合する。

【図3】BMP阻害因子であるココを示す。(A) コード領域を含むヌクレオチド配列、および対応する翻訳されたアミノ酸配列を示す、ツメガエルココのヌクレオチド配列。(B) ツメガエル、フグ、ヒト、およびマウスのココ、および他のファミリーメンバー、ケルベロスおよびカロンテのアミノ酸レベルでのアライメント。参照により本明細書に組み入れられる、Bell et al. (2003) *Development* 130(7): 1381-1389を参照されたい。

【図4】GDF-11に対するカロンテの結合を示す。追跡から、カロンテが、BiaCoreチップ上のGDF-11に結合することが示される。GDF-11は、標準的なアミンカップリング手順を用いて、BiaCore CM5チップ上に固定化した。追跡：カロンテ(200 μg/ml; R&D Systems)を、GDF-11を結合したチップ上に注入した。

【図5】A-204レポーター遺伝子アッセイを示す。図は、レポーターベクター：pGL3(CAGA)12を示す(Dennler et al., 1998, EMBO 17: 3091-3100に記載されている)。CAGA12モチーフがTGF-応答遺伝子(PAI-1遺伝子)内に存在するため、このベクターは、Smad2およびSmad3を介してシグナル伝達する因子に一般的に有用である。

【図6】A-204レポーター遺伝子アッセイにおいて、カロンテはGDF-11シグナル伝達を阻害する。ActRIIA-Fc(「IIA muG2a」)融合物もまた、GDF-11シグナル伝達を阻害する。

【図7】A-204レポーター遺伝子アッセイにおいて、カロンテはアクチビンAを阻害しない。ActRIIA-Fc融合物(「IIA muG2a」)は、予想通り、アクチビンAシグナル伝達を阻害する。

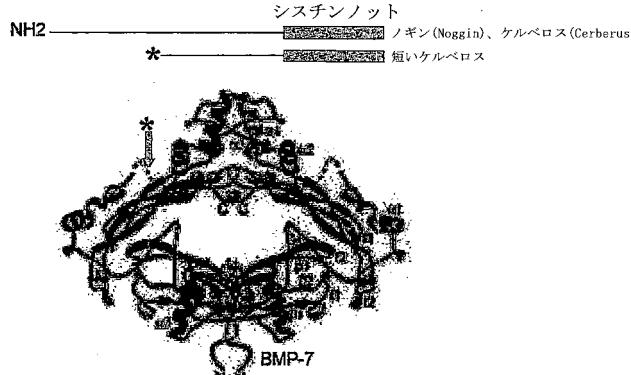
【図8】A-204レポーター遺伝子アッセイにおいて、ケルベロスおよびカロンテはいずれもGDF-8シグナル伝達を阻害する。

10

20

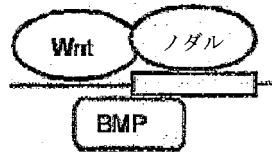
30

【図1】



シスチンノット
ノギン(Noggin)、ケルベロス(Cerberus)
短いケルベロス

【図2】

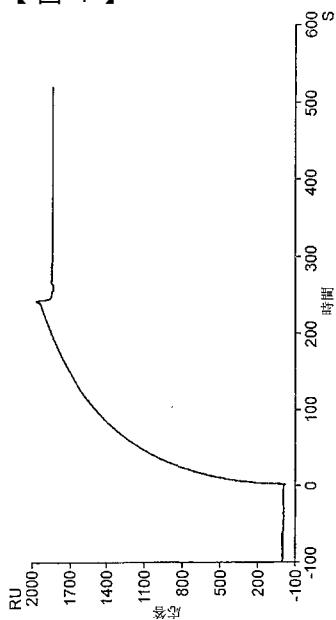


】

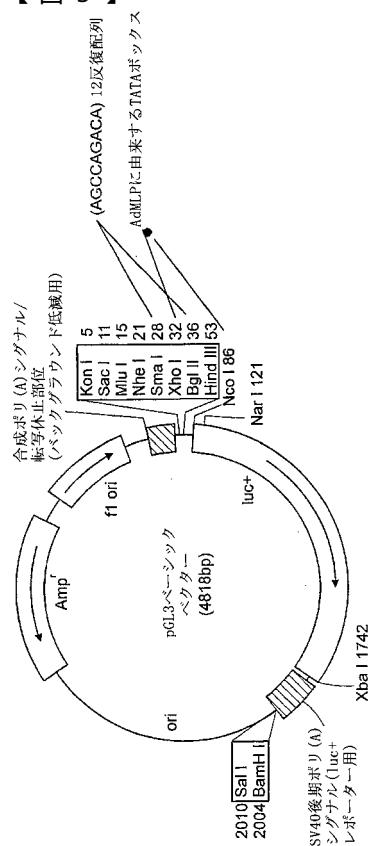
P	N	K	F	C	P	G	Q	C	N	S	F	Y	V	P	G	W	P	A	G	L	S	
529	CCT	AAC	AAG	TTC	TGT	TTT	GGG	CAG	TGC	AAC	TCC	TTC	TAT	GGG	CCT	GTT	TGG	CCT	GCC	GGA	CTC	TCC
Q	P	C	T	S	C	A	P	S	R	S	R	R	I	S	L	P	L	R	C	R	S	3
595	CAG	CCC	TGT	AGC	TCC	TCC	GCC	CCC	AGT	CGA	TCC	TCC	CGC	ATT	TGG	CGG	TTA	CCC	TGT	CCT	TCC	A
G	H	L	A	W	Q	E	V	E	L	V	E	S	C	E	C	B	T	R	Y	D	R	-
661	GCT	CAC	CCT	GCT	TGG	CMA	GAG	GCG	GAG	CAG	TGG	TGC	GAG	TGC	GAA	ACC	CCC	TAC	GAC	AGG	2	
N	T	V	E	P	A	G	S	G	E	D	Y	L	P	V	S	*						】
727	ATT	ACG	GTC	GAG	CCA	GCT	GCG	AGC	GGG	GAG	GAC	TAC	CTG	CCC	GTT	TCA	TAG	GCC	CRA	ACC	GCT	CTA
793	CAT	GTC	CCC	AAA	TGG	ACC	AAA	CBA	TGA	TGT	GAC	CGG	CCT	TGG	CGC	TCC	CAG	TAA	CCT	CAC	CCT	TTG
859	ACA	GCG	GTC	COT	TGG	CCA	AAG	CAG	GGG	AGG	TCA	TCA	TCA	CCT	GAC	TCT	TAT	ATA	TAA	GAA	TGA	ACA
925	GTT	CTG	ACC	GAC	GTC	TGA	TTT	ATA	CGC	TTC	TCA	GAA	TTC	CCA	GAA	CCT	GAC	TCT	TAT	ATA	GTG	3
991	ACG	AGG	CTC	CCG	CTT	TAT	TGG	CCA	AAG	CAG	GGG	AGG	TCA	ACA	TGG	GGG	AAAT	TGT	TCC	TCT	TAT	A
1057	TGT	ACC	CGG	GAG	ACT	GTC	CTG	CCA	TAT	TGT	GTC	TAT	AGG	GSC	TGT	GCC	CCT	GCT	CAT	CAT	CAT	1
1123	CTT	TTA	TAC	AGG	TCA	TCC	TTC	TAT	TGG	TGG	TTA	TCA	TTC	TCA	GTC	AGT	CCT	GTC	ATAT	GTC	ATAT	】
1189	TCA	ACT	TTC	CAG	ACC	GCG	TCT	ATA	AGT	GTC	ATG	GTC	ATT	GAT	GCA	TTC	TTC	CTG	CAC			
1255	TGC	TGG	TTC	TCA	CTC	TTC	AAA	TAA	TGA	TGT	AGG	TCA	TTC	TGC	TGG	GCT	GCA	TGT	GCA			
1321	TGG	TGG	GAG	TCT	GAG	CCA	GCA	GTC	GAG	ATA	ACA	GAC	ATG	GTC	TCA	ATG	AGC	ATG	GAC			
1387	TTT	TTC	CTA	GRA	CCA	GTC	GAA	ATA	AGG	ATA	TAT	TGG	GAA	TTC	GTC	TTA	TTC	CTG	ATT	TAA	AGC	A

xココ(Coco) (1) **1** AGKRSRGRH¹ PPTP² PPKP³ PPTP⁴ PPKP⁵ PPTP⁶ PPKP⁷ PPTP⁸ PPKP⁹ PPTP¹⁰ PPKP¹¹ PPTP¹² PPKP¹³ PPTP¹⁴ PPKP¹⁵ PPTP¹⁶ PPKP¹⁷ PPTP¹⁸ PPKP¹⁹ PPTP²⁰ PPKP²¹ PPTP²² PPKP²³ PPTP²⁴ PPKP²⁵ PPTP²⁶ PPKP²⁷ PPTP²⁸ PPKP²⁹ PPTP³⁰ PPKP³¹ PPTP³² PPKP³³ PPTP³⁴ PPKP³⁵ PPTP³⁶ PPKP³⁷ PPTP³⁸ PPKP³⁹ PPTP⁴⁰ PPKP⁴¹ PPTP⁴² PPKP⁴³ PPTP⁴⁴ PPKP⁴⁵ PPTP⁴⁶ PPKP⁴⁷ PPTP⁴⁸ PPKP⁴⁹ PPTP⁵⁰ PPKP⁵¹ PPTP⁵² PPKP⁵³ PPTP⁵⁴ PPKP⁵⁵ PPTP⁵⁶ PPKP⁵⁷ PPTP⁵⁸ PPKP⁵⁹ PPTP⁶⁰ PPKP⁶¹ PPTP⁶² PPKP⁶³ PPTP⁶⁴ PPKP⁶⁵ PPTP⁶⁶ PPKP⁶⁷ PPTP⁶⁸ PPKP⁶⁹ PPTP⁷⁰ PPKP⁷¹ PPTP⁷² PPKP⁷³ PPTP⁷⁴ PPKP⁷⁵ PPTP⁷⁶ PPKP⁷⁷ PPTP⁷⁸ PPKP⁷⁹ PPTP⁸⁰ PPKP⁸¹ PPTP⁸² PPKP⁸³ PPTP⁸⁴ PPKP⁸⁵ PPTP⁸⁶ PPKP⁸⁷ PPTP⁸⁸ PPKP⁸⁹ PPTP⁹⁰ PPKP⁹¹ PPTP⁹² PPKP⁹³ PPTP⁹⁴ PPKP⁹⁵ PPTP⁹⁶ PPKP⁹⁷ PPTP⁹⁸ PPKP⁹⁹ PPTP¹⁰⁰ PPKP¹⁰¹ PPTP¹⁰² PPKP¹⁰³ PPTP¹⁰⁴ PPKP¹⁰⁵ PPTP¹⁰⁶ PPKP¹⁰⁷ PPTP¹⁰⁸ PPKP¹⁰⁹ PPTP¹¹⁰ PPKP¹¹¹ PPTP¹¹² PPKP¹¹³ PPTP¹¹⁴ PPKP¹¹⁵ PPTP¹¹⁶ PPKP¹¹⁷ PPTP¹¹⁸ PPKP¹¹⁹ PPTP¹²⁰ PPKP¹²¹ PPTP¹²² PPKP¹²³ PPTP¹²⁴ PPKP¹²⁵ PPTP¹²⁶ PPKP¹²⁷ PPTP¹²⁸ PPKP¹²⁹ PPTP¹³⁰ PPKP¹³¹ PPTP¹³² PPKP¹³³ PPTP¹³⁴ PPKP¹³⁵ PPTP¹³⁶ PPKP¹³⁷ PPTP¹³⁸ PPKP¹³⁹ PPTP¹⁴⁰ PPKP¹⁴¹ PPTP¹⁴² PPKP¹⁴³ PPTP¹⁴⁴ PPKP¹⁴⁵ PPTP¹⁴⁶ PPKP¹⁴⁷ PPTP¹⁴⁸ PPKP¹⁴⁹ PPTP¹⁵⁰ PPKP¹⁵¹ PPTP¹⁵² PPKP¹⁵³ PPTP¹⁵⁴ PPKP¹⁵⁵ PPTP¹⁵⁶ PPKP¹⁵⁷ PPTP¹⁵⁸ PPKP¹⁵⁹ PPTP¹⁶⁰ PPKP¹⁶¹ PPTP¹⁶² PPKP¹⁶³ PPTP¹⁶⁴ PPKP¹⁶⁵ PPTP¹⁶⁶ PPKP¹⁶⁷ PPTP¹⁶⁸ PPKP¹⁶⁹ PPTP¹⁷⁰ PPKP¹⁷¹ PPTP¹⁷² PPKP¹⁷³ PPTP¹⁷⁴ PPKP¹⁷⁵ PPTP¹⁷⁶ PPKP¹⁷⁷ PPTP¹⁷⁸ PPKP¹⁷⁹ PPTP¹⁸⁰ PPKP¹⁸¹ PPTP¹⁸² PPKP¹⁸³ PPTP¹⁸⁴ PPKP¹⁸⁵ PPTP¹⁸⁶ PPKP¹⁸⁷ PPTP¹⁸⁸ PPKP¹⁸⁹ PPTP¹⁹⁰ PPKP¹⁹¹ PPTP¹⁹² PPKP¹⁹³ PPTP¹⁹⁴ PPKP¹⁹⁵ PPTP¹⁹⁶ PPKP¹⁹⁷ PPTP¹⁹⁸ PPKP¹⁹⁹ PPTP²⁰⁰ PPKP²⁰¹ PPTP²⁰² PPKP²⁰³ PPTP²⁰⁴ PPKP²⁰⁵ PPTP²⁰⁶ PPKP²⁰⁷ PPTP²⁰⁸ PPKP²⁰⁹ PPTP²¹⁰ PPKP²¹¹ PPTP²¹² PPKP²¹³ PPTP²¹⁴ PPKP²¹⁵ PPTP²¹⁶ PPKP²¹⁷ PPTP²¹⁸ PPKP²¹⁹ PPTP²²⁰ PPKP²²¹ PPTP²²² PPKP²²³ PPTP²²⁴ PPKP²²⁵ PPTP²²⁶ PPKP²²⁷ PPTP²²⁸ PPKP²²⁹ PPTP²³⁰ PPKP²³¹ PPTP²³² PPKP²³³ PPTP²³⁴ PPKP²³⁵ PPTP²³⁶ PPKP²³⁷ PPTP²³⁸ PPKP²³⁹ PPTP²⁴⁰ PPKP²⁴¹ PPTP²⁴² PPKP²⁴³ PPTP²⁴⁴ PPKP²⁴⁵ PPTP²⁴⁶ PPKP²⁴⁷ PPTP²⁴⁸ PPKP²⁴⁹ PPTP²⁵⁰ PPKP²⁵¹ PPTP²⁵² PPKP²⁵³ PPTP²⁵⁴ PPKP²⁵⁵ PPTP²⁵⁶ PPKP²⁵⁷ PPTP²⁵⁸ PPKP²⁵⁹ PPTP²⁶⁰ PPKP²⁶¹ PPTP²⁶² PPKP²⁶³ PPTP²⁶⁴ PPKP²⁶⁵ PPTP²⁶⁶ PPKP²⁶⁷ PPTP²⁶⁸ PPKP²⁶⁹ PPTP²⁷⁰ PPKP²⁷¹ PPTP²⁷² PPKP²⁷³ PPTP²⁷⁴ PPKP²⁷⁵ PPTP²⁷⁶ PPKP²⁷⁷ PPTP²⁷⁸ PPKP²⁷⁹ PPTP²⁸⁰ PPKP²⁸¹ PPTP²⁸² PPKP²⁸³ PPTP²⁸⁴ PPKP²⁸⁵ PPTP²⁸⁶ PPKP²⁸⁷ PPTP²⁸⁸ PPKP²⁸⁹ PPTP²⁹⁰ PPKP²⁹¹ PPTP²⁹² PPKP²⁹³ PPTP²⁹⁴ PPKP²⁹⁵ PPTP²⁹⁶ PPKP²⁹⁷ PPTP²⁹⁸ PPKP²⁹⁹ PPTP³⁰⁰ PPKP³⁰¹ PPTP³⁰² PPKP³⁰³ PPTP³⁰⁴ PPKP³⁰⁵ PPTP³⁰⁶ PPKP³⁰⁷ PPTP³⁰⁸ PPKP³⁰⁹ PPTP³¹⁰ PPKP³¹¹ PPTP³¹² PPKP³¹³ PPTP³¹⁴ PPKP³¹⁵ PPTP³¹⁶ PPKP³¹⁷ PPTP³¹⁸ PPKP³¹⁹ PPTP³²⁰ PPKP³²¹ PPTP³²² PPKP³²³ PPTP³²⁴ PPKP³²⁵ PPTP³²⁶ PPKP³²⁷ PPTP³²⁸ PPKP³²⁹ PPTP³³⁰ PPKP³³¹ PPTP³³² PPKP³³³ PPTP³³⁴ PPKP³³⁵ PPTP³³⁶ PPKP³³⁷ PPTP³³⁸ PPKP³³⁹ PPTP³⁴⁰ PPKP³⁴¹ PPTP³⁴² PPKP³⁴³ PPTP³⁴⁴ PPKP³⁴⁵ PPTP³⁴⁶ PPKP³⁴⁷ PPTP³⁴⁸ PPKP³⁴⁹ PPTP³⁵⁰ PPKP³⁵¹ PPTP³⁵² PPKP³⁵³ PPTP³⁵⁴ PPKP³⁵⁵ PPTP³⁵⁶ PPKP³⁵⁷ PPTP³⁵⁸ PPKP³⁵⁹ PPTP³⁶⁰ PPKP³⁶¹ PPTP³⁶² PPKP³⁶³ PPTP³⁶⁴ PPKP³⁶⁵ PPTP³⁶⁶ PPKP³⁶⁷ PPTP³⁶⁸ PPKP³⁶⁹ PPTP³⁷⁰ PPKP³⁷¹ PPTP³⁷² PPKP³⁷³ PPTP³⁷⁴ PPKP³⁷⁵ PPTP³⁷⁶ PPKP³⁷⁷ PPTP³⁷⁸ PPKP³⁷⁹ PPTP³⁸⁰ PPKP³⁸¹ PPTP³⁸² PPKP³⁸³ PPTP³⁸⁴ PPKP³⁸⁵ PPTP³⁸⁶ PPKP³⁸⁷ PPTP³⁸⁸ PPKP³⁸⁹ PPTP³⁹⁰ PPKP³⁹¹ PPTP³⁹² PPKP³⁹³ PPTP³⁹⁴ PPKP³⁹⁵ PPTP³⁹⁶ PPKP³⁹⁷ PPTP³⁹⁸ PPKP³⁹⁹ PPTP⁴⁰⁰ PPKP⁴⁰¹ PPTP⁴⁰² PPKP⁴⁰³ PPTP⁴⁰⁴ PPKP⁴⁰⁵ PPTP⁴⁰⁶ PPKP⁴⁰⁷ PPTP⁴⁰⁸ PPKP⁴⁰⁹ PPTP⁴¹⁰ PPKP⁴¹¹ PPTP⁴¹² PPKP⁴¹³ PPTP⁴¹⁴ PPKP⁴¹⁵ PPTP⁴¹⁶ PPKP⁴¹⁷ PPTP⁴¹⁸ PPKP⁴¹⁹ PPTP⁴²⁰ PPKP⁴²¹ PPTP⁴²² PPKP⁴²³ PPTP⁴²⁴ PPKP⁴²⁵ PPTP⁴²⁶ PPKP⁴²⁷ PPTP⁴²⁸ PPKP⁴²⁹ PPTP⁴³⁰ PPKP⁴³¹ PPTP⁴³² PPKP⁴³³ PPTP⁴³⁴ PPKP⁴³⁵ PPTP⁴³⁶ PPKP⁴³⁷ PPTP⁴³⁸ PPKP⁴³⁹ PPTP⁴⁴⁰ PPKP⁴⁴¹ PPTP⁴⁴² PPKP⁴⁴³ PPTP⁴⁴⁴ PPKP⁴⁴⁵ PPTP⁴⁴⁶ PPKP⁴⁴⁷ PPTP⁴⁴⁸ PPKP⁴⁴⁹ PPTP⁴⁵⁰ PPKP⁴⁵¹ PPTP⁴⁵² PPKP⁴⁵³ PPTP⁴⁵⁴ PPKP⁴⁵⁵ PPTP⁴⁵⁶ PPKP⁴⁵⁷ PPTP⁴⁵⁸ PPKP⁴⁵⁹ PPTP⁴⁶⁰ PPKP⁴⁶¹ PPTP⁴⁶² PPKP⁴⁶³ PPTP⁴⁶⁴ PPKP⁴⁶⁵ PPTP⁴⁶⁶ PPKP⁴⁶⁷ PPTP⁴⁶⁸ PPKP⁴⁶⁹ PPTP⁴⁷⁰ PPKP⁴⁷¹ PPTP⁴⁷² PPKP⁴⁷³ PPTP⁴⁷⁴ PPKP⁴⁷⁵ PPTP⁴⁷⁶ PPKP⁴⁷⁷ PPTP⁴⁷⁸ PPKP⁴⁷⁹ PPTP⁴⁸⁰ PPKP⁴⁸¹ PPTP⁴⁸² PPKP⁴⁸³ PPTP⁴⁸⁴ PPKP⁴⁸⁵ PPTP⁴⁸⁶ PPKP⁴⁸⁷ PPTP⁴⁸⁸ PPKP⁴⁸⁹ PPTP⁴⁹⁰ PPKP⁴⁹¹ PPTP⁴⁹² PPKP⁴⁹³ PPTP⁴⁹⁴ PPKP⁴⁹⁵ PPTP⁴⁹⁶ PPKP⁴⁹⁷ PPTP⁴⁹⁸ PPKP⁴⁹⁹ PPTP⁵⁰⁰ PPKP⁵⁰¹ PPTP⁵⁰² PPKP⁵⁰³ PPTP⁵⁰⁴ PPKP⁵⁰⁵ PPTP⁵⁰⁶ PPKP⁵⁰⁷ PPTP⁵⁰⁸ PPKP⁵⁰⁹ PPTP⁵¹⁰ PPKP⁵¹¹ PPTP⁵¹² PPKP⁵¹³ PPTP⁵¹⁴ PPKP⁵¹⁵ PPTP⁵¹⁶ PPKP⁵¹⁷ PPTP⁵¹⁸ PPKP⁵¹⁹ PPTP⁵²⁰ PPKP⁵²¹ PPTP⁵²² PPKP⁵²³ PPTP⁵²⁴ PPKP⁵²⁵ PPTP⁵²⁶ PPKP⁵²⁷ PPTP⁵²⁸ PPKP⁵²⁹ PPTP⁵³⁰ PPKP⁵³¹ PPTP⁵³² PPKP⁵³³ PPTP⁵³⁴ PPKP⁵³⁵ PPTP⁵³⁶ PPKP⁵³⁷ PPTP⁵³⁸ PPKP⁵³⁹ PPTP⁵⁴⁰ PPKP⁵⁴¹ PPTP⁵⁴² PPKP⁵⁴³ PPTP⁵⁴⁴ PPKP⁵⁴⁵ PPTP⁵⁴⁶ PPKP⁵⁴⁷ PPTP⁵⁴⁸ PPKP⁵⁴⁹ PPTP⁵⁵⁰ PPKP⁵⁵¹ PPTP⁵⁵² PPKP⁵⁵³ PPTP⁵⁵⁴ PPKP⁵⁵⁵ PPTP⁵⁵⁶ PPKP⁵⁵⁷ PPTP⁵⁵⁸ PPKP⁵⁵⁹ PPTP⁵⁶⁰ PPKP⁵⁶¹ PPTP⁵⁶² PPKP⁵⁶³ PPTP⁵⁶⁴ PPKP⁵⁶⁵ PPTP⁵⁶⁶ PPKP⁵⁶⁷ PPTP⁵⁶⁸ PPKP⁵⁶⁹ PPTP⁵⁷⁰ PPKP⁵⁷¹ PPTP⁵⁷² PPKP⁵⁷³ PPTP⁵⁷⁴ PPKP⁵⁷⁵ PPTP⁵⁷⁶ PPKP⁵⁷⁷ PPTP⁵⁷⁸ PPKP⁵⁷⁹ PPTP⁵⁸⁰ PPKP⁵⁸¹ PPTP⁵⁸² PPKP⁵⁸³ PPTP⁵⁸⁴ PPKP⁵⁸⁵ PPTP⁵⁸⁶ PPKP⁵⁸⁷ PPTP⁵⁸⁸ PPKP⁵⁸⁹ PPTP⁵⁹⁰ PPKP⁵⁹¹ PPTP⁵⁹² PPKP⁵⁹³ PPTP⁵⁹⁴ PPKP⁵⁹⁵ PPTP⁵⁹⁶ PPKP⁵⁹⁷ PPTP⁵⁹⁸ PPKP⁵⁹⁹ PPTP⁶⁰⁰ PPKP⁶⁰¹ PPTP⁶⁰² PPKP⁶⁰³ PPTP⁶⁰⁴ PPKP⁶⁰⁵ PPTP⁶⁰⁶ PPKP⁶⁰⁷ PPTP⁶⁰⁸ PPKP⁶⁰⁹ PPTP⁶¹⁰ PPKP⁶¹¹ PPTP⁶¹² PPKP⁶¹³ PPTP⁶¹⁴ PPKP⁶¹⁵ PPTP⁶¹⁶ PPKP⁶¹⁷ PPTP⁶¹⁸ PPKP⁶¹⁹ PPTP⁶²⁰ PPKP⁶²¹ PPTP⁶²² PPKP⁶²³ PPTP⁶²⁴ PPKP⁶²⁵ PPTP⁶²⁶ PPKP⁶²⁷ PPTP⁶²⁸ PPKP⁶²⁹ PPTP⁶³⁰ PPKP⁶³¹ PPTP⁶³² PPKP⁶³³ PPTP⁶³⁴ PPKP⁶³⁵ PPTP⁶³⁶ PPKP⁶³⁷ PPTP⁶³⁸ PPKP⁶³⁹ PPTP⁶⁴⁰ PPKP⁶⁴¹ PPTP⁶⁴² PPKP⁶⁴³ PPTP⁶⁴⁴ PPKP⁶⁴⁵ PPTP⁶⁴⁶ PPKP⁶⁴⁷ PPTP⁶⁴⁸ PPKP⁶⁴⁹ PPTP⁶⁵⁰ PPKP⁶⁵¹ PPTP⁶⁵² PPKP⁶⁵³ PPTP⁶⁵⁴ PPKP⁶⁵⁵ PPTP⁶⁵⁶ PPKP⁶⁵⁷ PPTP⁶⁵⁸ PPKP⁶⁵⁹ PPTP⁶⁶⁰ PPKP⁶⁶¹ PPTP⁶⁶² PPKP⁶⁶³ PPTP⁶⁶⁴ PPKP⁶⁶⁵ PPTP⁶⁶⁶ PPKP⁶⁶⁷ PPTP⁶⁶⁸ PPKP⁶⁶⁹ PPTP⁶⁷⁰ PPKP⁶⁷¹ PPTP⁶⁷² PPKP⁶⁷³ PPTP⁶⁷⁴ PPKP⁶⁷⁵ PPTP⁶⁷⁶ PPKP⁶⁷⁷ PPTP⁶⁷⁸ PPKP⁶⁷⁹ PPTP⁶⁸⁰ PPKP⁶⁸¹ PPTP⁶⁸² PPKP⁶⁸³ PPTP⁶⁸⁴ PPKP<

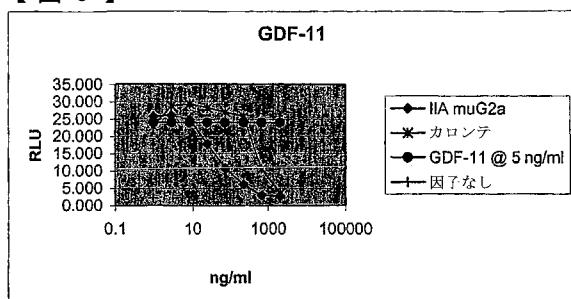
【図4】



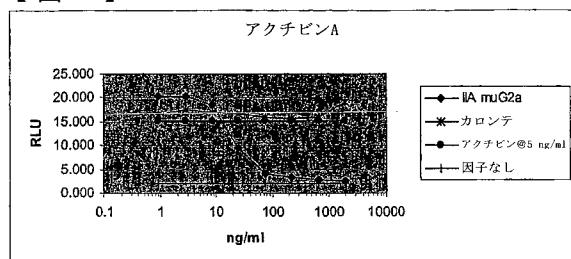
【図5】



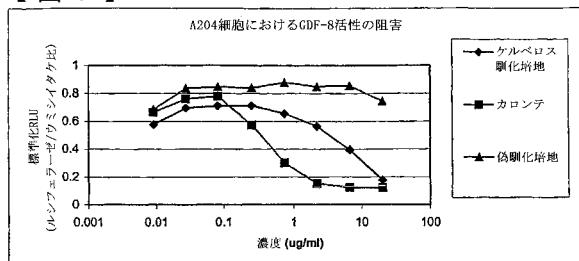
【図6】



【図7】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成19年2月9日(2007.2.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008500373000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	101
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	101
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 31/663 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
	A 6 1 P 3/00	
	A 6 1 P 43/00	111
	A 6 1 K 31/663	
	C 0 7 K 14/47	

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

(72)発明者 シーラ ジャスパー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン リンカーン テラス 3

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 AA19 AA22 BA01 BA22 BA41 DB52
 MA02 NA14 ZA011 ZA021 ZA081 ZA151 ZA161 ZA181 ZA201 ZA211
 ZA221 ZA231 ZA361 ZA441 ZA451 ZA691 ZA701 ZA811 ZA941 ZA961
 ZB151 ZB261 ZB331 ZC021 ZC061 ZC211 ZC331 ZC351 ZC551 ZC751
 4C085 AA13 AA14 AA35 BB11 BB31 BB41 BB43 CC21 CC22 DD62
 EE03
 4C086 AA01 AA02 DA34 EA16 MA02 MA03 MA04 NA14 ZA01 ZA02
 ZA08 ZA15 ZA16 ZA18 ZA20 ZA21 ZA22 ZA23 ZA36 ZA44
 ZA45 ZA69 ZA70 ZA81 ZA94 ZA96 ZB15 ZB26 ZB33 ZC02
 ZC06 ZC21 ZC33 ZC35 ZC55 ZC75
 4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 EA20 FA74