

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7329573号

(P7329573)

(45)発行日 令和5年8月18日(2023.8.18)

(24)登録日 令和5年8月9日(2023.8.9)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/17 (2006.01)

A 6 1 K 38/17

Z N A

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K 47/68

A 6 1 K 47/65 (2017.01)

A 6 1 K 47/65

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 P 7/06

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 14/705

請求項の数 20 (全73頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-175400(P2021-175400)

(22)出願日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(62)分割の表示 特願2020-5252(P2020-5252)の分割

原出願日 平成21年8月13日(2009.8.13)

(65)公開番号 特開2022-9561(P2022-9561A)

(43)公開日 令和4年1月14日(2022.1.14)

審査請求日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(31)優先権主張番号 61/189,094

(32)優先日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 509125475

アクセルロン ファーマ インコーポレイ  
テッドアメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
139, ケンブリッジ, シドニー ス  
トリート 128

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 赤血球レベルを高めるためのGDFトラップの使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

貧血を有する被験体の処置、および／または、被験体における赤血球レベルの上昇における使用のための組成物であって、前記組成物は、

(i) 配列番号29に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むA c t R I I タンパク質と；

(i i) 免疫グロブリンF c ドメインと；

(i i i) 前記A c t R I I タンパク質と前記免疫グロブリンF c ドメインの間に位置するリンカードメインと

を含むA c t R I I 融合タンパク質の有効量を含み、

ここで、前記A c t R I I タンパク質は、G D F 8 及び G D F 1 1 への結合を保持し、そして、アクチビンA 及びアクチビンB への結合の減少を示す、組成物。

## 【請求項2】

前記貧血が骨髓異形成症候群に関連する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

前記貧血がサラセミアに関連する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項4】

前記貧血が鎌状赤血球病に関連する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項5】

前記A c t R I I タンパク質が、配列番号29に少なくとも98%同一であるアミノ酸

配列を含むポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 4 に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 に少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 13】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 と同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 と同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 と同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 3 に記載の組成物。

30

【請求項 16】

前記 A c t R I I タンパク質が、配列番号 29 と同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記免疫グロブリン F c ドメインが I g G 重鎖に由来する、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記融合タンパク質がホモダイマーを形成する、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記融合タンパク質が、グリコシル化アミノ酸、P E G 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、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、1 つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基を含む、請求項 18 に記載の組成物。

40

【請求項 20】

前記融合タンパク質が、配列番号 28 に少なくとも 98 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

(関連出願)

この出願は、2008年8月14日に出版された米国仮出願第61/189,094号の利益を主張する。上記米国仮出願の教示の全ては、参照によって本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

成熟した赤血球 (red blood cell)、すなわちエリスロサイト (erythrocyte) は、脊椎動物の循環系において酸素の輸送を担っている。赤血球は、比較的高い酸素分圧 ( $pO_2$ ) の肺において酸素を結合し、そして、比較的低い  $pO_2$  の身体の領域へと酸素を運搬するタンパク質であるヘモグロビンを高濃度で有する。

10

【0003】

成熟赤血球は、赤血球生成と呼ばれるプロセスにおいて、多能性の造血幹細胞から生成される。出生後の赤血球生成は、主として、骨髄および赤脾臓において生じる。種々のシグナル伝達経路の連繋した作用により、細胞の増殖、分化、生存および死のバランスが制御される。正常な条件下では、赤血球は、身体において一定の赤血球質量を維持する速度で生成され、そして、この生成は、種々の刺激 (酸素圧の増減または組織の要求を含む) に応じて増減し得る。赤血球生成のプロセスは、分化系列が決定した (lineage committed) 前駆体細胞の形成から始まり、そして、一連の別個の前駆体細胞型を通して進行する。赤血球生成の最終段階は、網状赤血球が血流へと放出されるときに生じ、成熟赤血球の形態を帯びながら、そのミトコンドリアおよびリボソームを失う。血中での網状赤血球レベルの上昇、または、網状赤血球：赤血球の比の上昇は、赤血球生成速度の増加を示す。

20

【0004】

エリスロポエチン (Epo) は、出生後の脊椎動物における赤血球生成の最も重要な正の調節因子として広く認識されている。Epoは、組織酸素圧の低下 (低酸素) および低い赤血球レベルまたは低いヘモグロビンレベルに対し、これを補う赤血球生成性の応答を調節する。ヒトでは、Epoレベルの上昇は、骨髄および脾臓における赤血球先駆細胞の生成を刺激することによって、赤血球の形成を促進する。マウスでは、Epoは、主として脾臓における赤血球生成を増強する。

【0005】

30

種々の臨床的状況において赤血球レベルを増加させるため、そして、特に、貧血の処置のために、組換え型Epoの種々の形態が医師によって使用されている。貧血は、血中のヘモグロビンまたは赤血球が正常レベルよりも低いことによって特徴付けられる、広く定義される状態である。ある場合には、貧血は、赤血球の生成または生存における原発性の障害によって引き起こされる。より一般的には、貧血は、他の系の疾患に対して続発的である (非特許文献1)。貧血は、赤血球の生成速度の低下もしくは破壊速度の増加から、または、出血に起因する赤血球の喪失によって生じ得る。貧血は、例えば、慢性腎不全、化学療法処置、骨髄異形成症候群、慢性関節リウマチおよび骨髄移植を含む種々の障害から生じ得る。

【0006】

40

Epoを用いた処置は、代表的に、数週間の期間にわたり、健康なヒトにおいて約1~3 g/dLのヘモグロビンの上昇をもたらす。貧血の個体に投与された場合、この処置レジメンは、しばしば、ヘモグロビンおよび赤血球のレベルのかなりの増加を提供し、そして、クオリティオブライフの改善と生存の延長につながる。Epoは、一様に有効ではなく、多くの個体は、高用量に対してさえも不応性である (非特許文献2)。50%を超えるがんを有する患者がEpoに対して不十分な応答を有し、末期の腎疾患を有する患者の約10%が低反応性であり (非特許文献3; 非特許文献4)、そして、骨髄異形成症候群を有する患者の10%未満しか有利に応答しない (非特許文献5)。炎症、鉄およびビタミンの欠乏、不適切な透析、アルミニウムの毒性、および副甲状腺機能亢進を含むいくつかの要因は、治療応答が乏しいことを予測し得、そして、Epoに対する抵抗性の分子機

50

構は未だにはっきりとしていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Weatherall & Provan, Lancet (2000年) 355巻、1169～1175頁

Horlら、Nephrol Dial Transplant (2000年) 15巻、43～50頁

Glaspysら、J Clin Oncol (1997年) 15巻、1218～1234頁

Demetriら、J Clin Oncol (1998年) 16巻、3412～3425頁

Estey、Curr Opin Hematol (2003年) 10巻、60～67頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、患者における赤血球を増加させるための代替的な組成物および方法を提供することが本開示の一つの目的である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の概要)

一部、本開示は、赤血球およびヘモグロビンのレベルを高めるために、GDFトラップを用いることができることを実証する。他のActRIIBリガンド、例えばGDF11および／またはミオスタチンと比較して、アクチビン（例えば、アクチビンAおよび／またはアクチビンB）に有意に低い親和性を有する改変体ActRIIBポリペプチドは、GDFトラップと称す。本明細書で記載されるActRIIB改変体は、特に明記しない限りGDFトラップである。詳細には、本開示は、配列番号1の79位に酸性残基を有するActRIIBポリペプチドの可溶性の形であるGDFトラップがインビボで投与されると、血液中の赤血球レベルを高めることを実証する。したがって、特定の実施形態において、本開示は、患者で赤血球およびヘモグロビンのレベルを高めるため、およびその必要性のある患者で低い赤血球またはヘモグロビンのレベルに関連する障害を処置するために、GDFトラップを用いる方法を提供する。参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第12／012,652号に記載されているように、GDFトラップは、筋肉量を増加させ、脂肪量を減少させるのに用いることができる。

【0010】

特定の態様では、本開示は、アミノ末端およびカルボキシ末端の切断および配列変化を有するActRIIBポリペプチドを含む、改変体ActRIIBポリペプチドであるGDFトラップを提供する。任意選択で、本発明のGDFトラップは、ActRIIB受容体の1つまたは複数のリガンド、例えばGDF8（ミオスタチンとも呼ばれる）、GDF11、NodalおよびBMP7（OP-1とも呼ばれる）と優先的に拮抗するように設計されてもよい。GDFトラップの例には、アクチビン親和性が大いに低下したActRIIB由来の改変体のセットが含まれる。これらの改変体は、他の組織への影響を低減しつつ、赤血球に対する望ましい影響を示す。そのような改変体の例には、配列番号1の79位に対応する位置に酸性アミノ酸（例えば、アスパラギン酸、Dまたはグルタミン酸、E）を有するものが含まれる。特定の実施形態では、GDFトラップポリペプチドは、配列番号7、26、28、29、32、37または38のアミノ酸配列、および上記のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であるポリペプチドを含むか、それからなるか、または事実上それからなるアミノ酸配列を含む。

【0011】

特定の態様では、本開示はGDF8、GDF11、アクチビン（例えば、アクチビンB）、BMP7またはnodalなどのActRIIBリガンドに結合するGDFトラップ

10

20

30

40

50

、および薬学的に許容される担体を含む医薬調製物を提供する。任意選択で、G D Fトラップは、10マイクロモル未満、1マイクロモル未満、100ナノモル未満、10ナノモル未満、または1ナノモル未満のK dでA c t R I I Bリガンドに結合する。任意選択で、G D Fトラップは、A c t R I I Bリガンドによって誘発される細胞内シグナル伝達事象などの、A c t R I I Bシグナル伝達を阻害する。そのような調製物に用いられるG D Fトラップは、例えば、配列番号2、3、7、11、26、28、29、32、37、38もしくは40から選択されるアミノ酸配列を有するG D Fトラップ、または配列番号2、3、7、11、26、28、29、32、37、38もしくは40から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、95%、97%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するG D Fトラップ、または配列番号1のL 79に対応する位置が酸性アミノ酸である、配列番号2、3、7、11、26、28、29、32、37、38もしくは40から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、95%、97%もしくは99%同一であるアミノ酸配列を有するG D Fトラップを含む、本明細書に開示されるもののいずれかでよい。そのような調製物に用いられる好ましいG D Fトラップは、配列番号26のアミノ酸配列からなるか、または事実上それからなる。G D Fトラップは、天然のA c t R I I Bポリペプチドの機能的断片、例えば、配列番号2、3、7、11、26、28、29、32、37、38もしくは40から選択される配列の少なくとも10、20もしくは30アミノ酸を含むもの、またはC末端の1、2、3、4、5もしくは10~15アミノ酸を欠き、N末端の1、2、3、4もしくは5アミノ酸を欠く配列番号2の配列を含むことができる。好ましいポリペプチドは、配列番号2または40と比較して、N末端の2~5アミノ酸、およびC末端の3以下のアミノ酸の切断を含む。G D Fトラップは、天然に存在するA c t R I I Bポリペプチドに対して、（例えば、リガンド結合ドメインにおいて）A c t R I I Bポリペプチドのアミノ酸配列に1または複数の変更を含み得る。アミノ酸配列の変更は、例えば、哺乳動物、昆虫もしくは他の真核生物細胞において生成される場合にポリペプチドのグリコシル化を変更し得るか、または、天然に存在するA c t R I I Bポリペプチドに対して、ポリペプチドのタンパク質分解による切断を変更し得る。

#### 【0012】

G D Fトラップは、1つのドメインとして、A c t R I I Bポリペプチド（例えば、1または複数の配列の差異を有するA c t R I I Bのリガンド結合部分）と、所望の特性（例えば、改善された薬物動態、より容易な精製、特定の組織への標的化など）を提供する1または複数のさらなるドメインとを有する融合タンパク質であり得る。例えば、融合タンパク質のドメインは、インビボ安定性、インビボ半減期、取込み／投与、組織局在化もしくは分布、タンパク質複合体の形成、融合タンパク質の多量体化および／または精製のうちの1または複数を増強し得る。G D Fトラップ融合タンパク質は、免疫グロブリンF cドメイン（野生型または変異体）、または血清アルブミンを含み得る。特定の実施形態では、G D Fトラップ融合物は、F cドメインと細胞外A c t R I I Bドメインとの間に位置する比較的構造化されていない（u n s t r u c t u r e d）リンカーを含む。この構造化されていないリンカーは、A c t R I I Bの細胞外ドメインのC末端の約15アミノ酸の構造化されていない領域（「テール」）に対応することができるか、またはそれは、二次構造が比較的存在しない3~5、15、20、30、50もしくはそれ以上のアミノ酸の人工配列であってもよい。リンカーは、グリシン残基およびプロリン残基が豊富であり得、そして例えば、スレオニン／セリンおよびグリシンの繰り返し配列（例えば、T G<sub>4</sub>（配列番号13）もしくはS G<sub>4</sub>（配列番号14）の単一体（s i n g l e t）もしくは繰り返し）または一連の3つのグリシンを含み得る。融合タンパク質は、エピトープタグ、F L A Gタグ、ポリヒスチジン配列、および、G S T融合物のような精製配列を含み得る。特定の実施形態では、G D Fトラップ融合物は、リーダー配列を含む。リーダー配列は、天然のA c t R I I Bリーダー配列または異種のリーダー配列であってもよい。特定の実施形態では、リーダー配列は組織プラスミノーゲン活性化因子（T P A）リーダー配列である。一実施形態では、G D Fトラップ融合タンパク質は、式A - B - Cに示すア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含む。B部分は、配列番号2または40のアミノ酸25～131に対応するアミノ酸配列からなる、NおよびC末端が切断されているA c t R I I Bポリペプチドである。A部分およびC部分は、独立に0、1または1を超えるアミノ酸であることができ、AおよびC部分の両方はBに対して異種である。Aおよび／またはC部分は、リンカー配列を通してB部分に結合することができる。

#### 【0013】

任意選択で、G D Fトラップは、グリコシル化アミノ酸、P E G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、脂質部分に結合体化されたアミノ酸および有機誘導体化因子（o r g a n i c d e r i v a t i z i n g a g e n t）に結合体化されたアミノ酸から選択される1または複数の修飾されたアミノ酸残基を有する改変体A c t R I I Bポリペプチドを含む。薬学的調製物はまた、A c t R I I B関連障害を処置するために使用される化合物のような1または複数のさらなる化合物を含み得る。好ましくは、薬学的調製物は、発熱物質を実質的に含まない。一般に、G D Fトラップは、患者における望ましくない免疫応答の可能性を低減するために、G D Fトラップの天然のグリコシル化を適切に媒介する哺乳動物細胞株において発現されることが好ましい。ヒトおよびC H Oの細胞株は、首尾よく使用されており、そして、他の一般的な哺乳動物発現ベクターが有用であることが予想される。

#### 【0014】

特定の態様では、本開示は、本明細書に記載される医薬調製物を含み、ヒトで赤血球レベルを高めるための使用が表示されているパッケージ医薬を提供する。

#### 【0015】

特定の態様では、本開示は、変化させたリガンド結合性（例えば、G D F 8結合性）ドメインを含む可溶性のA c t R I I BポリペプチドであるG D Fトラップを提供する。変化させたリガンド結合性ドメインを有するG D Fトラップは、例えば、ヒトA c t R I I BのE 3 7、E 3 9、R 4 0、K 5 5、R 5 6、Y 6 0、A 6 4、K 7 4、W 7 8、L 7 9、D 8 0、F 8 2およびF 1 0 1（番号付けは、配列番号1と比較したもの）などのアミノ酸残基に1つまたは複数の変異を含むことができる。任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインは、A c t R I I B受容体の野生型リガンド結合性ドメインと比較して、G D F 8／G D F 1 1などのリガンドに対してより高い選択性を有することができる。例示すると、これらの変異は、変化させたリガンド結合性ドメインの、アクチビンよりもG D F 1 1（したがって、おそらくG D F 8）に対する選択性を増加させることが本明細書で実証される：K 7 4 Y、K 7 4 F、K 7 4 I、L 7 9 D、L 7 9 EおよびD 8 0 I。以下の変異は反対の影響を有し、G D F 1 1よりもアクチビン結合の比率を高める：D 5 4 A、K 5 5 A、L 7 9 AおよびF 8 2 A。全体的（G D F 1 1およびアクチビン）結合活性は、「テール」領域または、おそらく、構造化されていないリンカー領域の組入れによって、さらにK 7 4 A変異の使用によって増加させることができる。リガンド結合親和性の全体的低下を引き起こした他の変異には、以下のものが含まれる：R 4 0 A、E 3 7 A、R 5 6 A、W 7 8 A、D 8 0 K、D 8 0 R、D 8 0 A、D 8 0 G、D 8 0 F、D 8 0 MおよびD 8 0 N。所望の効果を達成するために、変異を組み合わせることができる。例えば、G D F 1 1：アクチビン結合比に影響を及ぼす変異の多くは、リガンド結合に全体的に負の影響を及ぼし、したがってこれらを、リガンド結合を一般に増加させてリガンド選択性を有する改善された結合性タンパク質を生成する変異と組み合わせてもよい。例示的な実施形態では、G D Fトラップは、任意選択で追加のアミノ酸置換、付加または欠失と組み合わせた、L 7 9 DまたはL 7 9 E変異を含むA c t R I I Bポリペプチドである。

#### 【0016】

任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインを含むG D Fトラップは、G D F 8結合についての $K_d$ に対するアクチビン結合についての $K_d$ の比が、野生型リガンド結合性ドメインの比と比較して少なくとも2、5、10倍または100倍さえも大きい。任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインを含むG D Fトラップは、G D F 8／G D F 1 1を阻害するための $I C_{50}$ 値に対するアクチビンを阻害するための $I C_{50}$ 値の比が、野

10

20

30

40

50

生型 A c t R I I B リガンド結合性ドメインと比較して少なくとも 2、5、10 倍または 100 倍さえも大きい。任意選択で、変化させたりリガンド結合性ドメインを含む G D F トラップは、アクチBINを阻害するための I C<sub>50</sub> 値よりも少なくとも 2、5、10 倍、または 100 倍さえも小さい I C<sub>50</sub> 値で G D F 8 / G D F 11 を阻害する。これらの G D F トラップは、免疫グロブリン F c ドメイン（野生型または変異体のいずれか）を含む融合タンパク質であってもよい。特定の場合では、本主題の可溶性 G D F トラップは、G D F 8 および / または G D F 11 のアンタゴニスト（インヒビター）である。

【0017】

以下などの、他の G D F トラップが企図される。配列番号 1 または 39 の A c t R I I B 配列に由来する部分および第二のポリペプチド部分を含む G D F トラップ融合タンパク質であって、A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 21 ~ 29 のいずれかから始まり（任意選択で、配列番号 1 または 39 の 22 ~ 25 から始まり）、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 109 ~ 134 のいずれかで終わる配列に対応し、G D F トラップ融合タンパク質は、細胞ベースのアッセイでアクチBIN、ミオスタチンおよび / または G D F 11 によるシグナル伝達を阻害する。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 20 ~ 29 のいずれかから始まり（任意選択で、配列番号 1 または 39 の 22 ~ 25 から始まり）、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 109 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 20 ~ 24 のいずれかから始まり（任意選択で、配列番号 1 または 39 の 22 ~ 25 から始まり）、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 109 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 20 ~ 24 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 118 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 21 ~ 24 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 118 ~ 134 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 20 ~ 24 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 128 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 20 ~ 24 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 128 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 21 ~ 29 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 118 ~ 134 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 20 ~ 29 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 118 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 21 ~ 29 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 128 ~ 134 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。A c t R I I B に由来する部分は、配列番号 1 のアミノ酸 20 ~ 29 のいずれかから始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 128 ~ 133 のいずれかで終わる配列に対応する、上記の G D F トラップ融合タンパク質。驚くべきことに、配列番号 1 または 39 の 22 ~ 25 から始まる構築物は、ヒト A c t R I I B の完全な細胞外ドメインを有するタンパク質よりも高い活性レベルを有する。好ましい実施形態では、G D F トラップ融合タンパク質は、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 25 位から始まり、配列番号 1 または 39 のアミノ酸 131 位で終わるアミノ酸配列を含むか、事実上それからなるか、またはそれからなる。別の好ましい実施形態では、G D F トラップポリペプチドは、配列番号 7

10

20

30

40

50

、26、28、29、32、37または38のアミノ酸配列からなるか、または事実上それからなる。上記のGDFトラップ融合タンパク質のいずれもを、ホモダイマーとして生成することができる。上記のGDFトラップ融合タンパク質のいずれも、FcドメインなどのIgG重鎖からの定常領域を含む異種部分を有することができる。上記のGDFトラップ融合タンパク質のいずれも、配列番号1に対する1つまたは複数の追加のアミノ酸置換、欠失または挿入と任意選択で組み合わせて、配列番号1の79位に対応する位置に酸性アミノ酸を含むことができる。

#### 【0018】

以下のものなどの他のGDFトラップタンパク質が企図される。配列番号1または39のアミノ酸29～109の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むGDFトラップタンパク質であって、配列番号1の64に対応する位置がRまたはKであり、細胞ベースのアッセイでアクチビン、ミオスタチンおよび／またはGDF11によるシグナル伝達を阻害するGDFトラップタンパク質。配列番号1または39の配列に関して少なくとも1つの変化がリガンド結合ポケットの外に位置する、上記のGDFトラップタンパク質。配列番号1または39の配列に関して少なくとも1つの変化が、リガンド結合ポケットの中に位置する保存的变化である、上記のGDFトラップタンパク質。配列番号1または39の配列に関して少なくとも1つの変化が、K74、R40、Q53、K55、F82およびL79からなる群より選択される1つまたは複数の位置の変化である、上記のGDFトラップタンパク質。ActRIIBの内因性N-X-S/T配列以外の位置、およびリガンド結合ポケットの外の位置に少なくとも1つのN-X-S/T配列を含む、上記のGDFトラップタンパク質。

#### 【0019】

以下のものなどの他のGDFトラップが企図される。配列番号1または39のアミノ酸29～109の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むGDFトラップタンパク質であって、ActRIIBの内因性N-X-S/T配列以外の位置、およびリガンド結合ポケットの外の位置に少なくとも1つのN-X-S/T配列を含むタンパク質。GDFトラップタンパク質が配列番号1または39の24位に対応する位置にNを、配列番号1または39の26位に対応する位置にSまたはTを含み、細胞ベースのアッセイでアクチビン、ミオスタチンおよび／またはGDF11によるシグナル伝達を阻害する、上記のGDFトラップ。GDFトラップタンパク質が、配列番号1または39の64位に対応する位置にRまたはKを含む、上記のGDFトラップ。ActRIIBタンパク質が配列番号1または39の79位に対応する位置にDまたはEを含み、細胞ベースのアッセイでアクチビン、ミオスタチンおよび／またはGDF11によるシグナル伝達を阻害する、上記のGDFトラップ。配列番号1または39の配列に関して少なくとも1つの変化が、リガンド結合ポケットの中に位置する保存的变化である、上記のGDFトラップ。配列番号1または39の配列に関して少なくとも1つの変化が、K74、R40、Q53、K55、F82およびL79からなる群より選択される1つまたは複数の位置の変化である、上記のGDFトラップ。タンパク質が、異種部分をさらに含む融合タンパク質である、上記のGDFトラップ。上記のGDFトラップ融合タンパク質のいずれもを、ホモダイマーとして生成することができる。上記のGDFトラップ融合タンパク質のいずれも、FcドメインなどのIgG重鎖からの定常領域を含む異種部分を有することができる。

#### 【0020】

特定の態様では、本開示は、GDFトラップポリペプチドをコードする核酸を提供する。単離されたポリヌクレオチドは、上述のような可溶性のGDFトラップポリペプチドのコード配列を含み得る。例えば、単離された核酸は、1または複数の配列の差異を有するActRIIBポリペプチドの細胞外ドメイン（例えば、リガンド結合ドメイン）を含むGDFトラップをコードする配列、および、ActRIIの、膜貫通ドメインおよび／もしくは細胞質ドメインの一部もしくは全体をコードする配列を含み得るが、膜貫通ドメインもしくは細胞質ドメイン内、または、細胞外ドメインと膜貫通ドメインもしくは細胞質ドメインとの間に位置する終止コドンは除く。例えば、GDFトラップをコードする単離

10

20

30

40

50

されたポリヌクレオチドは、1つまたは複数の変形を有する配列番号4などの完全長A c t R I I Bポリヌクレオチド配列または部分的切断バージョンを含むことができ、前記単離されたポリヌクレオチドは、3'末端の少なくとも600ヌクレオチド前に、さもなければ、ポリヌクレオチドの翻訳が、完全長A c t R I I Bの切断部分に任意選択で融合される細胞外ドメインを生成するように置かれた転写終止コドンを含み、本明細書中に開示される核酸は、発現のためのプロモーターに作動可能に連結され得、そして、本開示は、このような組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。好ましくは、細胞は、CHO細胞のような哺乳動物細胞である。

#### 【0021】

特定の態様では、本開示は、GDFトラップポリペプチドを作製するための方法を提供する。このような方法は、適切な細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）において、本明細書中に開示される任意の核酸（例えば、配列番号5、25、27、30もしくは31）を発現させる工程を包含し得る。このような方法は、a）GDFトラップポリペプチドの発現に適した条件下で細胞を培養する工程であって、前記細胞が、GDFトラップ発現構築物で形質転換される、工程と；b）このようにして発現されたGDFトラップポリペプチドを回収する工程とを包含し得る。GDFトラップポリペプチドは、細胞培養物からタンパク質を得るための周知技術のいずれかを用いて、精製していないか、部分的に精製されたか、または高度に精製された画分として回収することができる。

#### 【0022】

特定の態様では、本明細書中に開示されるGDFトラップポリペプチドは、被験体における赤血球の生成を促進するか、または赤血球のレベルを上昇させるための方法において使用され得る。特定の実施形態では、本開示は、必要とする患者において、低い赤血球数もしくは低いヘモグロビンレベルに伴う障害（例えば、貧血）を処置するため、または、赤血球の生成を促進するための方法を提供する。方法は、それを必要とする被験体に、有効量のGDFトラップポリペプチドを投与する工程を包含し得る。特定の態様では、本開示は、本明細書中に記載されるような障害もしくは状態の処置のための医薬を作製するためのGDFトラップポリペプチドの使用を提供する。

#### 【0023】

特定の態様では、本開示は、患者にGDFトラップポリペプチドを投与する方法を提供する。一部、本開示は、赤血球およびヘモグロビンのレベルを高めるために、GDFトラップポリペプチドを用いることができることを実証する。GDFトラップポリペプチドは、筋成長を促進することなどの他の治療的使用を処置または予防するために用いることもできる。特定の例では、筋成長を促進するためにGDFトラップポリペプチドを投与する場合、赤血球に対する望ましくない影響を低減させるために、GDFトラップポリペプチドの投与の間、赤血球に対する影響をモニターすること、またはGDFトラップポリペプチドの投薬を判定もしくは調節することが望ましい可能性がある。例えば、赤血球レベル、ヘモグロビンレベルまたはヘマトクリットレベルの上昇は、血圧の上昇の原因となり得る。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

#### （項目1）

患者において赤血球レベルを高めるかまたは貧血を処置する方法であって、赤血球レベルを高めることまたは貧血を処置することを必要とする患者に、配列番号1のアミノ酸29～109の配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの有効量を投与する工程を含み、前記ポリペプチドが、配列番号1の79位に対応する位置に酸性アミノ酸を含む、方法。

#### （項目2）

前記酸性アミノ酸が、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる群より選択される、項目1に記載の方法。

#### （項目3）

前記ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸29～109の配列に少なくとも95%同

10

20

30

40

50

一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 25 ～ 118 の配列に少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 25 ～ 128 の配列に少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

前記ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 25 ～ 131 の配列に少なくとも 97 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記ポリペプチドが、配列番号 7、28、29、32、37 および 38 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記患者が腎臓障害に関連する貧血を有する、項目 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

前記患者が慢性腎臓疾患に関連する貧血を有する、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記患者が化学療法処置に関連する貧血を有する、項目 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 11)

前記化学療法処置がタキサンである、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記患者が失血の結果としての貧血を有する、項目 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 13)

配列番号 29 のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(項目 14)

免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む、項目 13 に記載のポリペプチド。

(項目 15)

Fc ドメインをさらに含む、項目 13 に記載のポリペプチド。

(項目 16)

配列番号 28 のアミノ酸配列を含む、項目 13 に記載のポリペプチド。

(項目 17)

配列番号 32 のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(項目 18)

免疫グロブリンの定常領域をさらに含む、項目 17 に記載のポリペプチド。

(項目 19)

Fc ドメインをさらに含む、項目 17 に記載のポリペプチド。

(項目 20)

配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、項目 17 に記載のポリペプチド。

(項目 21)

ActRIIB に由来する前記ポリペプチドの部分が、配列番号 29 のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を有する、項目 17 に記載のポリペプチド。

(項目 22)

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、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、1 つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基をさらに含む、項目 13 から 21 のいずれかに記載のポリペプチド。

(項目 23)

式 A-B-C で示されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質であって、

10

20

30

40

50

Bは配列番号29のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、  
AおよびCは、独立に0、1または1個超のアミノ酸であり、  
AおよびCは、Bと異種である、融合タンパク質。

(項目24)

ホモダイマーを形成する、項目23に記載の融合タンパク質。

(項目25)

AまたはCの少なくとも1つが、インビボ安定性、インビボ半減期、取込み／投与、組織局在化もしくは分布、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ポリペプチド部分を含む、項目23または24に記載の融合タンパク質。

(項目26)

AまたはCの少なくとも1つが、IgG重鎖に由来する定常領域を含む、項目23または24に記載の融合タンパク質。

(項目27)

IgG重鎖に由来する前記定常領域がFcドメインである、項目26に記載の融合タンパク質。

(項目28)

A、CまたはAおよびCが、リンカーを用いてBに融合される、項目23に記載の融合タンパク質。

(項目29)

前記リンカーがGly-Gly-Glyを含む、項目28に記載の融合タンパク質。

(項目30)

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、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、1つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基を含む、項目23から29のいずれかに記載の融合タンパク質。

(項目31)

Bが少なくとも1つの修飾されたアミノ酸残基を含む、項目30に記載の融合タンパク質。

(項目32)

項目13から31のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む医薬調製物。

(項目33)

項目13から31のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸を含む培養細胞。

(項目34)

前記細胞が哺乳動物の細胞である、項目33に記載の培養細胞。

(項目35)

前記細胞がCHO細胞である、項目34に記載の培養細胞。

(項目36)

前記核酸が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号12、25、27、30、31、33、34および35からなる群より選択される核酸配列とハイブリダイズする、項目33に記載の培養細胞。

(項目37)

前記核酸が、配列番号12、25、27、30、31、33、34および35からなる群より選択される核酸配列に少なくとも95%同一である、項目33に記載の培養細胞。

(項目38)

前記核酸が、配列番号12、25、27、30、31、33、34および35からなる群より選択される、項目33に記載の培養細胞。

(項目39)

ActRIIB由来のアミノ酸配列、リンカー配列および／または免疫グロブリン配列をコードする前記核酸の部分が、配列番号12、25、27、30、31、33、34および35からなる群より選択される核酸配列からなる、項目33に記載の培養細胞。

10

20

30

40

50

## (項目 4 0)

患者において赤血球レベルを高めるかまたは貧血を処置する方法であって、赤血球レベルを高めることまたは貧血を処置することを必要とする患者に改変体 A c t R I I B ポリペプチドの有効量を投与する工程を含み、前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸 2 9 ~ 1 0 9 の配列に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含み、前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、対応する野生型 A c t R I I B ポリペプチドの比よりも大きい G D F 1 1 : アクチビン結合比を有する、方法。

## (項目 4 1)

前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、配列番号 1 の 7 9 位に対応する位置に酸性アミノ酸を含む、項目 4 0 に記載の方法。

## (項目 4 2)

前記患者がヒト患者である、項目 4 0 に記載の方法。

## (項目 4 3)

前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、対応する野生型 A c t R I I B ポリペプチドの比よりも大きい G D F 1 1 : アクチビン A 結合比を有する、項目 4 0 に記載の方法。

## (項目 4 4)

前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、(a) 配列番号 1 のアミノ酸 2 2 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 3 3 ~ 1 3 4 のいずれかで終わる配列、(b) 配列番号 1 のアミノ酸 2 1 ~ 2 9 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 1 3 4 のいずれかで終わる配列、(c) 配列番号 1 のアミノ酸 2 1 ~ 2 9 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 2 8 ~ 1 3 4 のいずれかで終わる配列、(d) 配列番号 1 のアミノ酸 2 1 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 0 9 ~ 1 3 4 のいずれかで終わる配列、(e) 配列番号 1 のアミノ酸 2 1 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 1 3 4 のいずれかで終わる配列、(f) 配列番号 1 のアミノ酸 2 1 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 2 8 ~ 1 3 4 のいずれかで終わる配列、(g) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 ~ 2 9 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 0 9 ~ 1 3 3 のいずれかで終わる配列、(h) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 ~ 2 9 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 1 3 3 のいずれかで終わる配列、(i) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 ~ 2 9 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 2 8 ~ 1 3 3 のいずれかで終わる配列、(j) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 0 9 ~ 1 3 3 のいずれかで終わる配列、(k) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 8 ~ 1 3 3 のいずれかで終わる配列、(l) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 ~ 2 4 のいずれかから始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 2 8 ~ 1 3 3 のいずれかで終わる配列、および (m) 配列番号 1 のアミノ酸 2 0 から始まり、配列番号 1 のアミノ酸 1 3 4 で終わる配列、からなる群より選択される配列に少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 4 0 に記載の方法。

## (項目 4 5)

前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、グリコシル化アミノ酸、P E G 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、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、1 つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基を含む、項目 4 0 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

## (項目 4 6)

赤血球レベルの増加が血中ヘモグロビンレベルの増加として測定される、項目 4 0 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

## (項目 4 7)

前記患者の骨格筋量の 1 5 % 未満の増加を引き起こす、項目 4 0 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

## (項目 4 8)

前記改変体 A c t R I I B ポリペプチドが、改変体 A c t R I I B ポリペプチドドメインに加えて、インビボ安定性、インビボ半減期、取込み／投与、組織局在化もしくは分布、タンパク質複合体の形成および／または精製の 1 つまたは複数を強化する 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である、項目 40 から 44 のいずれかに記載の方法。

(項目 49)

前記融合タンパク質が、免疫グロブリン F c ドメインおよび血清アルブミンからなる群より選択されるポリペプチド部分を含む、項目 40 から 44 のいずれかに記載の方法。

(項目 50)

前記融合タンパク質が、

a) 配列番号 7、11、28、29、32、37 および 38 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、

b) 配列番号 7、11、28、29、32、37 および 38 のアミノ酸配列に少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列、ならびに

c) 配列番号 7、11、28、29、32、37 および 38 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む改変体 A c t R I I B - F c 融合タンパク質である、項目 49 に記載の方法。

(項目 51)

前記改変体 A c t R I I B - F c 融合タンパク質が、15～30 日の血清半減期を有する、項目 50 に記載の方法。

(項目 52)

前記改変体 A c t R I I B - F c 融合タンパク質が、週に 1 回以下の頻度で前記患者に投与される、項目 50 に記載の方法。

(項目 53)

前記改変体 A c t R I I B - F c 融合タンパク質が、月に 1 回以下の頻度で前記患者に投与される、項目 50 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】図 1 は、本明細書中で推定される残基を持つヒト A c t R I I A (配列番号 15) およびヒト A c t R I I B (配列番号 2) の細胞外ドメインのアラインメントを示し、これは、枠で示した、リガンドと直接接触するための複数の A c t R I I B および A c t R I I A の結晶構造 (リガンド結合ポケット) の合成分析に基づく。

【図 2】図 2 は、種々の脊椎動物 A c t R I I B タンパク質およびヒト A c t R I I A (配列番号 16～23) の複数の配列アラインメントを示す。

【図 3】図 3 は、TPA リーダー配列 (二重下線を付す)、A c t R I I B 細胞外ドメイン (配列番号 1 の残基 20～134、下線を付す) および h F c ドメインを含む、G D F トラップ A c t R I I B (L 79 D 20～134) - h F c (配列番号 11) の全アミノ酸配列を示す。配列決定によって成熟融合タンパク質の N 末端残基であることが明らかになったグリシンと同様に、ネイティブな配列の 79 位において置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、目立たせている。

【図 4-1】図 4 は、A c t R I I B (L 79 D 20～134) - h F c をコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号 25 がセンス鎖に対応し、配列番号 33 がアンチセンス鎖に対応する。TPA リーダー (ヌクレオチド 1～66) に二重下線を付し、A c t R I I B 細胞外ドメイン (ヌクレオチド 76～420) に下線を付す。

【図 4-2】図 4 は、A c t R I I B (L 79 D 20～134) - h F c をコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号 25 がセンス鎖に対応し、配列番号 33 がアンチセンス鎖に対応する。TPA リーダー (ヌクレオチド 1～66) に二重下線を付し、A c t R I I B 細胞外ドメイン (ヌクレオチド 76～420) に下線を付す。

【図 5】図 5 は、TPA リーダー (二重下線を付す)、切断された A c t R I I B 細胞外ドメイン (配列番号 1 の残基 25～131、下線を付す)、および h F c ドメインを含む

10

20

30

40

50

、切断されたGDFトラップActRIIB (L79D 25~131) -hFcの全アミノ酸配列を示す(配列番号26)。配列決定によって成熟融合タンパク質のN末端残基であることが明らかになったグルタミン酸と同様に、ネイティブな配列の79位において置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、目立たせている。

【図6-1】図6は、ActRIIB (L79D 25~131) -hFcをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号27がセンス鎖に対応し、配列番号34がアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー(ヌクレオチド1~66)に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン(ヌクレオチド76~396)に下線を付す。ActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25~131)のアミノ酸配列も示す。

【図6-2】図6は、ActRIIB (L79D 25~131) -hFcをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号27がセンス鎖に対応し、配列番号34がアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー(ヌクレオチド1~66)に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン(ヌクレオチド76~396)に下線を付す。ActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25~131)のアミノ酸配列も示す。

【図7】図7は、リーダーを持たない切断されたGDFトラップActRIIB (L79D 25~131) -hFcのアミノ酸配列を示す(配列番号28)。切断されたActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25~131)に下線を付す。配列決定によって成熟融合タンパク質のN末端残基であることが明らかになったグルタミン酸と同様に、ネイティブな配列の79位において置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、目立たせている。

【図8】図8は、リーダー、hFcドメイン、およびリンカーを持たない切断されたGDFトラップActRIIB (L79D 25~131)のアミノ酸配列を示す(配列番号29)。配列決定によって成熟融合タンパク質のN末端残基であることが明らかになったグルタミン酸と同様に、ネイティブな配列の79位において置換されたアスパラギン酸に下線およびマーカーを付す。

【図9-1】図9は、ActRIIB (L79D 25~131) -hFcをコードする代替ヌクレオチド配列を示す。配列番号30がセンス鎖に対応し、配列番号35がアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー(ヌクレオチド1~66)に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン(ヌクレオチド76~396)に下線を付し、細胞外ドメインの野生型ヌクレオチド配列における置換に二重下線およびマーカーを付す(図6、配列番号27と比較)。ActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25~131)のアミノ酸配列も示す。

【図9-2】図9は、ActRIIB (L79D 25~131) -hFcをコードする代替ヌクレオチド配列を示す。配列番号30がセンス鎖に対応し、配列番号35がアンチセンス鎖に対応する。TPAリーダー(ヌクレオチド1~66)に二重下線を付し、切断されたActRIIB細胞外ドメイン(ヌクレオチド76~396)に下線を付し、細胞外ドメインの野生型ヌクレオチド配列における置換に二重下線およびマーカーを付す(図6、配列番号27と比較)。ActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25~131)のアミノ酸配列も示す。

【図10】図10は、図9に示した代替ヌクレオチド配列(配列番号30)のヌクレオチド76~396を示す(配列番号31)。図9に示したものと同一ヌクレオチド置換について、ここでも同様に下線を付し、目立たせている。配列番号31は、L79D置換を持つ切断されたActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25~131に対応する)、例えばActRIIB (L79D 25~131)のみをコードする。

【図11】図11は、化学療法誘発性貧血のマウスモデルにおけるヘモグロビン濃度に対するActRIIB (L79D 25~131) -hFcの作用を示す。データは、平均値±SEMである。\*\*、同時点でパクリタキセルに対して $P < 0.01$ 。このGDFトラップはパクリタキセルによる処置によって誘発された貧血を相殺した。

【図12】図12は、片側腎摘出された(NEPHX)慢性腎疾患のマウスモデルにおける赤血球(RBC)レベルに対するActRIIB (L79D 25~131) -hFc

10

20

30

40

50

の作用を示す。データは平均値±SEMである。\*\*\*、ベースラインに対して $P<0.001$ 。このGDFトラップは、対照マウスにおいて観察された腎摘出誘発性貧血を逆転させた。

【図13】図13は、片側腎摘出された(NEPHX)慢性腎疾患のマウスモデルにおける赤血球(RBC)、ヘモグロビン(HGB)、およびヘマトクリット(HCT)のレベルに対するActRIIB(L79D 25~131)-hFcの作用を示す。データは、4週間にわたる、ベースラインからの平均変化である(±SEM)。\*NEPHX対照に対して $P<0.05$ 、\*\*NEPHX対照に対して $P<0.01$ 、\*\*\*NEPHX対照に対して $P<0.001$ 。このGDFトラップは、これらの赤血球パラメータをそれぞれ、腎臓がインタクトな(偽)マウスと同様の大きさまで増加させ、腎摘出に伴うこれらの赤血球パラメータの減退を妨げた。

10

【図14】図14は、急性失血によって誘発された貧血のラットモデルにおける赤血球(RBC)レベルに対するActRIIB(L79D 25~131)-hFcの作用を示す。-1日目に血液を除去し、0日目および3日目に投薬した。データは、平均値±SEMである。\*\*同時点でビヒクルに対して $P<0.01$ 、\*\*\*同時点でビヒクルに対して $P<0.001$ 。このGDFトラップは、失血誘発性貧血からの回復の速度および程度を改善した。

【図15】図15は、カニクイザルにおける、赤血球濃度のベースラインからの絶対的な変化に対する、ActRIIB(L79D 20~134)-hFc(灰色)またはActRIIB(L79D 25~131)-hFc(黒色)を用いた処置の作用を示す。VEH=ビヒクル。データは平均値±SEM。群当たり $n=4\sim 8$ 。

20

【図16】図16は、カニクイザルにおける、ヘマトクリットのベースラインからの絶対的な変化に対する、ActRIIB(L79D 20~134)-hFc(灰色)またはActRIIB(L79D 25~131)-hFc(黒色)を用いた処置の作用を示す。VEH=ビヒクル。データは平均値±SEM。群当たり $n=4\sim 8$ 。

【図17】図17は、カニクイザルにおける、ヘモグロビン濃度のベースラインからの絶対的な変化に対する、ActRIIB(L79D 20~134)-hFc(灰色)またはActRIIB(L79D 25~131)-hFc(黒色)を用いた処置の作用を示す。VEH=ビヒクル。データは平均値±SEM。群当たり $n=4\sim 8$ 。

【図18】図18は、カニクイザルにおける、循環網状赤血球濃度のベースラインからの絶対的な変化に対する、ActRIIB(L79D 20~134)-hFc(灰色)またはActRIIB(L79D 25~131)-hFc(黒色)を用いた処置の作用を示す。VEH=ビヒクル。データは平均値±SEM。群当たり $n=4\sim 8$ 。

30

【発明を実施するための形態】

【0025】

(発明の詳細な説明)

(1. 概要)

トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーは、共通の配列エレメントと構造モチーフを共有する、種々の増殖因子を含む。これらのタンパク質は、脊椎動物および無脊椎動物の両方における広範な種々の細胞型に対して生物学的作用を発揮することが公知である。このスーパーファミリーのメンバーは、胚発生の際に、パターン形成および組織の特異化において重要な機能を果たし、そして、脂質生成、筋発生、軟骨形成、心臓発生、造血、神経発生および上皮細胞分化を含む種々の分化プロセスに影響を及ぼし得る。このファミリーは、2つの一般的な枝：BMP/GDFの枝およびTGF- $\beta$ /アクチビン/BMP10の枝、に分けられ、これらのメンバーは、多様な、しばしば相補的な作用を有する。TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーの活性を操作することによって、しばしば、生物において有意な生理学的変化を引き起こすことが可能である。例えば、ウシのPiedmonteseおよびBelgian Blue品種は、GDF8(ミオスタチンとも呼ばれる)遺伝子に機能喪失変異を有しており、筋肉量の顕著な増加を引き起こしている。Grobetら、Nat Genet. 1997年、17巻(1号)：

40

50

71～4頁。さらに、ヒトでは、GDF8の不活性な対立遺伝子は、筋肉量の増加、および、報告によれば、非常に優れた強度と関連している。Schuelkeら、N Engl J Med 2004年、350巻：2682～8頁。

【0026】

TGF- $\beta$ シグナルは、I型およびII型のセリン／スレオニンキナーゼ受容体の異種複合体 (heteromeric complex) によって媒介され、これらは、リガンド刺激の際に、下流のSmadタンパク質をリン酸化および活性化する (Massague、2000年、Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1巻：169～178頁)。これらのI型およびII型受容体は、システインリッチな領域を持つリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および、予測セリン／スレオニン特異性を持つ細胞質ドメインから構成される膜貫通タンパク質である。I型受容体は、シグナル伝達に必須であり、そして、II型受容体は、リガンド結合およびI型受容体の発現に必要とされる。I型およびII型のアクチビン受容体は、リガンド結合後に安定な複合体を形成し、II型受容体によるI型受容体のリン酸化をもたらす。

【0027】

2つの関連するII型受容体 (ActRII) であるActRIIAおよびActRIIBが、アクチビンに対するII型受容体として同定されている (MathewsおよびVale、1991年、Cell 65巻：973～982頁；Attisanoら、1992年、Cell 68巻：97～108頁)。ActRIIAおよびActRIIBは、アクチビンに加えて、BMP7、Nodal、GDF8およびGDF11を含むいくつかの他のTGF- $\beta$ ファミリータンパク質と生化学的に相互作用し得る (Yamashitaら、1995年、J. Cell Biol. 130巻：217～226頁；LeeおよびMcPherron、2001年、Proc. Natl. Acad. Sci. 98巻：9306～9311頁；YeoおよびWhitman、2001年、Mol. Cell 7巻：949～957頁；Ohら、2002年、Genes Dev. 16巻：2749～54頁)。ALK4は、アクチビン、特にアクチビンAに対する主たるI型受容体であり、そして、ALK7は同様に、アクチビン、特にアクチビンBに対する受容体として機能し得る。特定の実施形態では、本発明は、本主題のGDFトラップポリペプチドでActRIIB受容体のリガンド (ActRIIBリガンドとも呼ばれる) に拮抗することに関する。ActRIIB受容体の例示的なリガンドには、一部のTGF- $\beta$ ファミリーメンバー、例えばアクチビン、Nodal、GDF8、GDF11およびBMP7が含まれる。

【0028】

アクチビンは、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する二量体ポリペプチド増殖因子である。3つの主なアクチビン形態 (A、BおよびAB) が存在し、これらは、2つの密接に関連する $\beta$ サブユニットのホモ二量体／ヘテロ二量体 (それぞれ、 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ および $\beta_A\beta_B$ ) である。ヒトゲノムはまた、アクチビンCおよびアクチビンEもコードしているが、これらは、主として肝臓で発現されており、そして、 $\beta_C$ もしくは $\beta_E$ を含むヘテロ二量体形態もまた公知である。TGF- $\beta$ スーパーファミリーにおいて、アクチビンは、卵巣および胎盤の細胞におけるホルモン生成を刺激し得、神経細胞の生存を支援し得、細胞周期の進行に対して細胞型に依存して正もしくは負に影響を及ぼし得、そして、少なくとも両生類の胚において中胚葉分化を誘導し得る、独特かつ多機能の因子である (DePaoloら、1991年、Proc Soc Exp Biol Med. 198巻：500～512頁；Dysonら、1997年、Curr Biol. 7巻：81～84頁；Woodruff、1998年、Biochem Pharmacol. 55巻：953～963頁)。さらに、刺激されたヒト単球性白血病細胞から単離された赤血球分化因子 (EDF) は、アクチビンAと同一であることが分かった (Murataら、1988年、PNAS. 85巻：2434頁)。アクチビンAは、骨髄における赤血球生成を促進することが示唆されている。いくつかの組織では、アクチビンのシグナル伝達は、その関連するヘテロ二量体であるインヒビンによって拮抗される。例えば、下垂体からの卵胞

刺激ホルモン（FSH）の放出の間に、アクチピンは、FSHの分泌および合成を促進するが、インヒピンは、FSHの分泌および合成を抑制する。アクチピンの生活性を調節し得、そして／または、アクチピンに結合し得る他のタンパク質としては、フォリスタチン（FS）、フォリスタチン関連タンパク質（FSRP）および $\alpha_2$ -マクログロブリンが挙げられる。

#### 【0029】

Nodalタンパク質は、中胚葉および内胚葉の誘導および形成、ならびに初期胚形成における心臓および胃などの軸構造物の以降の組織化において機能を果たす。発生中の脊椎動物の胚の背側組織は脊索および前索板の軸構造物に主に寄与し、同時に、それは周辺細胞を動員して非軸性の胚性構造物を形成することが実証されている。Nodalは、I型およびII型の両受容体ならびにSmadタンパク質として公知の細胞内のエフェクターを通してシグナル伝達するようである。最近の研究は、ActRIIAおよびActRIIBがNodalのためのII型受容体の役目を果たすという考えを支持している（Sakumaら、Genes Cells、2002年、7巻：401～12頁）。Nodalリガンドは、それらの補助因子（例えば、cripto）と相互作用して、Smad2をリン酸化するアクチピンI型およびII型受容体を活性化させることが示唆されている。Nodalタンパク質は、中胚葉形成、前方パターンニングおよび左右軸の特異化を含む、初期の脊椎動物の胚に重要な多くの事象との関係が示唆されている。実験上の証拠は、Nodalシグナル伝達が、アクチピンおよびTGF- $\beta$ に特異的に応答することが前に示されたルシフェラーゼレポーターである、pAR3-Luxを活性化することを実証している。しかし、Nodalは、骨形態発生タンパク質に特異的に応答性であるレポーターであるpTlx2-Luxを誘導することができない。最新結果は、Nodalシグナル伝達がアクチピン-TGF- $\beta$ 経路SmadのSmad2およびSmad3の両方によって媒介されることの直接の生化学的証拠を提供する。さらなる証拠は、細胞外のcriptoタンパク質がNodalシグナル伝達のために必要とされることを示し、このことは、Nodalシグナル伝達をアクチピンまたはTGF- $\beta$ のシグナル伝達から差別化する。

#### 【0030】

増殖および分化因子8（GDF8）は、ミオスタチンとしても公知である。GDF8は、骨格筋量の負の調節因子である。GDF8は、発生中および成体の骨格筋で高く発現される。トランスジェニックマウスでのGDF8ヌル変異は、骨格筋の著しい肥大および過形成を特徴とする（McPheronら、Nature、1997年、387巻：83～90頁）。骨格筋量の類似した増加は、ウシ（Ashmoreら、1974年、Growth、38巻：501～507頁；SwatlandおよびKieffer、J. Anim. Sci.、1994年、38巻：752～757頁；McPheronおよびLee、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1997年、94巻：12457～12461頁およびKambadurら、Genome Res.、1997年、7巻：910～915頁）、および驚くべきことにヒト（Schuelkeら、N Engl J Med、2004年、350巻：2682～8頁）のGDF8の天然に存在する変異において明白である。研究は、ヒトのHIV感染に関連する筋肉消耗には、GDF8タンパク質発現の増加が付随することも示している（Gonzalez-Cadavidら、PNAS、1998年、95巻：14938～43頁）。さらに、GDF8は筋肉特異的酵素（例えば、クレアチンキナーゼ）の生成を調節すること、および筋芽細胞増殖を調節することができる（国際公開第00／43781号）。GDF8プロペプチドは、成熟したGDF8ドメイン二量体に非共有結合的に結合し、その生物活性を不活性化することができる（Miyazonoら、（1988年）J. Biol. Chem.、263巻：6407～6415頁；Wakefieldら（1988年）J. Biol. Chem.、263巻：7646～7654頁およびBrownら（1990年）Growth Factors、3巻：35～43頁）。GDF8または構造的に関連するタンパク質に結合して、それらの生物活性を阻害する他のタンパク質には、フォリスタ

10

20

30

40

50

チン、および潜在的に、フォリスタチン関連のタンパク質が含まれる（Gamerら（1999年）Dev. Biol.、208巻：222～232頁）。

#### 【0031】

BMP11としても公知の増殖および分化因子11（GDF11）は、分泌タンパク質である（McPherronら、1999年、Nat. Genet. 22巻：260～264頁）。GDF11は、マウスの発生中、尾芽、肢芽、上顎および下顎弓、ならびに後根神経節で発現される（Nakashimaら、1999年、Mech. Dev. 80巻：185～189頁）。GDF11は、中胚葉および神経の両組織をパターン化することにおいて、特異な役割を演ずる（Gamerら、1999年、Dev Biol.、208巻：222～32頁）。GDF11は、発生中のニワトリの肢における軟骨形成および筋発生の負の調節因子であることが示された（Gamerら、2001年、Dev Biol. 229巻：407～20頁）。筋肉でのGDF11の発現はまた、GDF8に類似した方法で筋成長を調節することにおけるその役割を示唆する。さらに、脳でのGDF11の発現は、GDF11が神経系の機能に関する活性を有することもできることを示唆する。興味深いことに、GDF11は嗅上皮で神経発生を阻害することが見出された（Wuら、2003年、Neuron. 37巻：197～207頁）。したがって、GDF11は、筋肉疾患および神経変性疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症）などの疾患の処置において、インビトロおよびインビボでの適用を有することができる。

#### 【0032】

骨形成性タンパク質1（OP-1）とも呼ばれる骨形態発生タンパク質（BMP7）は、軟骨および骨の形成を誘導することが周知である。さらに、BMP7は多数の生理過程を調節する。例えば、BMP7は、上皮骨形成の現象の役割を担う、骨誘導因子である可能性がある。BMP7は、カルシウム調節および骨ホメオスタシスで役割を果たすことが見出されてもいる。アクチビンと同様に、BMP7は、II型受容体、ActRIIAおよびActRIIBに結合する。しかし、BMP7およびアクチビンは、ヘテロマーの受容体複合体に異なるI型受容体を動員する。観察された主要なBMP7のI型受容体はALK2であったが、アクチビンはALK4（ActRIIB）に排他的に結合した。BMP7およびアクチビンは異なる生物反応を引き出して、異なるSmad経路を活性化した（Macias-Silvaら、1998年、J Biol Chem. 273巻：25628～36頁）。

#### 【0033】

本明細書で実証されるように、改変体ActRIIBポリペプチド（ActRIIB）であるGDFトラップポリペプチドは、野生型の可溶性ActRIIBポリペプチドと比較してインビボで赤血球レベルを高めることにおいてより有効であり、貧血の様々なモデルで有益な影響を及ぼす。造血は、エリスロポエチン、G-CSFおよび鉄のホメオスタシスを含む種々の要因によって調節される複雑なプロセスであることに注意すべきである。用語「赤血球レベルを増加させる」および「赤血球の形成を促進する」とは、ヘマトクリット、赤血球数およびヘモグロビン測定値のような臨床的に観察可能な測定基準（metrics）を指し、そのような変化が生じる機構に関しては中立であることが意図される。

#### 【0034】

赤血球レベルを刺激することに加えて、GDFトラップポリペプチドは、例えば筋成長を促進することを含む様々な治療適用に有用である（参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、PCT公開WO2006/012627およびPCT公開WO2008/097541を参照）。特定の例では、筋肉を増加させるためにGDFトラップポリペプチドを投与する場合、赤血球に対する影響を低減または最小にすることが望ましいことがある。GDFトラップポリペプチドによって処置されている患者、またはその処置候補である患者で様々な血液学的パラメータをモニターすることによって、適当な投薬（投与の量および頻度を含む）を、個々の患者の必要性、ベースラインの血液学的パラメータおよび処置目的に基づいて判定することができる。さらに、治療の進捗および1つまたは複

数の血液学的パラメータに対する経時的影響は、患者ケアの促進、適当な維持投薬（量および頻度の両方）の判定などによって、G D Fトラップポリペプチドを投薬されている患者の管理において有益となることがある。

【0035】

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

【0036】

「約」および「およそ」は、一般に、測定 of 性質または正確さが既知の測定された量についての誤差の容認可能な程度を意味するものとする。代表的には、例示的な誤差の程度は、所与の値または値の範囲の、20パーセント（%）以内、好ましくは10パーセント（%）以内、そしてより好ましくは5%以内である。

【0037】

あるいは、そして、特に生物学的な系において、用語「約」および「およそ」は、所与の値の1桁以内、好ましくは、5倍以内、そしてより好ましくは2倍以内の値を意味し得る。本明細書中に与えられる数量は、特に明記しない限り近似値であり、明白に記述されない場合には、用語「約」または「およそ」が、推量され得ることを意味する。

【0038】

本発明の方法は、配列を互いに比較する工程を包含し得、この比較には、野生型配列の1または複数の変異体（配列改変体）に対する比較を含む。このような比較は代表的には、例えば、当該分野で周知の配列アラインメントのプログラムおよび／またはアルゴリズム（例えば、少数の名を挙げれば、BLAST、FASTAおよびMEGALIGN）を用いた、ポリマー配列のアラインメントを含む。当業者は、変異が残基の挿入または欠失を含む場合のこのようなアラインメントにおいて、配列のアラインメントは、挿入もしくは欠失された残基を含まないポリマー配列中に「ギャップ」（代表的には、ダッシュまたは「A」で表される）を導入することを容易に理解し得る。

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

（2. G D Fトラップポリペプチド）

特定の態様では、本発明はG D Fトラップポリペプチド、例えば、可溶性の改変体A c t R I I Bポリペプチド、例えば、A c t R I I Bポリペプチドのフラグメント、機能的改変体、および修飾された形態を含めたものに関する。特定の実施形態では、G D Fトラップポリペプチドは、少なくとも1の、対応する野生型A c t R I I Bポリペプチドと同

10

20

30

40

50

様または同一の生物活性を有する。例えば、本発明のGDFトラップポリペプチドは、ActRIIBリガンドに結合し、その機能を阻害し得る（例えば、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、Nodal、GDF8、GDF11またはBMP7）。任意選択で、GDFトラップポリペプチドは赤血球レベルを増加させる。GDFトラップポリペプチドの例としては、1つまたは複数の配列の差異を有するヒトActRIIB前駆体ポリペプチド（配列番号1または39）、および1つまたは複数の配列の差異を有する可溶性ヒトActRIIBポリペプチド（例えば、配列番号2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40および41）が挙げられる。GDFトラップは、例えばGDF11および／またはミオスタチンを含めた他のActRIIBリガンドと比較してアクチビンに対する親和性が減少したActRIIBポリペプチドを指す。

10

#### 【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「ActRIIB」は、任意の種に由来するアクチビン受容体IIB型（ActRIIB）タンパク質のファミリー、および、変異誘発もしくは他の修飾法によってこのようなActRIIBタンパク質から誘導された改変体を指す。本明細書におけるActRIIBに対する言及は、現在同定されている形態のうちの任意の1つに対する言及であるものと理解される。ActRIIBファミリーのメンバーは、一般に、システインリッチな領域を持つリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび予測セリン／スレオニンキナーゼ活性を持つ細胞質ドメインから構成される、膜貫通タンパク質である。ヒトActRIA可溶性細胞外ドメイン（比較のために準備した）およびActRIIB可溶性細胞外ドメインのアミノ酸配列を図1に示す。

20

#### 【0044】

用語「ActRIIBポリペプチド」は、ActRIIBファミリーメンバーの任意の天然に存在するポリペプチド、ならびに、有用な活性を保持するその任意の改変体（変異体、フラグメント、融合物およびペプチド模倣形態を含む）を含むポリペプチドを包含する。例えば、WO2006/012627を参照のこと。例えば、ActRIIBポリペプチドは、ActRIIBポリペプチドの配列に対して少なくとも約80%同一な、そして、任意選択で、少なくとも85%、90%、95%、97%、99%もしくはそれより高い同一性を持つ配列を有する任意の公知のActRIIBの配列から誘導されたポリペプチドを包含する。例えば、ActRIIBポリペプチドは、ActRIIBタンパク質および／またはアクチビンに結合し、これらの機能を阻害し得る。GDFトラップであるActRIIBポリペプチドは、インビボで赤血球の形成を促進する際の活性について選択され得る。ActRIIBポリペプチドの例としては、ヒトActRIIB前駆体ポリペプチド（配列番号1および39）および可溶性ヒトActRIIBポリペプチド（例えば、配列番号2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40および41）が挙げられる。本明細書中に記載される全てのActRIIB関連ポリペプチドのアミノ酸の番号付けは、他に特に指定がなければ、配列番号1についての番号付けに基づく。

30

#### 【0045】

ヒトActRIIB前駆体タンパク質の配列は以下の通りである。

#### 【0046】

40

## 【化1】

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERC  
 EGEQDKRLHCYASWRN**N**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ  
 VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIG  
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK  
 ARGRFGCVWKAQLMND FVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL  
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM  
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA  
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV  
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK  
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS  
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI ( 配列番号1 )

10

## 【0047】

シグナルペプチドに一重下線を付す。細胞外ドメインは太字で示し、そして、潜在的なN連結グリコシル化部位は四角で囲む。

20

## 【0048】

64位にアラニンを持つ形態も、以下の通り文献に報告されている。

## 【0049】

## 【化2】

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERC  
 EGEQDKRLHCYASWAN**N**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ  
 VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIG  
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK  
 ARGRFGCVWKAQLMND FVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL  
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM  
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA  
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV  
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK  
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS  
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI ( 配列番号39 )

30

40

## 【0050】

ヒトActRIIBの可溶性（細胞外）の、プロセッシング後のポリペプチド配列は以下の通りである。

## 【0051】

50

## 【化3】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG  
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP  
EAGGPEVTYEPPTAPT (配列番号 2)

## 【0052】

A64を持つ代替の形態は以下の通りである。

## 【0053】

## 【化4】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG  
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP  
EAGGPEVTYEPPTAPT (配列番号 40)

## 【0054】

一部の条件では、タンパク質はN末端に「SGR...」配列を伴って生成され得る。  
細胞外ドメインのC末端「テール」に下線を付す。「テール」が欠失された配列(△15  
配列)は以下の通りである。

## 【0055】

## 【化5】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG  
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP  
EA (配列番号 3)

## 【0056】

A64を持つ代替の形態は以下の通りである。

## 【0057】

## 【化6】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG  
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP  
EA (配列番号 41)

## 【0058】

一部の条件では、タンパク質はN末端に「SGR...」配列を伴って生成され得る。  
ヒトActRIIB前駆体タンパク質をコードする核酸配列は以下の通りである(Gen  
bankエントリーNM\_001106のヌクレオチド5~1543)(示した配列は6  
4位にアラニンを提供し、代わりにアルギニンを提供するように修飾され得る)。

## 【0059】

10

20

30

40

50

## 【化 7】

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC  
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA  
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC  
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA  
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT  
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG  
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC  
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC

10

## 【0 0 6 0】

## 【化 8】

AGCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG  
GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGATGTACCGGCATCGCA  
AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC  
ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG  
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT  
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG  
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA  
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT  
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA  
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG  
TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG  
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT  
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT  
GTTGATTGTAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG  
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT  
CCAGAGAGATGCCTTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG  
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG  
AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA  
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCCCACCATTA  
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG  
AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT  
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG  
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCC  
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (配列番号 4)

20

30

40

## 【0 0 6 1】

50

ヒトA c t R I I Aの可溶性（細胞外）ポリペプチドをコードする核酸配列は以下の通りである（示した配列は64位にアラニンを提供し、代わりにアルギニンを提供するように修飾され得る。

【0062】

【化9】

```
GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCCGA
GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC
ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
```

10

【0063】

【化10】

```
CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA
GAGGCTGGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCA
```

CC（配列番号 5）

20

【0064】

特定の実施形態では、本発明は、可溶性A c t R I I Bポリペプチドの改変体の形態であるG D Fトラップポリペプチドに関する。本明細書中に記載されるように、用語「可溶性A c t R I I Bポリペプチド」は、一般に、A c t R I I Bタンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドを指す。本明細書中で使用される場合、用語「可溶性A c t R I I Bポリペプチド」は、任意の天然に存在するA c t R I I Bタンパク質の細胞外ドメイン、ならびに、有用な活性を保持するその任意の改変体（変異体、フラグメントおよびペプチド模倣形態を含む）を包含する。例えば、A c t R I I Bタンパク質の細胞外ドメインはリガンドに結合し、一般に可溶性である。可溶性A c t R I I Bポリペプチドの例としては、A c t R I I Bの可溶性ポリペプチド（例えば、配列番号22、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40および41）が挙げられる。可溶性A c t R I I Bポリペプチドの他の例は、A c t R I I Bタンパク質の細胞外ドメインに加えて、シグナル配列を含む。実施例1を参照のこと。シグナル配列は、A c t I I Bのネイティブなシグナル配列、または組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）のシグナル配列もしくはミツバチメリチン（HBM）のシグナル配列などの、別のタンパク質からのシグナル配列であり得る。

30

【0065】

本開示は、A c t R I I Bの機能的に活性な部分および改変体を同定する。出願人は、配列番号1のアミノ酸64に対応する位置にアラニンを有する（A64）、H i l d e n ら（B l o o d . 1994年4月15日；83巻（8号）：2163～70頁）によって開示されている配列を有するFc融合タンパク質が、アクチビンおよびG D F-11に対して比較的低い親和性を有することを確認した。対照的に、64位にアルギニンを持つ（R64）同じFc融合タンパク質は、アクチビンおよびG D F-11に対して、低ナノモルから高ピコモルまでの範囲で親和性を有する。したがって、R64を持つ配列は、本開示では、ヒトA c t R I I Bの野生型参照配列として使用される。

40

【0066】

A t t i s a n o ら（C e l l . 1992年1月10日；68巻（1号）97～108頁）は、A c t R I I Bの細胞外ドメインのC末端におけるプロリンノットの欠失により、アクチビンに対する受容体の親和性が減少することを示した。配列番号1のアミノ酸2

50

0～119を含有するA c t R I I B－F c融合タンパク質、「A c t R I I B（20～119）－F c」は、プロリンノット領域および完全な膜近傍ドメインを含むA c t R I I B（20～134）－F cと比較してG D F－11およびアクチビンへの結合が減少している。しかし、A c t R I I B（20～129）－F cタンパク質は、プロリンノット領域が破壊されているにもかかわらず、野生型と比較して同様だがいくらか減少した活性を保持する。したがって、アミノ酸134、133、132、131、130および129で終止するA c t R I I B細胞外ドメインは全て活性であると予想されるが、134または133で終止する構築物が最も活性であり得る。同様に、残基129～134のいずれかにおける変異によってリガンドの結合親和性が大幅に変更されるとは予想されない。この裏付けとして、P129およびP130の変異によってリガンドの結合は実質的に低下しない。したがって、A c t R I I B－F c融合タンパク質であるG D Fトラップポリペプチドは、早ければアミノ酸109（最後のシステイン）で終了し得るが、109～119で終わる形態は、リガンドの結合が減少していると予想される。アミノ酸119は、不完全に保存されているので、容易に変更または切断される。128以後で終わる形態はリガンドの結合活性を保持している。119～127で終わる形態は、中間の結合能を有する。これらの形態はいずれも、臨床的または実験的な設定に応じて使用することが望ましい場合がある。

#### 【0067】

A c t R I I BのN末端において、アミノ酸29以前で始まるタンパク質は、リガンドの結合活性を保持していると予想される。アミノ酸29は開始システインを表す。24位におけるアラニンからアスパラギンへの変異により、リガンドの結合に実質的に影響を及ぼすことなくN-連結グリコシル化配列が導入される。これにより、アミノ酸20～29に対応する、シグナル切断ペプチドとシステイン架橋領域との間の領域における変異が良好に許容されることが確認される。具体的には、20位、21位、22位、23位および24位から始まる構築物は活性を保持し、25位、26位、27位、28位および29位から始まる構築物も活性を保持すると予想される。実施例中に示されるデータは、驚くべきことに、22位、23位、24位または25位から始まる構築物が最も活性であることを実証している。

#### 【0068】

総合すると、A c t R I I Bの活性部分は配列番号1のアミノ酸29～109を含み、G D Fトラップ構築物は、例えば、配列番号1または39のアミノ酸20～29に対応する残基から始まり、配列番号1または39のアミノ酸109～134に対応する位置で終わるA c t R I I Bの部分を含み得る。他の例としては、配列番号1または39の20～29または21～29からの1つの位置から始まり、119～134、119～133、129～134、または129～133からの1つの位置で終わる構築物が挙げられる。他の例としては、配列番号1または39の20～24（もしくは21～24、もしくは22～25）からの1つの位置から始まり、109～134（もしくは109～133）、119～134（もしくは119～133）または129～134（もしくは129～133）からの1つの位置で終わる構築物が挙げられる。これらの範囲内の改変体、特に、配列番号1または39の対応する部分に対して少なくとも80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有する改変体も企図される。特定の実施形態では、G D Fトラップポリペプチドは、配列番号1または39のアミノ酸残基25～131と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、または、それからなる。特定の実施形態では、G D Fトラップポリペプチドは、配列番号7、26、28、29、32、37または38と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、または、それからなる。好ましい実施形態では、G D Fトラップポリペプチドは、配列番号7、26、28、29、32、37または38のアミノ酸配列からなるか、または、それから本質的になる。

10

20

30

40

50

## 【0069】

本開示は、図1に示されるように、合成A c t R I I B構造の分析結果を含み、これは、リガンド結合ポケットが残基Y31、N33、N35、L38～T41、E47、E50、Q53～K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78～N83、Y85、R87、A92、およびE94～F101によって規定されることを実証している。これらの位置において、保存的変異は許容されると予想されるが、K74A変異は、R40A、K55A、F82A、およびL79位における変異と同様に良好に許容される。R40はツメガエルにおいてKであり、この位置の塩基性アミノ酸が許容されることを示している。Q53は、ウシのA c t R I I BではRであり、ツメガエルのA c t R I I BではKであり、したがって、R、K、Q、NおよびHを含めたアミノ酸がこの位置で許容される。したがって、GDFトラップタンパク質の一般式は、配列番号1または39のアミノ酸29～109を含むものであるが、任意選択で、20～24または22～25の範囲の1つの位置から始まり、129～134の範囲の1つの位置で終わり、リガンド結合ポケットにおいて1、2、5、10または15以下の保存的なアミノ酸の変化を含み、リガンド結合ポケットの40位、53位、55位、74位、79位および／または82位において0、1またはそれ以上の非保存的な変更を含む。このようなタンパク質は、配列番号1または39のアミノ酸29～109の配列に対して80%、90%、95%または99%を超える配列同一性を保持し得る。可変性が特に良好に許容され得る結合ポケットの外側の部位は、細胞外ドメインのアミノ末端およびカルボキシ末端（上述のように）、および42～46位および65～73位を含む。65位におけるアスパラギンからアラニンへの変更（N65A）は、A64バックグラウンドにおけるリガンドの結合を実際に改善し、したがって、R64バックグラウンドにおいてリガンドの結合に対する好ましくない影響を有しないと予想される。この変化により、A64バックグラウンドにおけるN65のグリコシル化が排除される可能性があり、したがって、この領域における著しい変化が許容される可能性があることが実証されている。R64A変化は許容性が乏しいが、R64Kは良好に許容され、したがって、Hなどの別の塩基性残基が64位において許容され得る。

## 【0070】

A c t R I I Bは、完全に保存された細胞外ドメインの大きなストレッチ（stretch）を持ち、ほぼ全ての脊椎動物にわたって良好に保存されている。A c t R I I Bに結合するリガンドの多くも高度に保存されている。したがって、種々の脊椎動物の生物体からのA c t R I I B配列を比較することにより、変更され得る残基への洞察がもたらされる。したがって、活性な、GDFトラップとして有用なヒトA c t R I I B改変体ポリペプチドは、別の脊椎動物のA c t R I I Bの配列からの対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸を含み得、または、ヒトまたは他の脊椎動物の配列中の残基と同様の残基を含み得る。以下の例は、活性なA c t R I I B改変体を定義するためのこのアプローチを例示している。L46は、ツメガエルのA c t R I I Bではバリンであるので、この位置は変更され得、任意選択で、V、IまたはFなどの別の疎水性残基、またはAなどの非極性残基に変更され得る。E52は、ツメガエルではKであり、これは、この部位で、E、D、K、R、H、S、T、P、G、YおよびおそらくAなどの極性残基を含めた多種多様な変化が許容され得ることを示している。T93は、ツメガエルではKであり、これは、この位置において幅広い構造的差異が許容されることを示しており、S、K、R、E、D、H、G、P、GおよびYなどの極性残基が好ましい。F108は、ツメガエルではYであり、したがって、Yまたは他の疎水性群、例えばI、VまたはLが許容されるはずである。E111は、ツメガエルではKであり、これは、この位置において、D、R、KおよびH、ならびにQおよびNを含めた、荷電残基が許容されることを示している。R112は、ツメガエルではKであり、これは、この位置において、RおよびHを含めた塩基性残基が許容されることを示している。119位のAは比較的不完全に保存されており、げっ歯類ではPとして、ツメガエルではVとして現れ、したがって、この位置では本質的にいかなるアミノ酸も許容されるはずである。

10

20

30

40

50

## 【0071】

本開示は、さらなるN-連結グリコシル化部位(N-X-S/T)を加えることにより、ActRIIB-Fc融合タンパク質の血清半減期がActRIIB(R64)-Fc形態と比較して増加することを実証する。24位にアスパラギンを導入することにより(A24N構築物)、より長い半減期を与えるNXT配列が作製される。他のNX(T/S)配列は、42~44(NQS)および65~67(NSS)において見出されるが、後者は64位のRで効率的にグリコシル化されないことがあり得る。N-X-S/T配列は、一般に、図1において定義されるリガンド結合ポケットの外側の位置に導入され得る。非内因性N-X-S/T配列の導入に特に適した部位としては、アミノ酸20~29、20~24、22~25、109~134、120~134または129~134が挙げられる。N-X-S/T配列は、ActRIIB配列とFcまたは他の融合成分との間のリンカーにも導入され得る。このような部位は、以前から存在しているSまたはTに対して正しい位置にNを導入することによって、または、以前から存在しているNに対応する位置にSまたはTを導入することによって、最小の労力で導入され得る。したがって、N-連結グリコシル化部位を生じる望ましい変更は、A24N、R64N、S67N(できるかぎりN65Aの変更と組み合わせる)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112SおよびR112Tである。グリコシル化されることが予測されるSはどれも、グリコシル化によってもたらされる保護のために、免疫原性部位を生じることなくTに変更され得る。同様に、グリコシル化されることが予測されるTはどれも、Sに変更され得る。したがって、S67TおよびS44Tの変更が企図される。同様に、A24N改変体では、S26Tの変更が使用され得る。したがって、GDFトラップは、1つまたは複数の、追加の非内因性N-連結グリコシル化コンセンサス配列を有するActRIIB改変体であり得る。

## 【0072】

ActRIIBのL79位は、変更されたアクチビン-ミオスタチン(GDF-11)結合特性を与えるために変更され得る。L79AまたはL79Pにより、GDF-11の結合が、アクチビンの結合よりも大きな程度で減少する。L79EまたはL79DはGDF-11の結合を保持する。著しいことに、L79EおよびL79D改変体は、アクチビンの結合が大幅に減少した。インビボでの実験は、これらの非アクチビン受容体が赤血球を増加させる著しい能力を保持し、他の組織に対する作用の減少を示すことを示す。これらのデータは、アクチビンに対する作用が減少したポリペプチドを得ることについての望みさおよび実行可能性を実証する。例示的な実施形態では、本明細書中に記載される方法は、配列番号1または39の79位に対応する位置に酸性アミノ酸(例えば、DまたはE)を、任意選択で1つまたは複数の追加のアミノ酸置換、付加、または欠失と組み合わせて含む改変体ActRIIBポリペプチドであるGDFトラップポリペプチドを利用する。

## 【0073】

記載される差異は、種々の方法に組み合わせられ得る。さらに、本明細書中に記載される変異誘発プログラムの結果は、保存が多くの場合有益であるアミノ酸位がActRIIBにあることを示す。これらとしては、64位(塩基性アミノ酸)、80位(酸性または疎水性アミノ酸)、78位(疎水性、そして特にトリプトファン)、37位(酸性、そして特にアスパラギン酸またはグルタミン酸)、56位(塩基性アミノ酸)、60位(疎水性アミノ酸、特にフェニルアラニンまたはチロシン)が挙げられる。したがって、本明細書中に開示される改変体それぞれにおいて、本開示は保存され得るアミノ酸のフレームワークを提供する。保存が望ましいと考えられる他の位置は以下の通りである: 52位(酸性アミノ酸)、55位(塩基性アミノ酸)、81位(酸性)、98位(極性または荷電、特にE、D、RまたはK)。

## 【0074】

特定の実施形態では、ActRIIBポリペプチドの単離されたフラグメントは、ActRIIBポリペプチドをコードする核酸(例えば、配列番号4および5)の対応するフ

10

20

30

40

50

ラグメントから組換えにより生成されるポリペプチドをスクリーニングすることによって得られ得る。さらに、フラグメントは、従来のメリフィールド固相  $f-Moc$  もしくは  $t-Boc$  化学のような当該分野で公知の技術を用いて化学的に合成され得る。フラグメントは、（組換えにより、または、化学合成により）生成され得、そして、例えば、 $ActRIIB$  タンパク質または  $ActRIIB$  リガンドのアンタゴニスト（インヒビター）またはアゴニスト（アクチベーター）として機能し得るペプチジルフラグメントを同定するために試験され得る。

#### 【0075】

特定の実施形態では、 $GDF$  トラップポリペプチドは、配列番号 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 または 41 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 75% 同一なアミノ酸配列を有する改変体  $ActRIIB$  ポリペプチドである。特定の場合では、 $GDF$  トラップは、配列番号 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 または 41 から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一なアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、 $GDF$  トラップは、配列番号 2、3、7、11、26、28、29、32、37、38、40 または 41 から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一なアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、配列番号 1 の L79 に対応する位置は酸性アミノ酸（例えば、D または E アミノ酸残基）である。

#### 【0076】

特定の実施形態では、本発明は、治療効率または安定性（例えば、エクスピロ貯蔵寿命およびインビボでのタンパク質分解に対する抵抗性）の増強のような目的のために、 $GDF$  トラップポリペプチドの構造を修飾することによって機能的改変体を作製することを企図する。 $GDF$  トラップポリペプチドはまた、アミノ酸の置換、欠失または付加によって生成され得る。例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンでの単発的な置換、アスパラギン酸のグルタミン酸での単発的な置換、スレオニンのセリンでの単発的な置換、または、あるアミノ酸の、構造的に関連したアミノ酸での同様の置換（例えば、保存的変異）は、結果として生じる分子の生物学的活性に対して大きな影響を及ぼさないと予想するのは理にかなっている。保存的置換は、その側鎖が関連しているアミノ酸のファミリー内で行われる置換である。 $GDF$  トラップポリペプチドのアミノ酸配列の変化によって機能的改変体がもたらされているかどうかは、 $GDF$  トラップポリペプチドの、修飾されていない  $GDF$  トラップポリペプチドまたは野生型  $ActRIIB$  ポリペプチドと比較した、細胞における反応を生じる能力、または、修飾されていない  $GDF$  トラップポリペプチドまたは野生型  $ActRIIB$  ポリペプチドと比較した、1 つまたは複数のリガンド、例えば、アクチビン、 $GDF-11$  またはミオスタチンなどに結合する能力を評価することにより容易に決定され得る。

#### 【0077】

いくつかの特定の実施形態では、本発明は、 $ActRIIB$  ポリペプチドが変更されたリガンド結合活性（例えば、結合親和性または結合特異性）を有するように、 $ActRIIB$  ポリペプチドの細胞外ドメイン（リガンド結合ドメインとも称される）において変異を作製することを企図する。特定の場合では、このような  $GDF$  トラップポリペプチドは、特異的なリガンドに対して、変更された（上昇または減少した）結合親和性を有する。他の場合では、 $GDF$  トラップポリペプチドは、 $ActRIIB$  リガンドに対して、変更された結合特異性を有する。

#### 【0078】

例えば、本開示は、アクチビンと比較して  $GDF8/GDF11$  に優先的に結合する  $GDF$  トラップポリペプチドを提供する。このような選択的な改変体は、治療効果のために赤血球細胞レベルの非常に大きな増加が必要となり得、およびある程度の外的作用が許容され得る、重篤な疾患の処置のためにはあまり望ましくない可能性があるが、本開示は、さらに、外的作用を減少させることについてのこのようなペプチドの望ましさを

10

20

30

40

50

確立する。例えば、A c t R I I Bタンパク質のアミノ酸残基、例えばE 3 9、K 5 5、Y 6 0、K 7 4、W 7 8、D 8 0、およびF 1 0 1はリガンド結合ポケット内にあり、そのリガンド、例えばアクチビンおよびG D F 8などへの結合を媒介する。したがって、本発明は、これらのアミノ酸残基に1つまたは複数の変異を含む、A c t R I I B受容体の変更されたリガンド結合ドメイン（例えば、G D F 8結合ドメイン）を含むG D Fトラップを提供する。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、A c t R I I B受容体の野生型のリガンド結合ドメインと比較して、G D F 8などのリガンドに対する選択性が増加されていることがあり得る。例示のように、これらの変異は、アクチビンを越える、G D F 8への変更されたリガンド結合ドメインの選択性を増加させる。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、G D F 8の結合についての $K_d$ に対するアクチビンの結合についての $K_d$ の比を有し、それは、野生型のリガンド結合ドメインに対する比と比較して少なくとも2倍、5倍、10倍、または100倍までも大きい。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、G D F 8の阻害についての $IC_{50}$ に対するアクチビンの阻害についての $IC_{50}$ の比を有し、それは、野生型のリガンド結合ドメインと比較して少なくとも2倍、5倍、10倍、または100倍までも大きい。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、アクチビンの阻害についての $IC_{50}$ の、少なくとも2分の1、5分の1、10分の1、または100分の1までも小さい $IC_{50}$ でG D F 8を阻害する。

#### 【0079】

特定の例として、A c t I I Bのリガンド結合ドメインの正荷電アミノ酸残基A s p (D 8 0)は、アクチビンではなくG D F 8に優先的に結合するG D Fトラップポリペプチドを生成するために異なるアミノ酸残基に変異され得る。D 8 0残基は、非荷電アミノ酸残基、負荷電アミノ酸残基、および疎水性アミノ酸残基からなる群より選択されるアミノ酸残基に変えられることが好ましい。さらなる特定の例として、疎水性残基、L 7 9は、G D F 1 1の結合を保持する一方でアクチビンの結合を大きく低下させるために、酸性アミノ酸のアスパラギン酸またはグルタミン酸に変更され得る。当業者に認識されるように、記載された変異、改変体または修飾の大半は、核酸レベルで、または、いくつかの場合、翻訳後修飾または化学合成によって作製され得る。このような技法は当該分野で周知である。

#### 【0080】

特定の実施形態では、本発明は、A c t R I I Bポリペプチドのグリコシル化を変更するために、A c t R I I Bに特異的な変異を有するG D Fトラップポリペプチドを企図する。G D Fトラップポリペプチドのグリコシル化部位の例は、図1に例示される（例えば、下線を付したN X (S / T)部位）。このような変異は、1または複数のグリコシル化部位（例えば、O-連結もしくはN-連結のグリコシル化部位）を導入もしくは排除するように選択され得る。アスパラギン連結グリコシル化認識部位は、一般に、トリペプチド配列、アスパラギン-X-スレオニン（ここで、「X」は任意のアミノ酸である）を含み、この配列は、適切な細胞のグリコシル化酵素によって特異的に認識される。変化はまた、（O-連結グリコシル化部位については）野生型A c t R I I Bポリペプチドの配列への、1または複数のセリンもしくはスレオニン残基の付加、または、1または複数のセリンもしくはスレオニン残基による置換によってなされ得る。グリコシル化認識部位の第1位もしくは第3位のアミノ酸の一方もしくは両方における種々のアミノ酸置換もしくは欠失（および／または、第2位におけるアミノ酸の欠失）は、修飾されたトリペプチド配列において非グリコシル化をもたらす。G D Fトラップポリペプチドにおける糖質部分の数を増加させる別の手段は、G D Fトラップポリペプチドへのグリコシドの化学的もしくは酵素的なカップリングによるものである。使用されるカップリング様式に依存して、糖は、（a）アルギニンおよびヒスチジン；（b）遊離カルボキシ基；（c）遊離スルフィド基（例えば、システインのもの）；（d）遊離ヒドロキシ基（例えば、セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンのもの）；（e）芳香族残基（例えば、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンのもの）；または（f）グルタミンのアミド基に

10

20

30

40

50

付加され得る。これらの方法は、本明細書中に参考として援用されるWO 87/05330ならびにAplinおよびWriston (1981年) CRC Crit. Rev. Biochem.、259~306頁に記載されている。GDFトラップポリペプチド上に存在する1または複数の糖質部分の除去は、化学的および／または酵素的に達成され得る。化学的な脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または等価な化合物へのGDFトラップポリペプチドの曝露を含み得る。この処理は、アミノ酸配列をインタクトなままにしつつ、連結糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんどもしくは全ての糖の切断を生じる。化学的な脱グリコシル化は、さらに、Hakimuddinら (1987年) Arch. Biochem. Biophys. 259巻：52頁、およびEdgeら (1981年) Anal. Biochem. 118巻：131頁によって記載されている。GDFトラップポリペプチド上の糖質部分の酵素的切断は、Thotakuraら (1987年) Meth. Enzymol. 138巻：350頁に記載されるように、種々のエンドグリコシダーゼもしくはエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。GDFトラップポリペプチドの配列は、適切なように、使用される発現系のタイプに応じて調節され得る。というのも、哺乳動物、酵母、昆虫および植物の細胞は全て、ペプチドのアミノ酸配列によって影響され得る異なるグリコシル化パターンを導入し得る。一般に、ヒトにおいて使用するためのGDFトラップポリペプチドは、適切なグリコシル化を提供する哺乳動物細胞株（例えば、HEK293細胞株またはCHO細胞株）において発現されるが、他の哺乳動物発現細胞株も同様に有用であることと期待される。

#### 【0081】

本開示はさらに、改変体、特に、任意選択で切断型改変体を含むGDFトラップポリペプチドの組み合わせ改変体のセットを作製する方法を企図する；組み合わせ変異体のプールは、GDFトラップの配列を同定するために特に有用である。このような組み合わせライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、変更された特性（例えば、変更された薬物動態または変更されたリガンド結合）を有するGDFトラップポリペプチド改変体を作製するため、であり得る。種々のスクリーニングアッセイが以下に提供され、そして、このようなアッセイは、改変体を評価するために使用され得る。例えば、GDFトラップポリペプチド改変体は、ActRIIBポリペプチドに結合する能力、ActRIIBリガンドのActRIIBポリペプチドへの結合を妨害する能力、または、ActRIIBリガンドにより引き起こされるシグナル伝達に干渉する能力についてスクリーニングされ得る。

#### 【0082】

GDFトラップポリペプチドまたはその改変体の活性はまた、細胞ベースのアッセイまたはインビボアッセイにおいて試験され得る。例えば、造血に關与する遺伝子の発現に対するGDFトラップポリペプチド改変体の作用が評価され得る。これは、必要な場合、1または複数の組換えActRIIBリガンドタンパク質（例えば、アクチビン）の存在下で行われ得、そして、GDFトラップポリペプチドおよび／またはその改変体、そして任意選択でActRIIBリガンドを生成するように細胞がトランスフェクトされ得る。同様に、GDFトラップポリペプチドは、マウスもしくは他の動物に投与され得、そして、1または複数の血液測定値（例えば、RBC数、ヘモグロビンのレベル、ヘマトクリットレベル、貯蔵鉄、または網状赤血球数）が、当該分野で認識された方法を用いて評価され得る。

#### 【0083】

参照GDFトラップポリペプチドに対して、選択的効力を有する、組み合わせで得られる（combinatorially-derived）改変体を作製され得る。このような改変体タンパク質は、組換えDNA構築物から発現されたとき、遺伝子治療のプロトコルにおいて使用され得る。同様に、変異誘発は、対応する修飾されていないGDFトラップポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する改変体を生じ得る。例えば、変更されたタンパク質は、タンパク質分解、または、修飾されていないGDFトラップポリ

ペプチドの崩壊もしくは他の方法で不活性化をもたらす他のプロセスに対してより安定性であるかもしくは安定性が低いかのいずれかにされ得る。このような改変体およびこれをコードする遺伝子は、G D Fトラップポリペプチドの半減期を調節することによってG D Fトラップポリペプチドレベルを変更するために利用され得る。例えば、短い半減期は、より一過性の生物学的作用を生じ得、そして、誘導性の発現系の一部である場合、細胞内での組換えG D Fトラップポリペプチドレベルのより厳しい制御を可能にし得る。F c融合タンパク質では、変異は、タンパク質の半減期を変更するために、リンカー（存在する場合）および／またはF c部分において作製され得る。

#### 【0084】

特定の実施形態では、本発明のG D Fトラップポリペプチドは、さらに、A c t R I I Bポリペプチド中に天然に存在する任意のものに加えて、翻訳後修飾を含み得る。このような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が挙げられるがこれらに限定されない。結果として、G D Fトラップポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、多糖類もしくは単糖類およびホスフェイトのような非アミノ酸成分を含み得る。このような非アミノ酸成分の、G D Fトラップポリペプチドの機能に対する影響は、他のG D Fトラップポリペプチド改変体について本明細書中に記載されるようにして試験され得る。G D Fトラップポリペプチドの新生形態を切断することによってG D Fトラップポリペプチドが細胞内で生成される場合、翻訳後プロセッシングもまた、このタンパク質の正確な折り畳みおよび／または機能にとって重要となり得る。様々な細胞（例えば、C H O、H e L a、M D C K、293、W I 38、N I H-3 T3またはH E K 293）が、このような翻訳後の活性のための特定の細胞機構および特徴的なメカニズムを有し、そして、G D Fトラップポリペプチドの正確な修飾およびプロセッシングを保証するように選択され得る。

#### 【0085】

特定の態様では、G D Fトラップポリペプチドは、少なくともA c t R I I Bポリペプチドの一部分と1または複数の融合ドメインとを有する融合タンパク質を含む。このような融合ドメインの周知の例としては、ポリヒスチジン、G l u-G l u、グルタチオンSトランスフェラーゼ（G S T）、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域（例えば、F c）、マルトース結合タンパク質（M B P）、またはヒト血清アルブミンが挙げられるがこれらに限定されない。融合ドメインは、所望される特性を与えるように選択され得る。例えば、いくつかの融合ドメインが、アフィニティクロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。アフィニティ精製の目的では、グルタチオン-、アミラーゼ-、およびニッケル-もしくはコバルト-結合化樹脂のような、アフィニティクロマトグラフィーのための適切なマトリクスが使用される。このようなマトリクスの多くは、P h a r m a c i a G S T精製システムおよび（H I S 6）融合パートナーと共に有用なQ I A e x p r e s s<sup>TM</sup>システム（Q i a g e n）のような「キット」の形態で利用可能である。別の例としては、融合ドメインは、G D Fトラップポリペプチドの検出を容易にするように選択され得る。このような検出ドメインの例としては、種々の蛍光タンパク質（例えば、G F P）、ならびに、「エピトープタグ」（これは、特定の抗体に利用可能な、通常は短いペプチド配列である）が挙げられる。特定のモノクローナル抗体に容易に利用可能な周知のエピトープタグとしては、F L A G、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（H A）およびc-mycタグが挙げられる。いくつかの場合、融合ドメインは、関連のプロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによって、そこから組換えタンパク質を解放することを可能にする、第X a因子またはトロンビンのようなプロテアーゼ切断部位を有する。解放されたタンパク質は、次いで、その後のクロマトグラフィーによる分離によって、融合ドメインから単離され得る。特定の好ましい実施形態では、G D Fトラップポリペプチドは、インビボでG D Fトラップポリペプチドを安定化させるドメイン（「安定化」ドメイン）と融合される。「安定化」とは、それが、崩壊の減少によるものであるか、腎臓によるクリアランスの減少によるものであるか、他の薬物動態作用によるものであるかとは無関係に、血清半減期を増加させ

10

20

30

40

50

る任意のものを意味する。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範囲のタンパク質に対して所望の薬物動態特性を与えることが公知である。同様に、ヒト血清アルブミンへの融合は、所望の特性を与え得る。選択され得る融合ドメインの他のタイプとしては、多量体化（例えば、二量体化、四量体化）ドメインおよび機能的ドメイン（例えば、赤血球レベルのさらなる増加のような付加的な生物学的機能を与えるもの）が挙げられる。

【0086】

具体例として、本発明は、Fcドメインに融合されたActRIIBポリペプチドの細胞外（例えば、リガンド結合）ドメインを含むActRIIB-Fc融合タンパク質であるGDFトラップを提供する。例示的なFcドメインの配列は、以下に示される（配列番号6）。

【0087】

【化11】

```
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGD
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*
```

【0088】

任意選択で、Fcドメインは、Asp-265、リジン322およびAsn-434のような残基における1または複数の変異を有する。特定の場合、これらの変異のうち1または複数（例えば、Asp-265変異）を持つ変異型Fcドメインは、野生型Fcドメインに対する、Fcγ受容体への結合能の低下を有する。他の場合では、これらの変異のうち1または複数（例えば、Asn-434変異）を持つ変異型Fcドメインは、野生型Fcドメインに対する、MHCクラスI関連のFc受容体（FcRN）への結合能の増加を有する。

【0089】

融合タンパク質の様々な成分は、所望の機能と両立するあらゆる様式で配列され得ることが理解される。例えば、GDFトラップポリペプチドは、異種ドメインに対してC末端側に配置されても、あるいは、異種ドメインが、GDFトラップポリペプチドに対してC末端側に配置されてもよい。GDFトラップポリペプチドドメインと異種ドメインとは、融合タンパク質において隣接している必要はなく、そして、さらなるドメインもしくはアミノ酸配列が、いずれかのドメインに対してC末端もしくはN末端側に、または、これらのドメイン間に含まれてもよい。

【0090】

特定の実施形態では、GDFトラップ融合タンパク質は、式A-B-Cで示されるアミノ酸配列を含む。B部分は、配列番号26のアミノ酸26～132に対応するアミノ酸配列からなるN-およびC-末端が切断されたActRIIBポリペプチドである。AおよびC部分は、独立に、0、1またはそれ以上のアミノ酸であり得、AおよびC部分はどちらも、存在する場合はBと異種である。Aおよび／またはC部分は、リンカー配列を介してB部分に付加され得る。例示的なリンカーとしては、2～10、2～5、2～4、2～3グリシン残基などの短いポリペプチドリリンカー、例えば、Gly-Gly-Glyリンカーなどが挙げられる。他の適切なリンカーは、本明細書中に上記される。特定の実施形態では、GDFトラップ融合タンパク質は、式A-B-Cで示されるアミノ酸配列を含み、式中、Aはリーダー配列であり、Bは配列番号26のアミノ酸26～132からなり、Cはインビボ安定性、インビボ半減期、取込み／投与、組織局在化もしくは分布、タンパク質複合体の形成、および／または精製のうちの1つまたは複数を増強するポリペプチド部分である。特定の実施形態では、GDFトラップ融合タンパク質は、式A-B-Cで示されるアミノ酸配列を含み、式中、AはTPAリーダー配列であり、Bは配列番号26の

10

20

30

40

50

アミノ酸 26～132 からなり、C は免疫グロブリン Fc ドメインである。好ましい GDF トラップ融合タンパク質は、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含む。

【0091】

特定の実施形態では、本発明の GDF トラップポリペプチドは、GDF トラップポリペプチドを安定化させ得る 1 または複数の修飾を含む。例えば、このような修飾は、GDF トラップポリペプチドのインビトロ半減期を増強させるか、GDF トラップポリペプチドの循環半減期を増強させるか、または、GDF トラップポリペプチドのタンパク質分解を減少させる。このような安定化修飾としては、融合タンパク質（例えば、GDF トラップポリペプチドと安定化ドメインとを含む融合タンパク質が挙げられる）、グリコシル化部位の修飾（例えば、GDF トラップポリペプチドへのグリコシル化部位の付加が挙げられる）、および糖質部分の修飾（例えば、GDF トラップポリペプチドからの糖質部分の除去が挙げられる）が挙げられるがこれらに限定されない。融合タンパク質の場合、GDF トラップポリペプチドは、IgG 分子（例えば、Fc ドメイン）などの安定化ドメインに融合される。本明細書中で使用される場合、用語「安定化ドメイン」は、融合タンパク質の場合のように融合ドメイン（例えば、Fc）を指すだけでなく、糖質部分のような非タンパク質性修飾、または、ポリエチレングリコールのような非タンパク質性ポリマーも含む。

10

【0092】

特定の実施形態では、本発明は、GDF トラップポリペプチドの単離および／または精製された形態（他のタンパク質から単離されたか、そうでなければ、他のタンパク質を実質的に含まないもの）を利用可能にする。

20

【0093】

特定の実施形態では、本発明の GDF トラップポリペプチド（修飾されていないか、または修飾された）は、種々の当該分野で公知の技法によって生成され得る。例えば、このような GDF トラップポリペプチドは、Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993 年) および Grant G. A. (編), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992 年) に記載されているものなどの、標準のタンパク質化学の技法を使用して合成され得る。さらに、自動ペプチド合成装置が市販されている（例えば、Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600）。あるいは、GDF トラップポリペプチド、そのフラグメントまたは改変体は、当該分野で周知のように、種々の発現系（例えば、E. coli、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS 細胞、バキュロウイルス）を使用して組換えにより生成され得る。さらなる実施形態では、修飾されたか、または修飾されていない GDF トラップポリペプチドは、例えば、プロテアーゼ、例えばトリプシン、サーモリシン、キモトリプシン、ペプシン、または対の塩基性アミノ酸変換酵素（PACE）を使用して、組換えにより生成された完全長 GDF トラップポリペプチドを消化することによって生成され得る。コンピュータ解析（市販のソフトウェア、例えば、MacVector、Omega、PCGene、Molecular Simulation, Inc. を使用する）は、タンパク質分解の切断部位を同定するために使用され得る。あるいは、このような GDF トラップポリペプチドは、化学的切断によって（例えば、臭化シアン、ヒドロキシアミン）などの当該分野で公知の標準技法などで組換えにより生成された完全長 GDF トラップポリペプチドから生成され得る。

30

40

【0094】

（3. GDF トラップポリペプチドをコードする核酸）

特定の態様では、本発明は、本明細書中に開示される GDF トラップポリペプチドのいずれかをコードする単離されたおよび／または組換えの核酸を提供する。配列番号 4 は、天然に存在する ActRIIB 前駆体ポリペプチドをコードし、一方配列番号 5 は、可溶性 ActRIIB ポリペプチドをコードし、配列番号 25、27、30 および 31 は可溶

50

性GDFトラップをコードする。本主題の核酸は、一本鎖もしくは二本鎖であり得る。このような核酸は、DNA分子もしくはRNA分子であり得る。これらの核酸は、例えば、GDFトラップポリペプチドを作製するための方法において、または（例えば、遺伝子治療アプローチにおいて）直接的な治療剤として使用され得る。

#### 【0095】

特定の態様では、GDFトラップポリペプチドをコードする本主題の核酸はさらに、配列番号5、25、27、30および31の改変体である核酸を含むものと理解される。改変体ヌクレオチド配列は、対立遺伝子改変体のような、1または複数のヌクレオチドの置換、付加もしくは欠失によって異なる配列を含み、したがって、配列番号5、25、27、30および31に指定されるコード配列のヌクレオチド配列とは異なるコード配列を含む。

10

#### 【0096】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号5、25、27、30または31に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一な単離されたかまたは組換えの核酸配列を提供する。当業者は、配列番号5、25、27、30または31に対して相補的な核酸配列、および配列番号5、25、27、30または31の改変体もまた、本発明の範囲内であることを理解する。さらなる実施形態では、本発明の核酸配列は、異種ヌクレオチド配列と共に、または、DNAライブラリーにおいて、単離、組換えおよび／または融合され得る。

#### 【0097】

20

他の実施形態では、本発明の核酸はまた、配列番号5、25、27、30または31に指定されるヌクレオチド配列に対して高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、配列番号5、25、27、30または31の相補配列、あるいは、これらのフラグメントを含む。上述のように、当業者は、DNAのハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件が変更され得ることを容易に理解する。例えば、約45℃における6.0×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）でのハイブリダイゼーションの後に、50℃における2.0×SSCの洗浄を行い得る。例えば、洗浄工程における塩濃度は、50℃における約2.0×SSCの低ストリンジェンシーから、50℃における約0.2×SSCの高ストリンジェンシーまで選択され得る。さらに、洗浄工程における温度は、室温（約22℃）の低ストリンジェンシー条件から、約65℃の高ストリンジェンシー条件まで上昇され得る。温度と塩の両方が変更されても、温度または塩濃度が一定に保たれ、他の変数が変更されてもよい。一実施形態では、本発明は、室温における6×SSCとその後の室温で2×SSCでの洗浄の低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。

30

#### 【0098】

遺伝子コードにおける縮重に起因して配列番号5、25、27、30または31に示される核酸と異なる単離された核酸もまた、本発明の範囲内である。例えば、多数のアミノ酸が1を超えるトリプレットによって示される。同じアミノ酸を特定するコドンまたは同義語（例えば、CAUおよびCACはヒスチジンに対する同義語である）は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント」変異を生じ得る。特定の実施形態では、GDFトラップポリペプチドは、代替のヌクレオチド配列によってコードされる。代替のヌクレオチド配列は、ネイティブなGDFトラップ核酸配列に対して変性しているが、なお同じ融合タンパク質をコードする。特定の実施形態では、配列番号26を有するGDFトラップは、配列番号30を含む代替の核酸配列によってコードされる。しかしながら、哺乳動物細胞の中には、本主題のタンパク質のアミノ酸配列に変化をもたらすDNA配列の多型が存在することが予想される。当業者は、天然の対立遺伝子改変に起因して、所与の種の個体間に、特定のタンパク質をコードする核酸の1または複数のヌクレオチド（約3～5%までのヌクレオチド）におけるこれらの改変が存在し得ることを理解する。任意およびあらゆるこのようなヌクレオチドの改変と、結果として生じるアミノ酸の多型とは、本発明の範囲内である。

40

50

## 【0099】

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

## 【0100】

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

## 【0101】

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

## 【0102】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌中でのベクターの増殖を促進するための原核生物の配列と、真核生物細胞において発現される1または複数の真核生物の転写単位との両方を含む。p c D N A I / a m p、p c D N A I / n e o、p R c / C M V、p S V 2 g p t、p S V 2 n e o、p S V 2 - d h f r、p T k 2、p R S V n e o、p M S G、p S V T 7、p k o - n e oおよびp H y g由来のベクターは、真核生物細胞のトランスフェクションに適切な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターのいくつかは、原核生物細胞および真核生物細胞の両方における複製および薬物耐性選択を容易にするために、細菌プラスミド（例えば、p B R 3 2 2）からの配列を用いて修飾される。あるいは、ウシパピローマウイルス（B P V - 1）またはエプスタインバーウイルス（p H E B o、p R E P由来およびp 2 0 5）のようなウイルスの誘導体が、真核生物細胞におけるタンパク質の一過的な発現のために使用され得る。他のウイルス（レトロウイルスを含む）発現系の例は、遺伝子治療送達系の説明において以下に見出され得る。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換において用いられる種々の方法は、当該分野で周知である。原核生物細胞および真核生物細胞の両方についての他の適切な発現系、ならびに、一般的な組換え手順については、M o l e c u l a r C l o n i n g A L a b o r a t o r y M a n u a l、2 n d E d.、S a m b r o o k、F r i t s c hおよびM a n i a t i s編（C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、1 9 8 9年）第16および17章を参照のこと。いくつかの場合において、バキュロウイルス発現系を用いて組換えポリペプチドを発現させることが望ましくあり得る。このようなバキュロウイルス発現系の例としては、p V L由来のベクター（例えば、p V L 1 3 9 2、p V L 1 3 9 3およびp V L 9 4 1）、p A c U W由来のベクター（例えば、p A c U W l）およびp B l u e B a c由来のベクター（例えば、 $\beta$ -g a lを含むp B l u e B a c I I I）が挙げられる。

10

20

## 【0103】

好ましい実施形態では、ベクターは、C H O細胞における本主題のG D Fトラップポリペプチドの生成のために設計される（例えば、P c m v - S c r i p tベクター（S t r a t a g e n e、L a J o l l a、C a l i f.）、p c D N A 4ベクター（I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C a l i f.）およびp C I - n e oベクター（P r o m e g a、M a d i s o n、W i s c））。明らかであるように、本主題の遺伝子構築物は、例えば、タンパク質（融合タンパク質または改変体タンパク質を含む）を生成するため、精製のために、培養物において増殖させた細胞において本主題のG D Fトラップポリペプチドの発現を引き起こすために使用され得る。

30

## 【0104】

本発明はまた、1または複数の本主題のG D Fトラップポリペプチドのコード配列（例えば、配列番号4、5、25、27、30または31）を含む組換え遺伝子をトランスフェクトされた宿主細胞に関する。宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、本発明のG D Fトラップポリペプチドは、E . c o l iのような細菌細胞、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現系を用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

40

## 【0105】

したがって、本発明はさらに、本主題のG D Fトラップポリペプチドを生成する方法に関する。例えば、G D Fトラップポリペプチドをコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞は、G D Fトラップポリペプチドの発現を起こすことが可能な適切な条件下で培養され得る。G D Fトラップポリペプチドは、G D Fトラップポリペプチドを含む細胞および培地の混合物から分泌および単離され得る。あるいは、G D Fトラップポリペプチドは、細胞質または膜画分に保持され得、そして、細胞が回収、溶解され、そして、タンパク質が単離される。細胞培養物は、宿主細胞、培地および他の副産物を含む。細胞培養に適切な培地は、当該分野で周知である。本主題のG D Fトラップポリペプチドは、タンパク質の精製についての当該分野で公知の技術（イオン交換クロマトグラフィー

50

、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、およびGDFトラップポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体を用いた免疫親和性精製を含む)を用いて、細胞培養培地、宿主細胞またはこの両方から単離され得る。好ましい実施形態では、GDFトラップポリペプチドは、その精製を促進するドメインを含む融合タンパク質である。

【0106】

別の実施形態では、精製用リーダー配列(例えば、組換えGDFトラップポリペプチドの所望の部分のN末端に位置するポリ(His)/エンテロキナーゼ切断部位の配列)をコードする融合遺伝子は、 $\text{Ni}^{2+}$ 金属樹脂を用いる親和性クロマトグラフィーによる、発現された融合タンパク質の精製を可能にし得る。その後、精製用リーダー配列は、引き続き、エンテロキナーゼでの処理によって除去され、精製GDFトラップポリペプチドを提供し得る(例えば、Hochuliら、(1987年)J. Chromatography 411巻:177頁;およびJanknechtら、PNAS USA 88巻:8972頁を参照のこと)。

10

【0107】

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

20

【0108】

(4.スクリーニングアッセイ)

特定の態様では、本発明は、ActRIIBポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである化合物(因子)を同定するための、本主題のGDFトラップポリペプチド(例えば、可溶性の改変体ActRIIBポリペプチド)の使用に関する。このスクリーニングによって同定された化合物は、インビボまたはインビトロでの、赤血球、ヘモグロビンおよび/または網状赤血球のレベルを調節する能力を評価するために試験され得る。これらの化合物は、例えば、動物モデルにおいて試験され得る。

30

【0109】

ActRIIBのシグナル伝達を標的化することによって、赤血球またはヘモグロビンのレベルを増加させるための治療剤についてスクリーニングするための多数のアプローチが存在する。特定の実施形態では、選択された細胞株においてActRIIB媒介性の作用を混乱させる因子を同定するために、化合物のハイスループットスクリーニングが行われ得る。特定の実施形態では、アッセイは、ActRIIBポリペプチドの、その結合パートナー、例えばActRIIBリガンドなど(例えば、アクチビン、Nodal、GDF8、GDF11またはBMP7)への結合を特異的に阻害または減少させる化合物をスクリーニングおよび同定するために行われ得る。あるいは、アッセイは、ActRIIBポリペプチドの、その結合パートナー、例えばActRIIBリガンドなどへの結合を増強する化合物を同定するために使用され得る。さらなる実施形態では、化合物は、ActRIIBポリペプチドと相互作用するその能力によって同定され得る。

40

【0110】

種々のアッセイ形式が十分であり、そして、本開示を考慮すれば、本明細書中に明示的に記載されない形式は、本明細書中に記載されていないにもかかわらず、当業者によって理解される。本明細書中に記載されるように、本発明の試験化合物(因子)は、任意の組

50

み合わせ化学の方法によって作製され得る。あるいは、本主題の化合物は、インビボまたはインビトロで合成された天然に存在する生体分子であり得る。組織増殖の調節因子として作用するその能力について試験される化合物（因子）は、例えば、細菌、酵母、植物または他の生物によって生成されても（例えば、天然の生成物）、化学的に生成されても（例えば、ペプチド模倣物を含む低分子）、組換えにより生成されてもよい。本発明によって企図される試験化合物としては、非ペプチジル有機分子、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、糖、ホルモンおよび核酸分子が挙げられる。特定の実施形態では、試験因子は、約2000ダルトン未満の分子量を持つ小さな有機分子である。

#### 【0111】

本発明の試験化合物は、単一の別個の実体として提供され得るか、または、組み合わせ化学によって作製されたような、より複雑度の高いライブラリーにおいて提供され得る。これらのライブラリーは、例えば、アルコール、ハロゲン化アルキル、アミン、アミド、エステル、アルデヒド、エーテルおよび有機化合物の他の分類を含み得る。試験システムに対する試験化合物の提示は、特に、最初のスクリーニング段階において、単離された形態または化合物の混合物としてのいずれかであり得る。任意選択で、化合物は、任意選択で他の化合物で誘導体化され得、そして、化合物の単離を容易にする誘導体化基を有し得る。誘導体化基の非限定的な例としては、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑色蛍光タンパク質、同位体、ポリヒスチジン、磁気ビーズ、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、光活性化クロスリンカー、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

#### 【0112】

化合物および天然抽出物のライブラリーを試験する多くの薬物スクリーニングプログラムにおいて、所与の期間に調査される化合物の数を最大にするためには、ハイスループットアッセイが望ましい。精製もしくは半精製（semi-purified）されたタンパク質で誘導され得るような、無細胞のシステムにおいて行われるアッセイは、試験化合物によって媒介される分子標的における変更の迅速な発生と比較的容易な検出とを可能にするように作られ得るという点で、しばしば、「一次」スクリーニングとして好ましい。さらに、試験化合物の細胞毒性またはバイオアベイラビリティの作用は、一般に、インビトロのシステムでは無視され得るが、その代わりに、このアッセイは主として、ActRIIBポリペプチドとその結合パートナー（例えば、ActRIIBリガンド）との間の結合親和性の変更において明らかになり得るような、分子標的に対する薬物の作用に焦点を当てている。

#### 【0113】

単なる例示として、本発明の例示的なスクリーニングアッセイでは、関心のある化合物は、アッセイの意図に応じて適宜、通常ActRIIBリガンドに結合し得る単離および精製されたActRIIBポリペプチドと接触させられる。その後、化合物とActRIIBポリペプチドとの混合物は、ActRIIBリガンドを含む組成物に加えられる。ActRIIB／ActRIIBリガンド複合体の検出および定量は、ActRIIBポリペプチドとその結合タンパク質との間の複合体の形成の阻害（または助長）における化合物の効力を決定するための手段を提供する。化合物の効力は、種々の濃度の試験化合物を用いて得られたデータから用量応答曲線を生成することによって評価され得る。さらに、比較のためのベースラインを提供するためのコントロールアッセイもまた行われ得る。例えば、コントロールアッセイでは、単離および精製されたActRIIBリガンドは、ActRIIBポリペプチドを含む組成物に加えられ、そして、ActRIIB／ActRIIBリガンド複合体の形成は、試験化合物の非存在下で定量される。一般に、反応物が混合され得る順序は変化し得、そして、同時に混合され得ることが理解される。さらに、適切な無細胞アッセイ系を与えるように、精製したタンパク質の代わりに、細胞の抽出物および溶解物が使用され得る。

#### 【0114】

ActRIIBポリペプチドとその結合タンパク質との間の複合体の形成は、種々の技

術によって検出され得る。例えば、複合体の形成の調節は、例えば、検出可能に標識されたタンパク質、例えば、放射標識（例えば、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ または $^3\text{H}$ ）、蛍光標識（例えば、FITC）、または、酵素標識されたActRIIBポリペプチドまたはその結合タンパク質を用いて、イムノアッセイによって、あるいは、クロマトグラフィーによる検出によって定量され得る。

#### 【0115】

特定の実施形態では、本発明は、直接的または間接的のいずれかで、ActRIIBポリペプチドとその結合タンパク質との間の相互作用の程度を測定する、蛍光偏光アッセイおよび蛍光共鳴エネルギー遷移（FRET）アッセイの使用を企図する。さらに、光導波管（waveguide）（PCT公開WO96/26432および米国特許第5,677,196号）、表面プラズモン共鳴（SPR）、表面電荷センサ、および表面力センサに基づくもののような、他の検出様式が、本発明の多くの実施形態と適合性がある。

#### 【0116】

さらに、本発明は、ActRIIBポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を妨害または助長する因子を同定するための、「ツーハイブリッドアッセイ」としても公知である相互作用トラップアッセイの使用を企図する。例えば、米国特許第5,283,317号；Zervosら（1993年）Cell 72巻：223～232頁；Maduraら（1993年）J Biol Chem 268巻：12046～12054頁；Bartelら（1993年）Biotechniques 14巻：920～924頁；およびIwabuchiら（1993年）Oncogene 8巻：1693～1696頁を参照のこと。特定の実施形態では、本発明は、ActRIIBポリペプチドとその結合タンパク質との間の相互作用を解離させる化合物（例えば、低分子またはペプチド）を同定するための、逆ツーハイブリッドシステムの使用を企図する。例えば、VidalおよびLegrain（1999年）Nucleic Acids Res 27巻：19～29頁；VidalおよびLegrain（1999年）Trends Biotechnol 17巻：374～81頁；ならびに米国特許第5,525,490号；同第5,955,280号；および同第5,965,368号を参照のこと。

#### 【0117】

特定の実施形態では、本主題の化合物は、ActRIIBポリペプチドと相互作用するその能力によって同定される。化合物と、ActRIIBポリペプチドとの間の相互作用は、共有結合性であっても非共有結合性であってもよい。例えば、このような相互作用は、光架橋、放射性標識リガンド結合、およびアフィニティクロマトグラフィーを含むインビトロの生化学的な方法を用いて、タンパク質レベルで同定され得る（Jakoby WBら、1974年、Methods in Enzymology 46巻：1頁）。特定の場合には、化合物は、ActRIIBポリペプチドに結合する化合物を検出するためのアッセイのような、機構ベースのアッセイにおいてスクリーニングされ得る。これは、固相もしくは流体相の結合事象を含み得る。あるいは、ActRIIBポリペプチドをコードする遺伝子は、レポーターシステム（例えば、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質）と共に細胞中にトランスフェクトされ、そして、好ましくは、ハイスループットスクリーニングによって、ライブラリーに対して、または、ライブラリーの個々のメンバーを用いてスクリーニングされ得る。他の機構ベースの結合アッセイ（例えば、自由エネルギーの変化を検出する結合アッセイ）が使用され得る。結合アッセイは、ウェル、ビーズもしくはチップに固定されているか、または、固定された抗体によって捕捉されている標的を用いて行われ得るか、あるいは、キャピラリー電気泳動によって分離され得る。結合した化合物は通常、比色または蛍光または表面プラズモン共鳴を用いて検出され得る。

#### 【0118】

##### （5．例示的な治療的用途）

特定の実施形態では、本発明のGDFトラップポリペプチドは、げっ歯類および霊長類、特に、ヒト患者のような哺乳動物における赤血球のレベルを増加させるために使用され

10

20

30

40

50

得る。特定の実施形態では、本発明は、治療上有効量の G D F トラップポリペプチドを個体に投与することによって、処置または予防を必要とする個体における貧血を処置または予防する方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物、特に、ヒトの治療的および予防的な処置に使用され得る。

#### 【0119】

本明細書中で使用される場合、障害または状態を「予防する」治療薬は、統計的試料において、無処置の対照試料に対して、処置試料における障害もしくは状態の出現を低下させるか、あるいは、無処置の対照試料に対して、障害もしくは状態の1または複数の症状の発症を遅延させるか、または、重篤度を低下させるような化合物を指す。用語「処置する」は、本明細書中で使用される場合、指定された状態の予防、または、一度確立された状態の改善もしくは除去を含む。いずれの場合にも、予防または処置は、医師または他の医療提供者によって提供される診断、および、治療剤の投与の意図される結果において認識され得る。

#### 【0120】

本明細書中で示されるように、G D F トラップポリペプチドは、健康な個体における赤血球、ヘモグロビンまたは網状赤血球のレベルを増加させるために使用され得、そして、このような G D F トラップポリペプチドは、選択された患者集団において使用され得る。適切な患者集団の例としては、貧血を有する患者のような望ましくない低い赤血球またはヘモグロビンレベルを有する患者、および、大きな外科手術またはかなりの血液喪失を生じ得る他の処置を受ける予定の患者のような、望ましくない低い赤血球またはヘモグロビンレベルを生じる危険性のある患者、が挙げられる。一実施形態では、適切な赤血球レベルを有する患者は、赤血球レベルを増加させるために G D F トラップポリペプチドで処置され、その後、血液が採血され、そして、後に輸血に使用するために保存される。

#### 【0121】

本明細書中に開示される G D F トラップポリペプチドは、貧血を有する患者における赤血球レベルを増加させるために使用され得る。ヒトにおけるヘモグロビンレベルを観察するとき、適切な年齢および性別のカテゴリーにとっての正常値未満のレベルは貧血の指標となり得るが、個体の変動が考慮される。例えば、 $12\text{ g/dl}$  のヘモグロビンレベルは、一般に、一般的な成人集団において正常の下限と考えられる。潜在的な原因としては、血液喪失、栄養不良、薬物療法反応、骨髄に伴う種々の問題および多くの疾患が挙げられる。より具体的には、貧血は、例えば、慢性腎不全、骨髄異形成症候群、慢性関節リウマチ、骨髄移植を含む種々の障害に関連している。貧血はまた、以下の状態とも関連し得る：固形腫瘍（例えば、乳がん、肺がん、結腸がん）；リンパ系の腫瘍（例えば、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンおよびホジキンリンパ腫）；造血系の腫瘍（例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫）；放射線治療；化学療法（例えば、白金を含むレジメン）；炎症および自己免疫疾患（慢性関節リウマチ、他の炎症性関節炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、急性もしくは慢性の皮膚疾患（例えば、乾癬）、炎症性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）が挙げられるがこれらに限定されない）；急性もしくは慢性の腎疾患もしくは腎不全（特発性もしくは先天性的状態を含む）；急性もしくは慢性の肝臓病；急性もしくは慢性の出血；患者の同種もしくは自己抗体および／または宗教上の理由（例えば、いくつかのエホバの証人（Jehovah's Witness））に起因する赤血球の輸血が可能ではない状況；感染（例えば、マラリア、骨髄炎）；異常ヘモグロビン症（例えば、鎌状赤血球病、サラセミアを含む）；薬物の使用または乱用（例えば、アルコールの誤用）；輸血を回避するためのあらゆる要因から貧血を有する小児患者；ならびに、循環過負荷に関する問題に起因して輸血を受けることができない、高齢の患者または貧血と共に基礎心肺疾患を有する患者。

#### 【0122】

G D F トラップポリペプチドは、一般的に赤血球（RBC）形態の変化をほとんど伴わない、低増殖性骨髄の貧血の処置に相当である。低増殖性貧血には、以下のものが含まれる：1）慢性疾患の貧血、2）腎臓疾患の貧血、および3）代謝低下状態に関連する貧

10

20

30

40

50

血。これらの型の各々では、内因性のエリスロポイエチンレベルは、観察される貧血の程度に対して不適切に低い。他の低増殖性貧血には、以下のものが含まれる：4) 早期の鉄欠乏貧血、および5) 骨髄損傷に起因する貧血。これらの型では、内因性のエリスロポイエチンレベルは、観察される貧血の程度に対して適切に上昇している。

#### 【0123】

最も一般的な型は慢性疾患の貧血であり、それは炎症、感染、組織損傷およびがんなどの状態を包含し、骨髄での低いエリスロポイエチンレベルおよびエリスロポイエチンへの不十分な応答の両方によって識別される (Adamson、2008年、Harrison's Principles of Internal Medicine、第17版; McGraw Hill、New York、628~634頁)。多くの因子が、がん関連の貧血に寄与し得る。いくつかは、疾患過程自体、および炎症性サイトカイン、例えばインターロイキン1、インターフェロンγおよび腫瘍壊死因子の生成に関連する (Bronら、2001年、Semin Oncol 28巻 (補遺8号) : 1~6頁)。その影響の中で、炎症は重要な鉄調節ペプチドヘプシジンを誘導し、それによってマクロファージからの鉄のエクспортを阻害し、一般に赤血球生成のための鉄の利用可能性を制限する (Ganz、2007年、J Am Soc Nephrol 18巻 : 394~400頁)。様々な経路を通しての血液喪失も、がん関連の貧血に寄与することができる。がん進行による貧血の有病率は、前立腺がんでの5%から多発性骨髄腫での90%まで、がん型によって変動する。がん関連の貧血は、倦怠および生活の質の低下、処置効力の低下および死亡率の増加を含む、重大な結果を患者にもたらす。

#### 【0124】

慢性腎臓疾患は、腎機能障害の程度によって重症度が変動する、低増殖性貧血に関連する。そのような貧血は、主に、エリスロポイエチンの不十分な生成および赤血球の生存の低下による。慢性腎臓疾患は、透析または腎移植が患者生存のために必要とされる末期 (5期) 疾患まで、数年または数十年にわたって徐々に通常進行する。貧血はしばしばこの過程の初期に発生し、疾患の進行に伴い悪化する。腎臓疾患の貧血の臨床上的結果は十分に記載されており、その例には、左心室肥大の発達、認知機能障害、生活の質の低下、および免疫機能の変化が含まれる (Levinら、1999年、Am J Kidney Dis 27巻 : 347~354頁; Nissenson、1992年、Am J Kidney Dis 20巻 (補遺1号) : 21~24頁; Revickiら、1995年、Am J Kidney Dis 25巻 : 548~554頁; Gafterら、1994年、Kidney Int 45巻 : 224~231頁)。慢性腎臓疾患のマウスモデル (下記の実施例を参照) で出願人によって実証されるように、GDFトラップポリペプチドは、腎臓疾患の貧血を処置するために用いることができる。

#### 【0125】

低代謝速度をもたらす多くの状態は、軽度から中等度の低増殖性貧血をもたらし得る。内分泌欠乏状態は、そのような状態の1つである。例えば、貧血は、アジソン病、甲状腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症、または去勢されたかもしくはエストロゲンで処置された男性で起こることがある。軽度から中等度の貧血はまた、特に高齢者で一般的な状態である、食事からのタンパク質摂取の低下で起こることもある。最後に、貧血は、ほとんどあらゆる原因から生じる慢性肝疾患患者で起こることがある (Adamson、2008年、Harrison's Principles of Internal Medicine、第17版; McGraw Hill、New York、628~634頁)。

#### 【0126】

外傷または分娩後出血からなど、十分な量の急性失血によって生じる貧血は、急性出血後貧血として公知である。急性失血は、他の血液成分と共に比例的なRBC枯渇があるので、貧血を伴わない血液量減少を最初に引き起こす。しかし、血液量減少は、血管外から血管区画へ流体を移動させる生理学的機構を急速に引き起こし、血液希釈および貧血をもたらす。慢性であれば、失血により体内に貯蔵されている鉄が徐々に枯渇し、最終的に鉄欠乏症につながる。出願人により実証されたように、マウスモデルにおいて (下記の実施

例を参照されたい)、GDFトラップポリペプチドは、急性失血の貧血からの速やかな回復のために使用され得る。

#### 【0127】

鉄欠乏性貧血は、中間段階として負の鉄均衡および鉄欠乏赤血球生成を含む、鉄欠乏増加の段階的進行の最終段階である。妊娠、不十分な食事、腸の吸収不良、急性または慢性の炎症および急性または慢性の血液喪失などの状態で例示されるように、鉄欠乏は、鉄要求の増加、鉄摂取の減少または鉄損失の増加から起こることがある。この型の軽度から中等度の貧血では、骨髄は低増殖性のままであり、RBC形態はほとんど正常である。しかし、軽度の貧血でさえ、多少の小球性淡色性RBCを生じることがあり、重度の鉄欠乏貧血への移行には、骨髄の過剰増殖およびますます増加する小球性および淡色性のRBCが付随する(Adamson、2008年、Harrison's Principles of Internal Medicine、第17版; McGraw Hill、New York、628~634頁)。鉄欠乏性貧血のための適当な療法は、その原因および重症度によって決まり、経口用鉄処方物、非経口鉄処方物およびRBC輸血が主要な従来の選択肢である。GDFトラップポリペプチドは、慢性鉄欠乏性貧血を処置するために単独で、または特に多因子起源の貧血を処置するために従来の治療手法と一緒に、用い得る。

10

#### 【0128】

低増殖性貧血は、炎症、感染またはがん進行の二次的な機能不全の代わりに、骨髄の一次機能不全または不全症から生じ得る。顕著な例は、がん化学療法薬またはがん放射線療法に起因する骨髄抑制である。臨床試験の広範な精査は、軽度の貧血が化学療法の後に100%の患者で起こり得、より重度の貧血はそのような患者の最高80%で起こり得ることを見出した(Groopmanら、1999年、J Natl Cancer Inst 91巻: 1616~1634頁)。骨髄抑制薬には、以下のものが含まれる: 1) ナイトロジェンマスタード(例えば、メルファラン)およびニトロソウレア(例えば、ストレプトゾシン)などのアルキル化剤; 2) 葉酸拮抗薬(例えば、メトトレキセート)、プリン類似体(例えば、チオグアニン)およびピリミジン類似体(例えば、ゲムシタビン)などの代謝拮抗物質; 3) アントラサイクリン(例えば、ドキシソルビシン)などの細胞傷害抗生物質; 4) キナーゼインヒビター(例えば、ゲフィチニブ); 5) タキサン(例えば、パクリタキセル)およびビンカアルカロイド(例えば、ビンORELビン)などの分裂抑制剤; 6) モノクローナル抗体(例えば、リツキシマブ); ならびに7) トポイソメラーゼインヒビター(例えば、トポテカンおよびエトポシド)。化学療法誘発貧血のマウスモデル(下記の実施例を参照)で実証されるように、GDFトラップポリペプチドは、化学療法剤および/または放射線療法に起因する貧血を処置するために用いることができる。

20

30

#### 【0129】

GDFトラップポリペプチドは、小型(小球性)、特大(大赤血球性)、奇形または異常な色(淡色性)のRBCを一部特徴とする、無秩序なRBC成熟の貧血の処置にも適当である。

#### 【0130】

患者は、患者を標的とするヘモグロビンレベル(通常は、約10 g/dlと約12.5 g/dlとの間、代表的には約11.0 g/dl(Jacobsら(2000年)Nephrol Dial Transplant 15巻、15~19頁もまた参照のこと))まで回復させることを意図した投薬レジメンで処置され得るが、より低い標的レベルでは、より少ない心臓血管系の副作用が引き起こされ得る。あるいは、ヘマトクリットレベル(細胞によって占有される血液サンプルの容積の割合)が、赤血球の状態の指標として使用され得る。健康な個体についてのヘマトクリットレベルは、成人男性について41~51%、そして、成人女性について35~45%の範囲である。標的ヘマトクリットレベルは、通常、約30~33%である。さらに、ヘモグロビン/ヘマトクリットレベルは、個々人で変動する。したがって、最適には、標的ヘモグロビン/ヘマトクリットレベルは、患者ごとに個別化され得る。

40

#### 【0131】

50

本明細書中に開示されるGDFトラップポリペプチドの赤血球レベルに対する迅速な作用は、これらの因子がEpoとは異なる機構によって作用していることを示す。したがって、これらのアンタゴニストは、Epoに対して上手く応答しない患者において赤血球およびヘモグロビンレベルを増加させるために有用であり得る。例えば、GDFトラップポリペプチドは、通常用量～増量用量(>300IU/kg/週)のEpoの投与が標的レベルまでのヘモグロビンレベルの増加をもたらさない患者に有益であり得る。不適切なEpo応答を有する患者は、全てのタイプの貧血について見られるが、より多い数の不応者が、がんを有する患者および末期の腎疾患を有する患者において特に頻繁に観察されている。Epoに対する不適切な応答は、構成的(すなわち、Epoでの最初の処置の際に観察される)、または後天的(例えば、Epoでの反復処置の際に観察される)のいずれかであり得る。

10

#### 【0132】

GDFトラップポリペプチドはまた、Epoの有害な作用に対して感受性である患者を処置するために使用され得る。Epoの主たる有害な作用は、ヘマトクリットまたはヘモグロビンレベルの過剰な増加と、赤血球増加症である。ヘマトクリットレベルの上昇は、高血圧(より具体的には、高血圧の深刻化)および脈管の血栓症につながり得る。報告されているEpoの他の有害な作用(このうちいくつかは、高血圧に関するものである)は、頭痛、インフルエンザ様症候群、バイパスの閉塞、心筋梗塞、ならびに血栓症、高血圧性脳障害および赤血球生成不全による大脳痙攣である(Singibarti、(1994年) J. Clin Invest 72巻(補遺6号)、S36～S43; Horlら(2000年) Nephrol Dial Transplant 15巻(補遺4号)、51～56頁; Delantyら(1997年) Neurology 49巻、686～689頁; Bunn(2002年) N Engl J Med 346巻(7号)、522～523頁)。

20

#### 【0133】

GDFトラップは、Epoおよびエリスロポエチンの経路を活性化する他の因子と組み合わせても使用され得る。いくつかの場合において、これにより組み合わせた各薬物の投薬を少なくすることが可能になり得る。

#### 【0134】

特定の実施形態では、本発明は、GDFトラップポリペプチドを用いて処置されているか、または処置される候補の患者を、その患者における1つまたは複数の血液学的パラメータを測定することによって管理するための方法を提供する。血液学的パラメータは、GDFトラップポリペプチドを用いた処置の候補である患者に対する適切な投薬を評価するため、GDFトラップポリペプチドを用いた処置中に血液学的パラメータをモニタリングするため、GDFトラップポリペプチドを用いた処置中に投薬量を調節するかどうかを評価するため、および/またはGDFトラップポリペプチドの適切な維持用量を評価するために使用され得る。1つまたは複数の血液学的パラメータが正常レベルの外側である場合、GDFトラップポリペプチドを用いた投薬は減少、延期または終了され得る。

30

#### 【0135】

本明細書中で提供される方法に従って測定され得る血液学的パラメータとしては、例えば、赤血球レベル、血圧、貯蔵鉄、および、当該分野で認識されている方法を使用する、赤血球レベルの増加と相関する体液中に見出される他の因子が挙げられる。そのようなパラメータは、患者からの血液試料を使用して決定され得る。赤血球レベル、ヘモグロビンレベル、および/またはヘマトクリットレベルの増加により、血圧の上昇が引き起こされ得る。

40

#### 【0136】

一実施形態では、GDFトラップポリペプチドを用いて処置される候補である患者において、1つまたは複数の血液学的パラメータが正常範囲の外側、または正常の高値側である場合、そのときは、血液学的パラメータが自然にまたは治療介入によってのいずれかで正常または許容されるレベルに戻るまで、GDFトラップポリペプチド投与の開始が延期

50

され得る。例えば、候補の患者が高血圧または前高血圧である場合、そのときは、患者は、患者の血圧を低下させるために血圧降下剤を用いて処置され得る。個々の患者の状態に適した任意の血圧降下剤が使用され得、例えば、利尿薬、アドレナリンインヒビター（アルファ遮断薬およびベータ遮断薬を含む）、血管拡張薬、カルシウムチャネル遮断薬、アンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター、またはアンジオテンシンⅡ受容体遮断薬が挙げられる。血圧は、食事および運動レジメンを使用して代替的に処置され得る。同様に、候補の患者が正常よりも低いか、または正常の低値側の貯蔵鉄を有する場合、そのときは、患者は、患者の貯蔵鉄が正常または許容されるレベルに戻るまで、適切な食事および／または鉄サプリメントのレジメンを用いて処置され得る。正常よりも高い赤血球レベルおよび／またはヘモグロビンレベルを有する患者に対して、そのときは、そのレベルが正常または許容されるレベルに戻るまでGDFトラップポリペプチドの投与が延期され得る。

10

#### 【0137】

特定の実施形態では、GDFトラップポリペプチドを用いて処置される候補である患者において、1つまたは複数の血液学的パラメータが正常範囲の外側、または正常の高値側である場合、そのときは、投与の開始が延期されないことがある。しかし、GDFトラップポリペプチドの投薬量または投薬の頻度は、GDFトラップポリペプチドが投与されると上昇する血液学的パラメータの許容されない増加リスクを低下させる量に設定され得る。あるいは、GDFトラップポリペプチドと、望ましくないレベルの血液学的パラメータに対処する治療剤を組み合わせた治療レジメンが患者のために開発され得る。例えば、患者の血圧が上昇している場合、そのときは、GDFトラップポリペプチドおよび血圧降下剤の投与を含む治療レジメンが設計され得る。所望より低い貯蔵鉄を有する患者に対して、GDFトラップポリペプチドおよび鉄の補給の治療レジメンが開発され得る。

20

#### 【0138】

一実施形態では、1つまたは複数の血液学的パラメータについてのベースラインパラメータは、GDFトラップポリペプチドを用いて処置される候補である患者に対して確立され得、適切な投薬レジメンが、ベースライン値に基づいて患者に対して確立される。あるいは、患者の病歴に基づいて確立されたベースラインパラメータが、患者に対して適切なGDFトラップポリペプチド投薬レジメンを通知するために使用され得る。例えば、健康な患者が、規定の正常範囲を超える確立された血圧のベースライン数値を有する場合、GDFトラップポリペプチドを用いた処置の前に、その患者の血圧を一般集団について正常だとみなされる範囲に至らせる必要がないことがあり得る。患者の、GDFトラップポリペプチドを用いた処置前の1つまたは複数の血液学的パラメータのベースライン値は、GDFトラップポリペプチドを用いた処置中の、血液学的パラメータの任意の変化をモニタリングするための関連性のある比較値としても使用され得る。

30

#### 【0139】

特定の実施形態では、1つまたは複数の血液学的パラメータは、GDFトラップポリペプチドを用いて処置されている患者において測定される。血液学的パラメータは、処置中の患者をモニタリングし、GDFトラップポリペプチドを用いた投薬または別の治療剤を用いた追加の投薬の調節または終了を可能にするために使用され得る。例えば、GDFトラップポリペプチドの投与によって血圧、赤血球レベル、またはヘモグロビンレベルが上昇したか、または貯蔵鉄が減少した場合、そのときは、GDFトラップポリペプチドの用量は、1つまたは複数の血液学的パラメータに対するGDFトラップポリペプチドの作用を減少させるために、その量または頻度が減少され得る。GDFトラップポリペプチドの投与によって、患者にとって不都合な1つまたは複数の血液学的パラメータの変化が生じた場合、そのときは、GDFトラップポリペプチドの投薬は、一時的に、血液学的パラメータが許容されるレベルに戻るまでか、または永久に、のいずれかで終了され得る。同様に、GDFトラップポリペプチドの投与の用量または頻度を減らした後、1つまたは複数の血液学的パラメータが許容される範囲内に至らない場合、そのときは、投薬は終了され得る。GDFトラップポリペプチドを用いた投薬を減らすかまたは終了する代わりに、ま

40

50

たはそれに加えて、患者は、血液学的パラメータの望ましくないレベルに対処する追加の治療剤、例えば、血圧降下剤または鉄のサプリメントなどが投薬され得る。例えば、G D Fトラップポリペプチドを用いて処置されている患者の血圧が上昇している場合、そのときは、G D Fトラップポリペプチドを用いた投薬は同じレベルで継続され得、および処置レジメンに血圧降下剤が追加されるか、G D Fトラップポリペプチドを用いた投薬は減らされ得（例えば、量および／または頻度について）、および処置レジメンに血液降下剤が追加されるか、または、G D Fトラップポリペプチドを用いた投薬は終了され得、および患者は血圧降下剤を用いて処置され得る。

【0140】

特定の実施形態では、G D Fトラップポリペプチドを用いて処置されている患者、またはG D Fトラップポリペプチドを用いて処置される候補の患者は、神経筋障害または筋発生の障害に罹患しているか、またはそれを生じる危険性のある患者などの、筋の成長を必要とする患者である。例えば、患者または候補の患者は、ルー・ゲーリック病（A L S）、がん食欲不振悪液質症候群、筋ジストロフィー、筋萎縮症、鬱血性閉塞性肺疾患（およびC O P Dに伴う筋消耗）、筋消耗症候群、筋肉減少症、または悪液質に罹患しているか、またはそれを生じる危険性があり得る。筋ジストロフィーは、骨格筋および場合によっては心臓および呼吸器の筋肉のゆるやかな衰弱および劣化を特徴とする退行性の筋疾患のグループを指す。本主題のG D Fトラップポリペプチドを含むレジメンを用いて処置され得る例示的な筋ジストロフィーとしては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（D M D）、ベッカー型筋ジストロフィー（B M D）、エメリ・ドライフス型筋ジストロフィー（E D M D）、肢帯型筋ジストロフィー（L G M D）、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（F S HまたはF S H D）（ランドジー - デジェリーヌとしても公知である）、筋緊張性ジストロフィー（M M D）（シュタイネルト病としても公知である）、眼咽頭型筋ジストロフィー（O P M D）、遠位型筋ジストロフィー（D D）、先天性筋ジストロフィー（C M D）が挙げられる。

【0141】

（6．薬学的組成物）

特定の実施形態では、本発明の化合物（例えば、G D Fトラップポリペプチド）は、薬学的に受容可能なキャリアと共に処方される。例えば、G D Fトラップポリペプチドは、単独で、または、薬学的処方物（治療用組成物）の成分として投与され得る。本主題の化合物は、ヒトまたは獣医学における医薬での使用のために任意の簡便な方法で投与するために処方され得る。

【0142】

特定の実施形態では、本発明の治療方法は、全身に、または、移植物もしくはデバイスとして局所的に組成物を投与する工程を包含する。投与される場合、本発明において使用するための治療用組成物は、当然のことながら、発熱物質を含まない生理学的に容認可能な形態である。また上記の組成物中に任意選択で含められ得るG D Fトラップポリペプチド以外の治療上有用な因子は、本発明の方法において、本主題の化合物（例えば、G D Fトラップポリペプチド）と同時に、または連続して投与され得る。

【0143】

代表的に、化合物は、非経口投与される。非経口投与に適した薬学的組成物は、1または複数のG D Fトラップポリペプチドを、1または複数の薬学的に受容可能な無菌かつ等張の水性もしくは非水性の溶液、分散物、懸濁物もしくはエマルジョン、または、使用直前に無菌の注射可能な溶液もしくは分散物へと再構成され得る無菌粉末と組み合わせて含み得、この組成物は、抗酸化物質、緩衝液、静菌剤、処方物を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、または、懸濁剤もしくは増粘剤を含み得る。本発明の薬学的組成物中で採用され得る適切な水性および非水性のキャリアの例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびこれらの適切な混合物、植物油（例えば、オリーブ油）、ならびに、注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）が挙げられる。適切な流動性は、例えば、

コーティング材料（例えば、レシチン）の使用によって、分散剤の場合には必要とされる粒子径の維持によって、そして、界面活性剤の使用によって維持され得る。

【0144】

さらに、組成物は、カプセル化され得、または、標的組織部位（例えば、骨髄）へと送達するための形態で注射され得る。特定の実施形態では、本発明の組成物は、標的組織部位（例えば、骨髄）に1または複数の治療用化合物（例えば、GDFトラップポリペプチド）を送達し得、成長中の組織のための構造を提供し得、そして、最適には身体内へと再吸収され得るマトリクスを含み得る。例えば、マトリクスは、GDFトラップポリペプチドの遅速放出を提供し得る。このようなマトリクスは、他の移植医療用途に現在使用される材料から形成され得る。

【0145】

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

【0146】

特定の実施形態では、本発明の方法は、例えば、カプセル、カシェ、丸剤、錠剤、ロゼンジ（矯味矯臭薬を含む基材、通常はスクロースおよびアカシアまたはトラガントを用いて）、散剤、顆粒剤、または、水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁物として、または、水中油もしくは油中水の液体エマルジョンとして、または、エリキシルもしくはシロップとして、または、トローチ（ゼラチンおよびグリセリン、または、スクロースおよびアカシアのような不活性基材を用いて）および／またはマウスウォッシュなどの形態（この各々が、活性成分として所定量の因子を含む）で、経口投与され得る。因子はまた、ボーラス、舐剤またはペーストとしても投与され得る。

【0147】

経口投与のための固体投薬形態（カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤など）において、本発明の1または複数の治療用化合物は、1または複数の薬学的に受容可能なキャリア（例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム）および／または、以下のうちのいずれかと共に混合され得る：（1）充填剤または増量剤（例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよび／またはケイ酸）；（2）結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシアなど）；（3）湿潤剤（例えば、グリセロール）；（4）崩壊剤（例えば、寒天（agar-agar）、炭酸カルシウム、ポテトもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム）；（5）溶液抑制因子（solution retarding agent）（例えば、パラフィン）；（6）吸収加速剤（例えば、四級アンモニウム化合物）；（7）加湿剤（例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなど）；（8）吸着剤（例えば、カオリンおよびベントナイトクレイ）；（9）潤滑剤（例えば、滑石、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物）；および（10）着色剤。カプセル、錠剤および丸剤の場合には、薬学的組成物はまた、緩衝剤を含み得る。同様のタイプの固形組成物もまた、

ラクトースすなわち乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を用いて、軟充填ゼラチンカプセルおよび硬充填ゼラチンカプセル中の充填物として用いられ得る。

#### 【0148】

経口投与のための液体投薬形態としては、薬学的に受容可能なエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁物、シロップおよびエリキシルが挙げられる。活性成分に加え、液体投薬形態は、当該分野で一般に用いられる不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿実油、ピーナッツ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物を含み得る。不活性な希釈剤に加え、経口用組成物はまた、加湿剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤、芳香剤および保存剤のようなアジュバントを含み得る。

#### 【0149】

懸濁物は、活性化化合物に加えて、懸濁剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガント、ならびにこれらの混合物を含み得る。

#### 【0150】

本発明の組成物はまた、保存剤、加湿剤、乳化剤および分散剤のようなアジュバントを含み得る。微生物の作用の阻止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなど）を含めることによって保証され得る。糖、塩化ナトリウムなどのような等張化剤を組成物中に含めることも望ましくあり得る。さらに、注射可能な薬学的形態の吸収の延長は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅らせる因子を含めることによってもたらされ得る。

#### 【0151】

投薬レジメンは、本発明の主題の化合物（例えば、GDFトラップポリペプチド）の作用を修飾する種々の要因を考慮して主治医によって決定されることが理解される。種々の要因としては、患者の赤血球数、ヘモグロビンレベルまたは他の診断指標、所望の標的赤血球数、患者の年齢、性別および食事、赤血球レベルの低下に寄与し得るあらゆる疾患の重篤度、投与時間、ならびに他の臨床的要因が挙げられるがこれらに限定されない。最終組成物への他の公知の増殖因子の添加もまた、投薬量に影響を及ぼし得る。進行は、赤血球およびヘモグロビンのレベルの周期的な評価、ならびに、網状赤血球レベルおよび造血プロセスの他の指標の評価によってモニターされ得る。

#### 【0152】

特定の実施形態では、本発明はまた、GDFトラップポリペプチドのインビボ産生のための遺伝子治療を提供する。このような治療は、上に列挙したような障害を有する細胞または組織中にGDFトラップポリヌクレオチド配列を導入することによってその治療作用を達成する。GDFトラップポリヌクレオチド配列の送達は、キメラウイルスのような組換え発現ベクターまたはコロイド分散系を用いて達成され得る。GDFトラップポリヌクレオチド配列の治療的送達には、標的化されたりボソームの使用が好ましい。

#### 【0153】

本明細書中で教示されるような遺伝子治療に利用され得る種々のウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、または、レトロウイルスのようなRNAウイルスが挙げられる。レトロウイルスベクターは、マウスもしくはトリのレトロウイルスの誘導体であり得る。単一の外来遺伝子が挿入され得るレトロウイルスベクターの例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：モロニーマウス白血病ウイルス（MoMuLV）、ハーベーマウス肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳腺癌ウイルス（MuMTV）およびラウス肉腫ウイルス（RSV）。多数のさらなるレトロウイ

10

20

30

40

50

ルスベクターが多数の遺伝子を組み込み得る。これらのベクターは全て、形質導入された細胞が同定および生成され得るように、選択マーカーについての遺伝子を移送または組み込み得る。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質またはタンパク質を付着させることによって、標的的特異的とされ得る。好ましい標的化は、抗体を用いて達成される。当業者は、GDFトラップポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターの標的的特異的な送達を可能にするために、特定のポリヌクレオチド配列がレトロウイルスゲノム中に挿入され得るか、または、ウイルスエンベロープに付着され得ることを認識する。

【0154】

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

【0155】

GDFトラップポリヌクレオチドのための別の標的化送達システムは、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズおよび脂質ベースの系（水中油エマルジョン、ミセル、混合型ミセルおよびリポソームを含む）が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系は、リポソームである。リポソームは、インビトロおよびインビボで送達ビヒクルとして有用な人工の膜小胞である。RNA、DNA およびインタクトなビリオンが、水性の内部に封入され得、そして、生物学的に活性な形態で細胞へと送達され得る（例えば、Fraleighら、Trends Biochem. Sci.、6巻：77頁、1981年を参照のこと）。リポソームビヒクルを用いた効率的な遺伝子移入のための方法は当該分野で公知であり、例えば、Manninoら、Biotechniques、6巻：682頁、1988年を参照のこと。リポソームの組成は、通常リン脂質の組合せであり、通常ステロイド（特に、コレステロール）と組合わされる。他のリン脂質または他の脂質もまた使用され得る。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価のカチオンの存在に依存する。

【0156】

リポソームの生成において有用な脂質の例としては、ホスファチジル化合物（例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシドおよびガングリオシド）が挙げられる。例示的なリン脂質としては、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。例えば、器官特異性、細胞特異性および細胞小器官特異性に基づいたリポソームの標的化もまた可能であり、当該分野で公知である。

【実施例】

【0157】

（実施例）

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

【0158】

（実施例1 GDFトラップの作製）

出願人は以下の通りGDFトラップを構築した。GDF11および／またはミオスタチンと比較してアクチビンAへの結合が大幅に減少している（配列番号1の79位におけるロイシンからアスパラギン酸への置換の結果として）修飾されたActRIIB細胞外ドメインを有するポリペプチドを、間に最小限のリンカー（3つのグリシンアミノ酸）を用いて、ヒトもしくはマウスのFcドメインに融合させた。この構築物を、それぞれ、ActRIIB（79D 20～134）-hFcおよびActRIIB（L79D 20～134）-mFcと呼ぶ。79位にアスパラギン酸ではなくグルタミン酸を持つ代替の形態

について同様に行った（L79E）。以下の配列番号7について、226位にバリンではなくアラニンを持つ代替の形態も作製し、試験された全ての点において同等に実施した。79位のアスパラギン酸（配列番号1に対して、または配列番号7に対して第60位）に以下で灰色のマーカを付す。配列番号7に対して、226位のバリンも以下で灰色のマーカを付す。

【0159】

GDFトラップ ActRIIB（L79D 20-134）-hFcを、CHO細胞株から精製されたものとして以下に示す（配列番号7）。

【0160】

【化12】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT  
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PMPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPGK

10

20

【0161】

GDFトラップのActRIIBから誘導された部分は、以下に示されるアミノ酸配列（配列番号32）を有し、その部分を、単量体として、または単量体、二量体以上の複合体として非Fc融合タンパク質として使用し得る。

【0162】

【化13】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE  
LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE  
PPPTAPT (配列番号 32)

30

【0163】

GDFトラップタンパク質を、CHO細胞株中で発現させた。3つの異なるリーダー配列を検討した。

【0164】

【化14】

(i) ミツパチメリチン (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号 8)

(ii) 組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (配列番号 9)

40

(iii) 天然 : MTAPWVALALLWGSLCAGS (配列番号 10).

【0165】

選択された形態は、TPAリーダーを採用し、そして、以下のプロセッシングを受けていないアミノ酸配列を有する。

【0166】

50

## 【化 1 5】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE  
 GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE  
 GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ

## 【 0 1 6 7】

10

## 【化 1 6】

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 11)

## 【 0 1 6 8】

このポリペプチドは、以下の核酸配列によってコードされる（配列番号 1 2）。

## 【 0 1 6 9】

## 【化 1 7】

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

20

30

## 【 0 1 7 0】

精製を、例えば、以下のうちの3またはそれ以上を任意の順序で含む一連のカラムクロマトグラフィー工程によって達成し得る：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびカチオン交換クロマトグラフィー。精製は、ウイルス濾過およびバッファの交換で完了し得る。精製スキームの例では、細胞培養培地をプロテインAカラムに通し、150mMのトリス／NaCl（pH8.0）で洗浄し、次いで50mMのトリス／NaCl（pH8.0）で洗浄し、0.1Mのグリシン、pH3.0を用いて溶出する。ウイルス排除工程として、低pHの溶出物を室温で30分間保持する。次いで、溶出物を中和し、Qセファロースイオン交換カラムに通し、50mMのトリス、pH8.0、50mMのNaClで洗浄し、150mM～300mMのNaCl濃度を伴う50mMのトリス、pH8.0中に溶出する。次いで、溶出物を50mMのトリス、pH8.0、1.1Mの硫酸アンモニウム中に移し換え、フェニルセファロースカラムに通し、洗浄し、150～300mMの硫酸アンモニウムを伴う50mMのTris、pH8.0中に溶出する。溶出物を、使用のために透析および濾過する。

40

50

## 【0171】

追加のGDFトラップ（ミオスタチンまたはGDF11と比較してアクチビンAの結合の割合が減少するように修飾されたActRIIB-Fc融合タンパク質）は、本明細書中に参考として援用される、PCT/US2008/001506およびWO2006/012627に記載されている。

## 【0172】

（実施例2 GDF-11およびアクチビン媒介性シグナル伝達についてのバイオアッセイ）

A-204レポーター遺伝子アッセイを、GDF-11およびアクチビンAによるシグナル伝達に対するActRIIB-Fcタンパク質およびGDFトラップの作用を評価するために使用した。細胞株：ヒト横紋筋肉腫（筋肉から誘導された）。レポーターベクター：pGL3（CAGA）12（Dennlerら、1998年、EMBO 17巻：3091～3100頁に記載されている）。CAGA12モチーフはTGFB-β応答性遺伝子（PAI-1遺伝子）に存在するので、このベクターは、一般的に、Smad2および3を介するシグナル伝達の因子に用いる。

1日目：A-204細胞を48ウェルプレート中に分ける。

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

3日目：因子を加える（培地+0.1%BSA中に希釈）。インヒビターは、細胞への追加前に因子と一緒に1時間プレインキュベートする必要がある。6時間後、細胞をPBSでリンスし、そして細胞を溶解する。

## 【0173】

この後にルシフェラーゼアッセイを行う。いかなるインヒビターも存在しない状態で、アクチビンAは、10倍のレポーター遺伝子発現の刺激、およびED50～2ng/mlを示した。GDF-11：16倍の刺激、ED50：約1.5ng/ml。

## 【0174】

このアッセイにおいて、ActRIIB（20～134）はアクチビン、GDF-8およびGDF-11の活性の強力なインヒビターである。改変体も同様にこのアッセイで試験した。

## 【0175】

（実施例3 N末端およびC末端の切断によるGDF-11の阻害）

N末端および／またはC末端における切断を伴うActRIIB（20～134）-hFcの改変体を作製し、GDF-11およびアクチビンのインヒビターとしての活性について試験した。活性を以下に示す（条件培地において測定）。

## 【0176】

10

20

30

40

50

【表 1】

C末端におけるA c t R I I B－h F cの切断：

|                     | IC50 (ng/mL) |       |
|---------------------|--------------|-------|
|                     | GDF-11       | アクチビン |
| ActRIIB(20-134)-hFc | 45           | 22    |
| ActRIIB(20-132)-hFc | 87           | 32    |
| ActRIIB(20-131)-hFc | 120          | 44    |
| ActRIIB(20-128)-hFc | 130          | 158   |

## 【0177】

見ることができるように、C末端における3（... PPTで終わる）、6（... YEPで終わる）またはそれより多いアミノ酸の切断は、その分子の活性の3倍以上の低下を引き起こす。A c t R I I B部分の最後の15アミノ酸の切断は活性の大幅な損失を引き起こす（WO2006/012627を参照のこと）。

## 【0178】

アミノ末端の切断は、A c t R I I B（20～131）－h F cタンパク質のバックグラウンドにおいて行った。活性を以下に示す（条件培地において測定）。

## 【0179】

【表 2】

N末端におけるA c t R I I B－h F cの切断：

|                                 | IC50 (ng/mL) |       |
|---------------------------------|--------------|-------|
|                                 | GDF-11       | アクチビン |
| ActRIIB(20-131)-hFc<br>(GRG...) | 183          | 201   |
| ActRIIB(21-131)-hFc<br>(RGE...) | 121          | 325   |
| ActRIIB(22-131)-hFc<br>(GEA...) | 71           | 100   |
| ActRIIB(23-131)-hFc<br>(EAE...) | 60           | 43    |
| ActRIIB(24-131)-hFc<br>(AET...) | 69           | 105   |

## 【0180】

したがって、N末端からの2、3または4アミノ酸の切断は、完全長細胞外ドメインを持つバージョンよりも活性なタンパク質の生成につながる。追加の実験は、5アミノ酸が切断されたA c t R I I B（25～131）－h F cが、切断されていない形態と等価な活性を有し、N末端における追加の欠失は引き続きタンパク質の活性を低下させることを示す。したがって、最適な構築物は、配列番号1のアミノ酸133～134の間で終わる

C末端および配列番号1のアミノ酸22～24から始まるN末端を有する。アミノ酸21または25に対応するN末端は、ActRIIB（20～134）-hFc構築物と同様の活性をもたらす。これらの切断は、L79DまたはL79E改変体などのGDFトラップにおいても使用され得る。

#### 【0181】

（実施例4 ActRIIB-Fc改変体、細胞ベースの活性）

ActRIIB-Fcタンパク質およびGDFトラップの活性を、上記の細胞ベースのアッセイで試験した。結果を以下の表に要約する。いくつかの改変体を異なるC末端切断構築物において試験した。上記のように、5または15アミノ酸の切断は活性の低下を引き起こした。GDFトラップ（L79DおよびL79E改変体）は、アクチビンの結合の実質的な損失を示した一方、ほとんど野生型のGDF-11阻害を保持した。

#### 【0182】

#### 【表3】

可溶性ActRIIB-FcのGDF11およびアクチビンAへの結合：

| ActRIIB-Fc<br>差異 | ActRIIBの部分<br>(配列番号1のアミ<br>ノ酸に対応) | GDF11阻害活性                       | アクチビン<br>阻害活性                   |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| R64              | 20-134                            | +++<br>(およそ $10^{-8}$ M $K_i$ ) | +++<br>(およそ $10^{-8}$ M $K_i$ ) |
| A64              | 20-134                            | +<br>(およそ $10^{-6}$ M $K_i$ )   | +<br>(およそ $10^{-6}$ M $K_i$ )   |
| R64              | 20-129                            | +++                             | +++                             |
| R64 K74A         | 20-134                            | ++++                            | ++++                            |
| R64 A24N         | 20-134                            | +++                             | +++                             |
| R64 A24N         | 20-119                            | ++                              | ++                              |
| R64 A24N K74A    | 20-119                            | +                               | +                               |
| R64 L79P         | 20-134                            | +                               | +                               |
| R64 L79P K74A    | 20-134                            | +                               | +                               |
| R64 L79D         | 20-134                            | +++                             | +                               |
| R64 L79E         | 20-134                            | +++                             | +                               |
| R64K             | 20-134                            | +++                             | +++                             |
| R64K             | 20-129                            | +++                             | +++                             |
| R64 P129S P130A  | 20-134                            | +++                             | +++                             |
| R64N             | 20-134                            | +                               | +                               |

+弱い活性（およそ $1 \times 10^{-6}$   $K_i$ ）

++中程度の活性（およそ $1 \times 10^{-7}$   $K_i$ ）

+++良好な（野生型）活性（およそ $1 \times 10^{-8}$   $K_i$ ）

++++野生型より強い活性

#### 【0183】

いくつかの改変体を、ラットにおける血清半減期について評価した。A c t R I I B ( 2 0 ~ 1 3 4 ) - F c はおよそ 7 0 時間の血清半減期を有する。A c t R I I B ( A 2 4 N 2 0 ~ 1 3 4 ) - F c はおよそ 1 0 0 ~ 1 5 0 時間の血清半減期を有する。A 2 4 N 改変体は細胞ベースのアッセイ ( 上記 ) およびインビボアッセイ ( 下記 ) において、野生型分子と等価な活性を有する。長い半減期と相まって、これは、経時的に、A 2 4 N 改変体が、タンパク質単位当たり、野生型分子よりも、大きな作用をもたらすことを意味する。A 2 4 N 改変体、および、任意の、上記の試験された他の改変体を、L 7 9 D または L 7 9 E 改変体などの G D F トラップ分子と組み合わせることができる。

【 0 1 8 4 】

( 実施例 5 G D F - 1 1 およびアクチビン A の結合 )

特定の A c t R I I B - F c タンパク質および G D F トラップのリガンドへの結合を B i a C o r e <sup>T M</sup> アッセイにおいて試験した。

【 0 1 8 5 】

A c t R I I B - F c 改変体または野生型タンパク質を、抗 h F c 抗体を使用したシステム上に捕獲した。リガンドを注入し、捕獲された受容体タンパク質の上に流した。結果を以下の表に要約する。

【 0 1 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 4】

I I B 改変体のリガンドの結合特異性

|                                  | GDF11      |            |          |
|----------------------------------|------------|------------|----------|
| タンパク質                            | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M)   |
| ActRIIB(20-134)-hFc              | 1.34e-6    | 1.13e-4    | 8.42e-11 |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc         | 1.21e-6    | 6.35e-5    | 5.19e-11 |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc         | 6.7e-5     | 4.39e-4    | 6.55e-10 |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc         | 3.8e-5     | 2.74e-4    | 7.16e-10 |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc         | 6.77e-5    | 2.41e-5    | 3.56e-11 |
|                                  |            |            |          |
|                                  | GDF8       |            |          |
| タンパク質                            | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M)   |
| ActRIIB(20-134)-hFc              | 3.69e-5    | 3.45e-5    | 9.35e-11 |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc         |            |            |          |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc         | 3.85e-5    | 8.3e-4     | 2.15e-9  |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc         | 3.74e-5    | 9e-4       | 2.41e-9  |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc         | 2.25e-5    | 4.71e-5    | 2.1e-10  |
| ActRIIB(R64K 20-129)-hFc         | 9.74e-4    | 2.09e-4    | 2.15e-9  |
| ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc | 1.08e-5    | 1.8e-4     | 1.67e-9  |
| ActRIIB(K74A 20-134)-hFc         | 2.8e-5     | 2.03e-5    | 7.18e-11 |
|                                  |            |            |          |
|                                  | アクチビンA     |            |          |
| タンパク質                            | Kon (1/Ms) | Koff (1/s) | KD (M)   |
| ActRIIB(20-134)-hFc              | 5.94e6     | 1.59e-4    | 2.68e-11 |
| ActRIIB(A24N 20-134)-hFc         | 3.34e6     | 3.46e-4    | 1.04e-10 |
| ActRIIB(L79D 20-134)-hFc         |            |            | 低い結合     |
| ActRIIB(L79E 20-134)-hFc         |            |            | 低い結合     |
| ActRIIB(R64K 20-134)-hFc         | 6.82e6     | 3.25e-4    | 4.76e-11 |
| ActRIIB(R64K 20-129)-hFc         | 7.46e6     | 6.28e-4    | 8.41e-11 |
| ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc | 5.02e6     | 4.17e-4    | 8.31e-11 |

## 【0187】

これらのデータは、細胞ベースのアッセイのデータを確認し、A24N改変体が、ActRIIB(20～134)-hFc分子のリガンド結合活性と同様のリガンド結合活性を保持し、L79DまたはL79E分子がミオスタチンおよびGDF11の結合を保持するが、アクチビンAへの結合の著しい減少を示す（定量化できない）ことを実証している。

## 【0188】

WO2006/012627（その全体が参考として本明細書中に援用される、例えば59～60頁を参照されたい）に報告されているように、他の改変体を作製し、デバイスと結合させたリガンドを使用し、受容体を結合させたリガンドの上に流して試験した。注

目すべきことに、K 7 4 Y、K 7 4 F、K 7 4 I（およびおそらく他のK 7 4における疎水性の置換、例えばK 7 4 Lなど）、およびD 8 0 Iは、野生型K 7 4分子と比較して、G D F 1 1結合に対するアクチビンA結合の割合の減少を引き起こす。これらの改変体についてのデータの表を以下に再現する。

【0189】

【表5】

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

| ActRIIB  | ActA                  | GDF11                 |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| WT (64A) | KD=1.8e-7M<br>(+)     | KD= 2.6e-7M<br>(+)    |
| WT (64R) | na                    | KD= 8.6e-8M<br>(+++)  |
| +15デル    | KD ~2.6 e-8M<br>(+++) | KD= 1.9e-8M<br>(++++) |
| E37A     | *                     | *                     |
| R40A     | -                     | -                     |
| D54A     | -                     | *                     |
| K55A     | ++                    | *                     |
| R56A     | *                     | *                     |
| K74A     | KD=4.35e-9 M<br>+++++ | KD=5.3e-9M<br>+++++   |
| K74Y     | *                     | --                    |
| K74F     | *                     | --                    |
| K74I     | *                     | --                    |
| W78A     | *                     | *                     |
| L79A     | +                     | *                     |
| D80K     | *                     | *                     |
| D80R     | *                     | *                     |
| D80A     | *                     | *                     |
| D80F     | *                     | *                     |
| D80G     | *                     | *                     |
| D80M     | *                     | *                     |
| D80N     | *                     | *                     |
| D80I     | *                     | --                    |
| F82A     | ++                    | -                     |

\*結合が観察されなかった

-- < 1 / 5 WT結合

- 約1 / 2 WT結合

+ WT

++ < 2倍結合が増加した

+++ 約5倍結合が増加した

++++ 約10倍結合が増加した

+++++ 約40倍結合が増加した

【0190】

（実施例6 非ヒト霊長類においてA c t R I I B - h F cは赤血球生成を刺激する）

雄性および雌性のカニクイザルに、A c t R I I B（20～134）- h F c（I g G 1）を、1カ月間、週一回、皮下注射により投与した。48匹のカニクイザル（24匹／

性別)を、4つの処置群(6匹の動物/性別/群)のうちの1つに割り当て、そして、4週間にわたり、週一回(合計5用量)、ビヒクルまたは3mg/kg、10mg/kgもしくは30mg/kgのActRIIB-hFcのいずれかの皮下注射を施した。評価したパラメータには、一般的な臨床病理学(血液学、臨床化学、凝固および尿検査)を含めた。ActRIIB-hFcは、処置した動物において、15日目までに、平均の絶対的網状赤血球値の統計的に有意な上昇を引き起こした。36日目までに、ActRIIB-hFcは、平均絶対的網状赤血球および赤血球分布幅の値の上昇、ならびに、平均血球ヘモグロビン濃度の低下を含む、いくつかの血液学的変化を引き起こした。全ての処置群および両方の性別が影響を受けた。これらの作用は、骨髄からの未成熟な網状赤血球の放出に対するActRIIB-hFcの正の作用と一致している。この作用は、処置した動物から薬物を洗い出した後に逆転した(研究の56日目までに)。したがって、本発明者らは、ActRIIB-hFcが赤血球生成を刺激すると結論付ける。

10

## 【0191】

(実施例7 ActRIIB-mFcは、脾臓の赤血球生成活性の刺激により、マウスにおける赤血球生成の局面を促進する)

この試験では、骨髄および脾臓内の造血前駆細胞の頻度に対するActRIIB(20-134)-mFcのインビボ投与の効果を分析した。C57BL/6マウスの1群に、対照としてPBSを注射し、マウスの第2群に、10mg/kgのActRIIB-mFcを2用量投与し、両群を8日後に殺した。末梢血を使用して完全血球計算を行い、大腿および脾臓を使用してインビトロクローン原性アッセイを行って、各器官内のリンパ球前駆細胞、赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞の含量を査定した。この研究の短期間の枠では、処置したマウスにおいて赤血球、ヘモグロビンまたは白血球のレベルの有意な変化は見られなかった。大腿では、対照と処置群との間で、有核細胞数または前駆細胞含量に差異はなかった。脾臓では、化合物で処置した群は、皿当たりの成熟赤血球前駆細胞(CFU-E)コロニー数、脾臓当たりの頻度および全前駆細胞数で、統計学的に有意な増加を経験した。さらに、脾臓当たりの骨髄系前駆細胞(CFU-GM)、未成熟赤血球前駆細胞(BFU-E)の数および全前駆細胞数の増加を認めた。

20

## 【0192】

(動物)

6~8週齢の雌性C57BL/6マウス16匹を試験に使用した。マウス8匹について、1日目および3日目に10mg/kgの用量の試験化合物ActRIIB-mFcを皮下注射し、マウス8匹について、対照ビヒクルのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)をマウス当たり100μLの量で皮下注射した。全てのマウスを、最初の注射の8日後に、関連する動物の取り扱いに関するガイドライン(Animal Care Guidelines)に従って殺した。個々の動物からの末梢血(PB)試料を心臓穿刺によって採取し、完全血球計算および鑑別(CBC/Diff)に使用した。各マウスから大腿および脾臓を収集した。

30

## 【0193】

(行った試験)

(CBC/Diff計算)

心臓穿刺によって各マウスからPBを採取し、適切なマイクロティナ(microtainer)管内に置いた。試料を、CellDyn3500カウンターで分析するためにCLVに送った。

40

## 【0194】

(クローン原性アッセイ)

骨髄系列、赤血球系列およびリンパ球系列のクローン原性前駆細胞を、下記のインビトロのメチルセルロースベース培地系を使用して査定した。

## 【0195】

(成熟赤血球前駆細胞)

成熟赤血球系列のクローン原性前駆細胞(CFU-E)を、組換えヒト(rh)エリス

50

ロポイエチン（ $3\text{ U/mL}$ ）を含有するメチルセルロースベース培地 *MethoCult* TM 3334 中で培養した。

【0196】

（リンパ球前駆細胞）

リンパ球系列のクローン原性前駆細胞（*CFU-pre-B*）を、*rh* インターロイキン 7（ $10\text{ ng/mL}$ ）を含有するメチルセルロースベース培地 *MethoCult*（登録商標）3630 中で培養した。

【0197】

（骨髄系前駆細胞および未成熟赤血球前駆細胞）

顆粒球-単球系列のクローン原性前駆細胞（*CFU-GM*）、赤血球系列のクローン原性前駆細胞（*BFU-E*）および多分化能系列のクローン原性前駆細胞（*CFU-GEMM*）を、組換えマウス（*rm*）幹細胞因子（ $50\text{ ng/mL}$ ）、*rh* インターロイキン 6（ $10\text{ ng/mL}$ ）、*rm* インターロイキン 3（ $10\text{ ng/mL}$ ）および *rh* エリスロポイエチン（ $3\text{ U/mL}$ ）を含有するメチルセルロースベース培地 *MethoCult* TM 3434 中で培養した。

【0198】

（方法）

マウスの大腿および脾臓を、標準のプロトコルによって処理した。簡単に述べると、21ゲージの針および1ccの注射器を使用して2%のウシ胎仔血清を含有するイスコフ改変ダルベッコ培地（*Iscove's Modified Dulbecco's Media*）（*IMDM* 2% *FBS*）で大腿腔を洗い流すことによって骨髄を得た。 $70\text{ }\mu\text{M}$ のフィルターを通して脾臓をつぶし、そのフィルターを *IMDM* 2% *FBS* ですすぐことによって脾臓細胞を得た。次いで、*Neubauer* 計算チャンバーを使用して単一の細胞懸濁物について3%氷酢酸中での有核細胞の計算を行って、器官当たりの全細胞を算出することができるようにした。次いで、混入した赤血球を除去するために、全脾臓細胞を3倍量の塩化アンモニウム溶解緩衝液で希釈し、氷上で10分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、*IMDM* 2% *FBS* に再懸濁させ、第2の細胞計算を行って溶解後の細胞の細胞濃度を決定した。

【0199】

細胞ストックを作製し、各メチルセルロースベース培地の処方物に加えて、各培地処方物中の各組織について最適なプレーティング（*plating*）濃度を得た。骨髄細胞を、成熟赤血球前駆細胞を査定するために *MethoCult* TM 3334 中、皿当たり細胞  $1 \times 10^5$  個をプレーティングし、リンパ球前駆細胞を査定するために *MethoCult* TM 3630 中、皿当たり細胞  $2 \times 10^5$  個をプレーティングし、未成熟赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞を査定するために *MethoCult* TM 3434 中、皿当たり細胞  $3 \times 10^4$  個をプレーティングした。脾臓細胞を、成熟赤血球前駆細胞を査定するために *MethoCult* TM 3334 中、皿当たり細胞  $4 \times 10^5$  個をプレーティングし、リンパ球前駆細胞を査定するために *MethoCult* TM 3630 中、皿当たり細胞  $4 \times 10^5$  個をプレーティングし、未成熟赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞を査定するために *MethoCult* TM 3434 中、皿当たり細胞  $2 \times 10^5$  個をプレーティングした。3連の皿にプレーティングした培養物を、 $37^\circ\text{C}$ 、5% *CO*<sub>2</sub> で、訓練された職員によってコロニーの列挙および評価が行われるまでインキュベートした。成熟赤血球前駆細胞を2日間培養し、リンパ球前駆細胞を7日間培養し、成熟赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞を12日間培養した。

【0200】

（分析）

クローン原性アッセイの3連の培養物ならびに全データセットについての対照群および処置群について平均  $\pm$  1 標準偏差を計算した。

【0201】

各組織におけるコロニー形成細胞（*CFC*）の頻度を下記：

皿当たりのプレーティングされた細胞  
皿当たりのスコア化した平均 C F C  
の通り計算した。

【 0 2 0 2 】

大腿または脾臓当たりの全 C F C を下記：

スコア化された全 C F C × 大腿または脾臓当たりの有核細胞数（R B C 溶解の後）

培養された有核細胞の数

の通り計算した。

【 0 2 0 3 】

標準の t 検定を行って、P B S 対照マウスと化合物で処置したマウスとの間で、細胞または造血前駆細胞の平均数に差異があるかどうかを査定した。コロニーの列挙の潜在的な主観性のために、0.01未満の p 値を有意であるとみなす。各群についての平均値（+ / - S D）を下記の表に示す。

【 0 2 0 4 】

【表 6】

表：血液学的パラメータ

| 処置群                  | 白血球( $\times 10^9/L$ ) | 赤血球( $\times 10^9/L$ ) | ヘモグロビン<br>(g/L) | ヘマトクリット<br>(L/L) |
|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| PBS<br>(n=8)         | 9.53 +/- 1.44          | 10.5 +/- 1.1           | 160.9 +/- 13.3  | 0.552 +/- 0.057  |
| ActRIIB-mFc<br>(n=8) | 9.77 +/- 1.19          | 10.8 +/- 0.3           | 162.1 +/- 4.1   | 0.567 +/- 0.019  |

【 0 2 0 5 】

【表 7】

表：大腿骨および脾臓からの C F C

| 処置群                  | 大腿骨当たりの<br>全 CFC | 脾臓当たりの全<br>CFC | 大腿骨当たりの<br>全 CFU-E | 脾臓当たりの全<br>CFU-E |
|----------------------|------------------|----------------|--------------------|------------------|
| PBS<br>(n=8)         | 88 +/- 10        | 54 +/- 14      | 156 +/- 27         | 131 +/- 71       |
| ActRIIB-mFc<br>(n=8) | 85 +/- 9         | 79 +/- 6*      | 164 +/- 23         | 436 +/- 86*      |

\*予備分析は  $P < 0.05$  を示す。

【 0 2 0 6 】

A c t R I I B（20～134）-m F c を用いたマウスの処置は、この研究の短期間の枠では、赤血球またはヘモグロビンの含有量の有意な増加をもたらさなかった。しかし、前駆細胞含有量に対する作用は顕著であった。大腿では、対照と処置群間で、有核細胞数または前駆細胞含量に差異はなかった。脾臓では、化合物で処置した群は、赤血球溶解前の有核細胞数および皿当たりの成熟赤血球前駆細胞（C F U - E）コロニー数、脾臓当たりの頻度および全前駆細胞数に統計学的に有意な増加を経験した。さらに、骨髄系（C F U - G M）、未成熟赤血球（B F U - E）の数、および脾臓当たりの全前駆細胞数にも増加を認めた。したがって、より長期間の過程にわたって、A c t R I I B（20～134）-m F c 処置は、赤血球およびヘモグロビンの含有量の上昇をもたらし得ることを予想する。

【 0 2 0 7 】

（実施例 8 G D Fトラップは、インビボで赤血球レベルを増加させる）

12週齢の雄性 C 5 7 B L / 6 N T a c マウスを、2つの処置群のうちの1つに割り当てた（N = 10）。マウスに、ビククルまたは改変体 A c t R I I B ポリペプチド（「G D Fトラップ」）[A c t R I I B (L 7 9 D 20 ~ 134) - h F c] のいずれかを、4週間、週2回、10mg / kg を皮下注射（S C）により投薬した。研究の終了時に、全血を心臓穿刺により E D T A 含有管に採取し、H M 2 血液分析器（A b a x i s , I n c）を使用して細胞分布について分析した。

【0208】

【表 8】

群の指定

| 群 | N  | マウス     | 注射                                       | 用量<br>(mg/kg) | 経路 | 頻度   |
|---|----|---------|------------------------------------------|---------------|----|------|
| 1 | 10 | C57BL/6 | PBS                                      | 0             | SC | 2回/週 |
| 2 | 10 | C57BL/6 | GDFトラップ<br>[ActRIIB(L79D<br>20-134)-hFc] | 10            | SC | 2回/週 |

【0209】

G D Fトラップを用いた処置は、ビヒクル対照と比較して、白血球（W B C）の数への統計的に有意な作用を有さなかった。赤血球（R B C）数は、対照と比較して処置群において増加した（以下の表を参照のこと）。ヘモグロビン含有量（H G B）およびヘマトクリット（H C T）の両方も、追加の赤血球によって増加した。赤血球の平均幅（R D W c）は、処置した動物において高く、これは未成熟の赤血球プールの増加を示している。したがって、G D Fトラップを用いた処置は、白血球集団に対する識別できる作用を伴わずに、赤血球の増加をもたらす。

【0210】

【表 9】

血液学的な結果

|         | RBC<br>10 <sup>12</sup> /L | HGB<br>(g/dL) | HCT<br>(%)  | RDWc<br>(%)  |
|---------|----------------------------|---------------|-------------|--------------|
| PBS     | 10.7 ± 0.1                 | 14.8 ± 0.6    | 44.8 ± 0.4  | 17.0 ± 0.1   |
| GDFトラップ | 12.4 ± 0.4**               | 17.0 ± 0.7*   | 48.8 ± 1.8* | 18.4 ± 0.2** |

\*=p<0.05、\*\*= p<0.01

【0211】

（実施例 9 G D Fトラップは、インビボにおける赤血球レベル増加について A c t R I I B - F c よりも優れている）

19週齢の雄性 C 5 7 B L / 6 N T a c マウスを、3つの群のうちの1つに無作為に割り当てた。マウスに、ビヒクル（10mMのトリス緩衝生理食塩水、T B S）、野生型 A c t R I I B (20 ~ 134) - m F c、または G D Fトラップ A c t R I I B (L 7 9 D 20 ~ 134) - h F c を、3週間、週に2回、皮下注射により投薬した。ベースライン、および投薬の3週間後に、血液を頬出血で採取し、血液分析器（H M 2、A b a x

i s, Inc.) を使用して細胞分布について分析した。

#### 【0212】

A c t R I I B - F c または G D F トラップを用いた処置は、ビヒクル対照と比較して、白血球 (W B C) 数に対する有意な作用を有さなかった。赤血球含有量 (R B C)、ヘマトクリット (H C T)、およびヘモグロビンレベルは全て、対照または野生型構築物のいずれと比較しても、G D F トラップ処置マウスにおいて上昇した (以下の表を参照されたい)。したがって、直接比較では、G D F トラップは、野生型 A c t R I I B - F c タンパク質よりも有意に大きな程度まで赤血球の増加を促進する。実際に、この実験では、野生型 A c t R I I B - F c タンパク質は、赤血球の統計的に有意な増加を引き起こさず、これは、この作用を明らかにするためには、より長いか、または、より高い投薬が必要になることを示唆している。

10

#### 【0213】

##### 【表10】

投薬の3週間後の血液学的な結果

|                      | RBC<br>( $10^{12}/\text{ml}$ ) | HCT<br>%          | HGB<br>g/dL      |
|----------------------|--------------------------------|-------------------|------------------|
| TBS                  | 11.06 $\pm$ 0.46               | 46.78 $\pm$ 1.9   | 15.7 $\pm$ 0.7   |
| ActRIIB-mFc          | 11.64 $\pm$ 0.09               | 49.03 $\pm$ 0.3   | 16.5 $\pm$ 1.5   |
| GDFトラップ <sup>a</sup> | 13.19 $\pm$ 0.2**              | 53.04 $\pm$ 0.8** | 18.4 $\pm$ 0.3** |

\*\*= $p < 0.01$

20

#### 【0214】

(実施例10 切断された A c t R I I B 細胞外ドメインを用いた G D F トラップの作製)

実施例1に記載されるように、A c t R I I B (L 7 9 D 2 0 ~ 1 3 4) - h F c と呼ばれる G D F トラップを、T P A リーダーの、ロイシンからアスパラギン酸への置換 (配列番号1の残基79において) を含有する A c t R I I B 細胞外ドメイン (配列番号1の残基20~134) へのN末端融合、および最小限のリンカー (3つのグリシン残基) を用いたヒト F c ドメインのC末端融合により作製した (図3)。この融合タンパク質に対応するヌクレオチド配列を図4に示す。

30

#### 【0215】

A c t R I I B (L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1) - h F c と呼ばれる、切断された A c t R I I B 細胞外ドメインを持つ G D F トラップを、T P A リーダーの、ロイシンからアスパラギン酸への置換 (配列番号1の残基79において) を含有する切断された細胞外ドメイン (配列番号1の残基25~131) へのN末端融合、および最小限のリンカー (3つのグリシン残基) を用いたヒト F c ドメインのC末端融合により作製した (図5)。この融合タンパク質に対応するヌクレオチド配列を図6に示す。

40

#### 【0216】

(実施例11 二重に切断された A c t R I I B 細胞外ドメインを持つ G D F トラップによる選択的なリガンド結合)

G D F トラップおよび他の A c t R I I B - h F c タンパク質の、いくつかのリガンドに対する親和性を、B i a c o r e <sup>TM</sup> 機器を用いてインビトロで評価した。結果を以下の表に要約する。k<sub>on</sub> および k<sub>off</sub> の正確な決定を妨害した、複合体の非常に急速な会合と解離のため定常状態親和性フィットにより K<sub>d</sub> 値を得た。

#### 【0217】

50

【表 11】

ActRIIB-hFc 変体のリガンド選択性：

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

10

## 【0218】

切断された細胞外ドメインを持つGDFトラップ、ActRIIB(L79D 25～131)-hFcは、L79D置換を欠くActRIIB-hFc対応物と比較してアクチビンAおよびアクチビンBの結合の明白な損失ならびにGDF11の結合のほぼ完全な保持を伴って、より長い変体であるActRIIB(L79D 20～134)-hFcによって示されるリガンド選択性に匹敵したか、またはそれに勝った。切断単独(L79D置換なし)では、本明細書中に示されるリガンド間の選択性は変更されなかったことに注目されたい[ActRIIB(L79 25～131)-hFcとActRIIB(L79 20～134)-hFcを比較]。

20

## 【0219】

(実施例12 代替のヌクレオチド配列を用いたActRIIB(L79D 25～131)-hFcの作製)

ActRIIB(L79D 25～131)-hFcを作製するために、ネイティブな79位(配列番号1)においてアスパラギン酸置換を持ち、N末端およびC末端の切断を伴うヒトActRIIB細胞外ドメイン(配列番号1の残基25～131)を、ネイティブなActRIIBリーダーではなくTPAリーダー配列とN末端融合させ、最小限のリンカー(3つのグリシン残基)を介してヒトFcドメインとC末端融合させた(図5)。この融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の1つを図6(配列番号27)に示し、正確に同じ融合タンパク質をコードする代替のヌクレオチド配列を図9(配列番号30)に示す。このタンパク質を、実施例1に記載される方法体系を使用して発現させおよび精製した。

30

## 【0220】

(実施例13 切断されたActRIIB細胞外ドメインを持つGDFトラップはマウスにおいて赤血球前駆体の増殖を増加させる)

ActRIIB(L79D 25～131)-hFcを、赤血球前駆体の増殖に対するその作用を決定するために評価した。雄性のC57BL/6マウス(8週齢)を、1日目および4日目に、ActRIIB(L79D 25～131)-hFc(10mg/kg、s.c.; n=6)またはジビクル(TBS; n=6)で処置し、次いで8日目に、脾臓、脛骨、大腿骨、および血液を採取するために安楽死させた。脾臓および骨髓の細胞を単離し、5%ウシ胎仔血清を含有するイスコフ改変ダルベッコ培地中に希釈し、特殊化メチルセルロースベース培地に懸濁させ、2日間または12日間培養して、コロニー形成単位-赤血球(CFU-E)段階およびバースト形成単位-赤血球(BFU-E)段階で、それぞれ、クローン原性の前駆体のレベルを評価した。BFU-Eの決定用のメチルセルロースベース培地(MethoCult M3434、Stem Cell Technologies)には、CFU-Eの決定用のメチルセルロース培地(MethoCult M3334、Stem Cell Technologies)には存在しない組換えのマウス幹細胞因子、インターロイキン3、およびインターロイキン6を含めたが、どちらの培地も、他の構成成分の中でエリスロポエチンを含有した。BFU-EおよびCFU-E

40

50

の両方について、各組織試料から誘導された2連の培養プレートにおいてコロニーの数を決定し、結果の統計分析は処置群当たりのマウスの数に基づいた。

#### 【0221】

A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c で処置したマウスからの脾臓由来培養物は、C F U - E コロニーの数が対照マウスからの対応する培養物の2倍であったが (  $P < 0.05$  )、一方、B F U - E コロニーの数はインビボの処置で有意に差異がなかった。骨髓培養物からのC F U - E またはB F U - E のコロニーの数も処置によって有意に異ならなかった。予想通りに、脾臓由来培養物におけるC F U - E コロニーの数の増加は、安楽死時に、対照と比較してA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c で処置したマウスにおける赤血球レベル ( 1 1 . 6 % 増加 )、ヘモグロビン濃度 ( 1 2 % 増加 )、およびヘマトクリットレベル ( 1 1 . 6 % 増加 ) の非常に有意な (  $P < 0.001$  ) 変化を伴った。これらの結果は、切断されたA c t R I I B 細胞外ドメインを持つG D F トラップのインビボ投与が、赤血球レベルの増加に対するその全体的な作用の一部として、赤血球前駆体の増殖を刺激し得ることを示している。

10

#### 【0222】

(実施例14 切断されたA c t R I I B 細胞外ドメインを持つG D F トラップは、マウスにおける化学療法誘発性貧血を相殺する)

出願人は、微小管重合を遮断することによって細胞分裂を阻害するパクリタキセルに基づく化学療法誘発性貧血のマウスモデルにおいて、赤血球生成のパラメータに対するA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c の作用を調査した。雄性のC 5 7 B L / 6 マウス ( 8 週齢 ) を4つの処置のうちの1つに割り当てた：

20

- 1) パクリタキセル ( 2 5 m g / k g、i . p . )
- 2) A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c ( 1 0 m g / k g、i . p . )
- 3) パクリタキセル + A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c
- 4) ビヒクル ( T B S )。

#### 【0223】

パクリタキセルは0日目に投与したが、一方、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c またはビヒクルは0日目および3日目に投与した。C B C 分析のために、1日目、3日目、および5日目に別々のコホートから血液試料を採取し、処置群1~3 ( 上記 ) についての結果を、所与の時点におけるビヒクルからの差異の割合として表した。パクリタキセルのみのコホートで、3日目におけるパクリタキセルの毒性による消耗が問題であった (  $n = 1$  ) ; その他の場合は、時点当たり、処置当たり  $n = 3 \sim 5$ 。ビヒクルと比較して、パクリタキセル単独では、5日目においてヘモグロビン濃度がほぼ13%減少したが、一方、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c の添加は、このパクリタキセルに誘発された減少を妨げた ( 図11 )。ヘマトクリットおよびR B C レベルについても同様の作用を観察した。パクリタキセルの非存在下では、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c は、3日目および5日目において、ヘモグロビン濃度をビヒクルと比較して10%増加させた ( 図11 )。したがって、切断されたA c t R I I B 細胞外ドメインを持つG D F トラップは、化学療法誘発性貧血を相殺するために十分に赤血球レベルを増加させ得る。

30

40

#### 【0224】

(実施例15 切断されたA c t R I I B 細胞外ドメインを持つG D F トラップは、マウスにおける腎摘出誘発性貧血を逆転させる)

出願人は、腎摘出された慢性腎疾患マウスモデルにおける貧血に対するA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c の作用を調査した。雄性のC 5 7 B L / 6 マウス ( 1 1 週齢 ) について、偽手術またはエリスロポエチン生成能を低下させるための片側腎摘出のいずれかを行った。手術後回復のためにマウスに1週間与え、次いでA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c ( 1 0 m g / k g、i . p . ; 条件当たり  $n = 15$  ) またはビヒクル ( T B S ; 条件当たり  $n = 15$  ) で週2回、全部で4週間処置した。投薬開始前および処置の4週間後に血液試料を採取した。ビヒクルで処置した腎摘出された

50

マウスは、4週間の処置期間にわたって赤血球数の有意な減少を示したが、一方、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c を用いた処置では、腎臓のエリスロポエチン生成能が低下したにもかかわらず、赤血球細胞レベルの減少を妨げただけでなく、ベースライン上に17%増加させた ( $P < 0.001$ ) (図12)。腎摘出されたマウスにおいて、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c は、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリットレベルにおいてもベースラインからの有意な増加を生じ、そして、注目すべきことに、これらの赤血球生成のパラメータそれぞれを、腎摘出された条件下で、偽手術の条件下とほぼ同程度まで刺激した (図13)。したがって、切断されたA c t R I I B細胞外ドメインを持つG D Fトラップは、慢性腎疾患モデルにおいて貧血を逆転させるために十分に赤血球レベルを増加させ得る。

#### 【0225】

(実施例16 切断されたA c t R I I B細胞外ドメインを持つG D Fトラップは、ラットにおける、失血によって誘発される貧血からの回復を改善する)

出願人は、急性失血によって誘発される貧血 (急性出血後貧血) のラットモデルにおいて赤血球生成のパラメータに対するA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c の作用を調査した。雄性のS p r a g u e - D a w l e yラット (およそ300g) に、供給メーカー (H a r l a n) において長期にわたる頸静脈カテーテルを受けさせた。-1日目に、各ラットから、イソフルラン麻酔下でカテーテルを介して5分間にわたって全血液量の20%を抜き取った。除去した血液量は、L e e および共同研究者 (J N u c l M e d 25巻: 72~76頁、1985年) によって、120gを超える体重のラットに対して導かれた以下の関係:

全血液量 (ml) =  $0.062 \times \text{体重 (g)} + 0.0012$   
に従って計算された全血液量についての値に基づいた。

#### 【0226】

血液除去の時点で、カテーテルを介して等量のリン酸緩衝生理食塩水で置換した。0日目および3日目に、ラットをA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c (10 mg/kg, s.c.; n=5) またはビヒクル (T B S; n=5) で処置した。-1日目 (ベースライン)、0日目、2日目、4日目、および6日目に、C B C分析のための血液試料を、カテーテルを介して取り出した。

#### 【0227】

対照のラットは、0日目までに、赤血球レベルのほぼ15%の落下を伴い、20%の失血に対して応答した。これらのレベルは、2日目および4日目においてベースラインよりも有意に低いままであり、6日目までに十分に回復しなかった (図14)。A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c で処置したラットは、20%の失血後にほぼ同一の赤血球レベルの低下を示したが、これらのラットは、その後2日目までにそのようなレベルにおける完全な回復、続いて4日目および6日目にさらなる上昇を示し、これは、対応する時点における、対照レベルを超える非常に有意な改善を示している (図14)。ヘモグロビン濃度についても同様の結果を得た。これらの知見は、切断されたA c t R I I B細胞外ドメインを持つG D Fトラップが、急性出血によって引き起こされる貧血からの赤血球レベルの急速な回復をもたらすことを実証している。

#### 【0228】

(実施例17 切断されたA c t R I I B細胞外ドメインを持つG D Fトラップは、非ヒト霊長類における赤血球レベルを増加させる)

2つのG D Fトラップ、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 0 ~ 1 3 4 ) - h F c およびA c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c を、カニクイザルにおける赤血球生成を刺激するそれらの能力について評価した。サルを、1日目および8日目にG D Fトラップ (10 mg/kg; n=雄性4/雌性4)、またはビヒクル (n=雄性2/雌性2) で皮下に処置した。1日目 (前処置ベースライン)、3日目、8日目、15日目、29日目、および44日目に血液試料を採取し、赤血球レベル (図15)、ヘマトクリット (図16)、ヘモグロビンレベル (図17)、および網状赤血球レベル (図18) について分析

した。ビククルで処置したサルは、処置後の全ての時点で、繰り返しの血液試料採取の予想された影響である、赤血球、ヘマトクリット、およびヘモグロビンのレベルの低下を示した。対照的に、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 0 ~ 1 3 4 ) - h F c または A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c を用いた処置では、最初の処置後の時点（3日目）までにこれらのパラメータが増加し、この研究の継続期間中、実質的に上昇したレベルを持続した（図15～17）。重要なことに、A c t R I I B ( L 7 9 D 2 0 ~ 1 3 4 ) - h F c または A c t R I I B ( L 7 9 D 2 5 ~ 1 3 1 ) - h F c で処置したサルにおける網状赤血球レベルは、8日目、15日目、および29日目において、ビククルと比較して実質的に増加した（図18）。この結果は、G D F トラップの処置が、赤血球前駆体の生成を増加させ、赤血球レベルの上昇をもたらすことを実証している。

10

【0229】

総合すると、これらのデータは、切断されたG D F トラップ、ならびに完全長改変体を、G D F 1 1 の選択的アンタゴニストとして、およびインビボにおける赤血球形成を増加させるための潜在的な関連リガンドとして使用し得ることを実証している。

【0230】

（実施例18 A c t R I I B 5 から誘導されたG D F トラップ）

A c t I I B 膜貫通ドメインを含むエクソン4が異なるC末端配列で置き換わった、代替の、可溶性の形態のA c t R I I B ( A c t R I I B 5 と呼ばれる ) が報告された ( W O 2 0 0 7 / 0 5 3 7 7 5 ) 。

【0231】

リーダーを持たないネイティブなヒトA c t R I I B 5 の配列は以下の通りである。

【0232】

【化18】

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHE
```

(配列番号 36)

20

【0233】

ロイシンからアスパラギン酸への置換、または他の酸性の置換を、以下の配列を有する改変体A c t R I I B 5 ( L 7 9 D ) を構築するために、記載のようにネイティブな79位（下線を付して強調）において行い得る。

【0234】

【化19】

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHE
```

(配列番号 37)

30

【0235】

この改変体を、以下の配列を持つヒトA c t R I I B 5 ( L 7 9 D ) - h F c 融合タンパク質を作製するために、T G G G リンカーを用いてヒトF c に連結し得る。

【0236】

40

50

## 【化 2 0】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 38)

10

## 【0 2 3 7】

この構築物をCHO細胞において発現させ得る。

## 【0 2 3 8】

(参考としての援用)

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

## 【0 2 3 9】

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

20

30

40

50

## 【図面】

## 【図 1】

ActRIIa ILGRSETQEC IEFNANWEKD RTNQTGVKPC YGDKDKRRHC RATWKNISGS  
 ActRIIb GRGEAETREC IYNNANWELE RTNQSGLERC EGEODKRLHC YASWNNSSGT

IEIVHQGCWL DDINCYLRTD CVEKKDSPEV YFCCEGNNMC NEKFSYFPEN  
 IELVHKGCWL DDFNCYTRQE CVATEENPQV YFCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNFV TPKPPT  
 GGPEVTYEPPT PTAPT

FIGURE 1

## 【図 2】

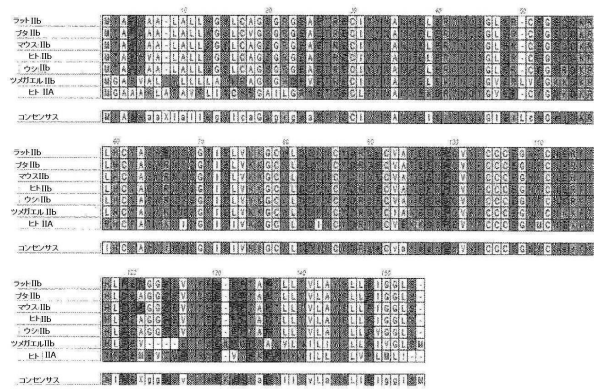


FIGURE 2

## 【図 3】

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYNA NWELERTNQS  
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE  
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPTAPT GGGHTHTCPPC  
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV  
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
 301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH  
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

FIGURE 3

## 【図 4 - 1】

1 ATGGATGCAA TCAAGAGAGG GCTCTGCTGT CTGCTGCTGG TGGTGGAGG  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACC ACACACTCG  
 51 AGTCTGGGT TCGCGGGGGG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG  
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCCG GGAGACCCCG ACCCTCCGA CTCTGTGCC  
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TCGAGCGCAG CAACCAAGG  
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCCTG ACCTCGGGTG GTTGCTCTCG  
 151 GCGCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC  
 CGGAGCTTCG CGAGCCTTCC GCTGCTCTCG TTGCGGAGC TGACGATGCG  
 201 CTCTGCGGCG AACAGCTCTG GCACCATCSA GCTGCTGAAG AAGGGCTGCT  
 GAGGACCCCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTG TTCCCGACGA  
 251 GGGATGATGA CTTCAACTCC TACGATAGCC AGGAGTGTGT GGCACCTGAG  
 CCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCTCACACA CCGTGACTC  
 301 GAGAACCCCG AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCIGCAACGA  
 CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTGCA AGACGTTGCT  
 351 CGGCTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CGGGAAGT ACSTACGAGC  
 CGGGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCG GGGCTTCAG TGCATGCTCG  
 401 CAGCCCGGAC AGCCCGGACC GGTGGTGGAA CTCACAGATG CCCACCGTGC  
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACTT GAGTGTATC GGTGGGACG  
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAAA  
 GGTCTGTGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT  
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTC ACATGCTGTG  
 TGGGTTCTCT TGGGAGTACT AGAGGGGCTG GGCACCTCAG TGTACGCACC  
 551 TGGTGACGCT GAGCCACGAA GACCCGTGAG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
 AOCACCTGCA CTCGCTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAGTT GACCATGCAC  
 601 GAGCGGCTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGACGAGTA  
 CTGCGCGACC TCCACGATT TCGGTCTCTG TCGGCGGCC TCTGCTCAT  
 651 CAACAGCAGC TACCGTGTGG TCAGCCTCCT CACCGTCTG CACCAAGGACT  
 GTTCTGTGTC ATGGCACACC AGTTCGAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTCTG  
 701 GGTGAAATGG CAAGGAGTAC AAGTCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
 CGGACTTACC GTTCTCATG TTCACCTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT  
 751 GCGCCCATCG AGAAAAACAT CTCGAAAGCC AAGGCGGAGC CGGAGAGACC  
 CGGGGGTAGC TCTTTGGTGA GAGGTTTGGG TTTCCGCTCG CCGCTCTTGG

FIGURE 4

10

20

30

40

50

## 【図 4 - 2】

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACAGG  
TGTCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG  
AGTCGGACTG GACCGACGAG TTTCGAAGA TAGGGTGGCT GTAGCGGCAG

901 GACTGGGAGA GCAATGGGCA GCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCTCC  
CTCACCTCT CGTTACCCGT CGGCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTCTTCTCT CTATAGCAAG CTCACGTTG  
GCACGACTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTCCGAGCAG GCGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
TGTTCTCGTC CACCGTCCGT CCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGTCTGCG ACACCACTA CACGAGAAAG AGCTCTCCCT TGTCCCGGG  
CTCCGAGACG TGTTGTTGAT GTGCTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGCGGCC

1101 TAAATGA (配列番号 25)  
ATTACT (配列番号 33)

FIGURE 4 続き

## 【図 5】

1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGAETREC IYNNANWELE RTNOSGLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPLEKTLIS

251 KAKGPREFQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTTFPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSCV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (配列番号 26)

FIGURE 5

## 【図 6 - 1】

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTCT GTCGTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTAGCTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGAGC ACACACCTGG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CGGCTGAGAC ACGGAGCTGC ATCTACTACA  
TCAGAAGCAA ACGGGGCGCG GCGACTCTG TGGCTCAGC TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
ACGCCAAGTG GGAGCTGGAG CGCAACCAACC AGAGCGGCTT GGAGCGCTGC  
TGGGTTGAC CCTCGACTTC GGTGCTTGG TCTCGGCGGA CTTCGGGAGG

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCTCTCT GCGCAACAGC  
CTTCGGCTCG TCCTGTTCCG CGACTCAGC ATGCGGAGGA CCGGTTGTC

201 S G T I E L V K K G C W D D D F  
CTCTGGGACC ATGAGCTTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA  
GAGACCTGG TAGCTCGAGC ACTTCTCTCC GACGACCTG CTACTGAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG  
TGACGATGCT ATCCGCTCTC ACACACCGGT GACTCTCTTT GGGGGTCCAG

301 Y F C C C E G N E C N E R F T H L  
TACTTCTGCT CTTGTGAAGG CAATCTCTGC AACGAGGCT TCATCATTT  
ATGAAGACGA CGACCTTCC GTTGAAGAGG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T  
GCCAGAGGCT GGGGGGCGCG AAGTCACGTA CCACCCACCC CCGCAGGTG  
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCG TTCAGTGCAT GGTGGTGGG GGTGTTCCAC

401 GTGGAATCA CACATGCCCA CCGTGGCAG CACCTCAACT CTTGGGGGA  
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GGTGTGTGT GACGTGAGC CACGAAGACC  
GGCTTGGGA CTCCAGTGT CACACACCA CTTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTCAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGAGC GGTGGAGGT GCATAATGCC  
GACTCAGTT CAAGTTGACC ATGCACTTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

FIGURE 6

## 【図 6 - 2】

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCACTACAAC AGCACGTACC CTCTGGTCAG  
TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCCTGCATGG CACACCAGTC

651 CTTCTTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGCCAAG GAGTACAAGT  
GCACGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGCTCT CAACAAAGCC CTCCAGGCCC CCATCGACAA AACCATCTCC  
CGTCCAGAG GTTGTTCGCG CAGGCTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTAGACCC TGCCCCCATC  
TTTCGGTTTC CCGTCGGGCG TCTTGGTTC CACATGTGG ACSSGGGCTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTCACCTGC CTGGTCAAAG  
GGCCCTCCTC TACTGTTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGAGC GACCACTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCGGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCGAGCC  
CGAAGATAGG GTGCGTGTAG CGGACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAT ACAAGACCAC GCCTCCGCTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
CTCTTGTGTA GTTCTGTGTC CGGAGGGGAC GACCTGAGGC TGCCGAGCAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCACCC GTCGTCCCTT

1001 ACCTCTTCTC ATGCTCCGTC ATCATGAGC CTCTGCACAA CCACTACAGC  
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACCTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGACCC TCTCCCTGTC CCGGGGTAAA TGA (配列番号 27)  
GTCTCTCTCG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (配列番号 34)

FIGURE 6 続き

10

20

30

40

50

【図 7】

```

1   ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51  KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVVFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPKPKDTLM ISRTPVTCV
151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFPLYSKLTV
301 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLK LSPGK (配列番号 28)

```

FIGURE 7

【図 8】

```

1   ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51  KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVVFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPT (配列番号 29)

```

FIGURE 8

10

【図 9 - 1】

```

1   AYGGATGCAA TCRAGAGAGG GTCCTCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGAGGACA CAGGAGGAGC AACAACCTCG
51  AGTCCTCGTT TCGCCCGGCG CGCGCGAAGC CCGCGAATGT ATTATTTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT
101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
   ATGCTAATTS GGAAGTCGAA CGGACGAACC AATCGGGGCT CGAACGGTGT
   TACGATTAC CTTTGAAGCT GCGTCTTGG TTAGGCGCGA GCTTGCCACA
151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
   GAGGGGAGAC AGGATAAAGC CTTCATTCG TATGCTCTGT GGAGAACCTC
   CTCCCCCTTG TCTTATTTGC GGAGGTAACG ATACGAGCA CTTCTTTGAG
201 S G T I E L V K K G C W D D D F
   CTCCGGGAGC ATTGAATCG TCAGAGAGCG GTGCTGGGAC GAGGATTCA
   GAGGCGCTGC TAACTTGACC AGTTCCTTCC CAGGACCTCS CTGCTAAAGT
251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
   ATTGTTATGA CCGCGAGGAA TGTGTGCGCA CCGAGAGGAA TCCGCGGTC
   TAAACAATCT GCGGCTCCTT ACACAGCGCT GGCCTCTCTT AGCGCTCCAG
301 Y F C C C E G M F C N E R F T H L
   TATTTCTGTT GTTGGGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
   ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTAATTGCCA AATGGGTGGA
351 P E A G G P E V T Y H P P P T
   CCCCGAGGC GCGGGGCGCG AGTGAAGCTA TGAACCGCCG CCAACCGGTG
   GGGCTTCGCG CCGCGGCGCG TCACTTGAT ACTTGGGGG GGTGGCCAC
401 GTGGAACTCA CACAAGCCCA CGGTGCGGAG CACCTGAAT COTGGGGGGA
   CAGCTTGACT GTTACGGCT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GAACCCCTT
451 CCGTCACTCT TCTCTTCCC CCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG
501 CCGACCCCT GAGGTACAT GCGTGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGGCC
   GGCTGGGGA CTCAGTGTA CAGACCAACA CTTGCACTCG GTGCTCTCG
551 CTAGSTCAR GTTCACTGG TACGTGGAGC GCGTGAAGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT GAAGTTGACC ATGCACTGCG GGCACCTCCA CGTATACGG
601 AAGACAAAGC CCGGGGAGGA GAGTACAAC AGCAGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTCG GCGGCTTCTT CTTGATGTTG TCGTGCATGG CACACCATG
651 CGTCTCAACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGSCAAG GAGTACAGT
   GCAGGAGTGG CAGGAGSTGG TCGTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTGCA

```

FIGURE 9

【図 9 - 2】

```

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCOCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCC AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
   TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG
801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
   GGCCCTCCTC TACTGCTTCT TGGTCCAGTC GGAAGAGCAA TCGGAGCCG
851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCGGTGGAGT GGGAGAGCAA TCGGAGCCG
   CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGCACCTCA CCTCTCTGTT ACCCGTCGGC
901 GACAACAAC AACAAGACC GCGTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
   CTCTTGTGA TGTCTGGTG CCGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCGGAGGAA
951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
   GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCTCCCTT
1001 ACGTCTCTTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
   TGCGAAGAGG TACGAGGCAC TACTTACTCC GAGAGCTGTT GGTATGTGCT
1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGGTAAA TGA (配列番号 30)
   GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GCGCCCATTT ACT (配列番号 35)

```

FIGURE 9 続き

20

30

40

50

【図 10】

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATG GGAACCTGAA CCGACGAACC  
AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CUTCATTGC TATGCGTCGT  
GGAGGAACTC CTCGGGACG ATTGAACCTG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTICA  
ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT  
GTTCCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCAGAGCC GCGGGGCCCG  
AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACC (配列番号 31)

FIGURE 10

【図 11】

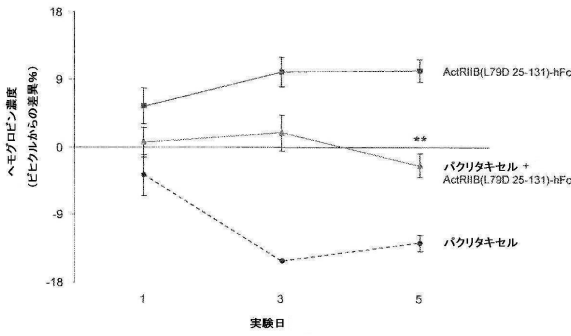


FIGURE 11

【図 12】

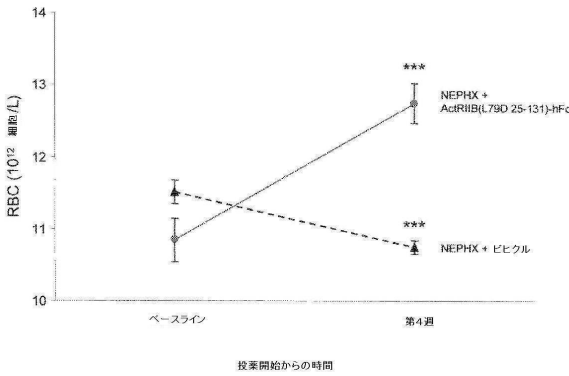


FIGURE 12

【図 13】

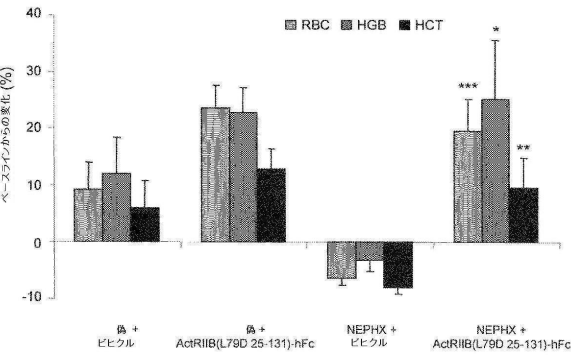


FIGURE 13

10

20

30

40

50

【図 1 4】

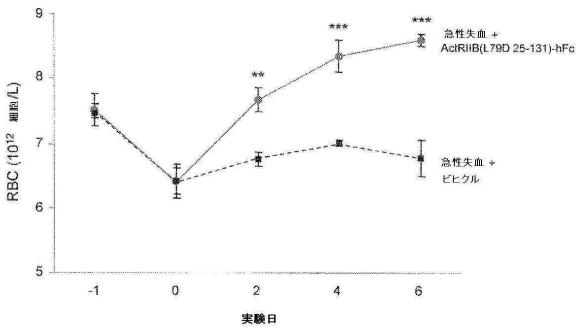


FIGURE 14

【図 1 5】

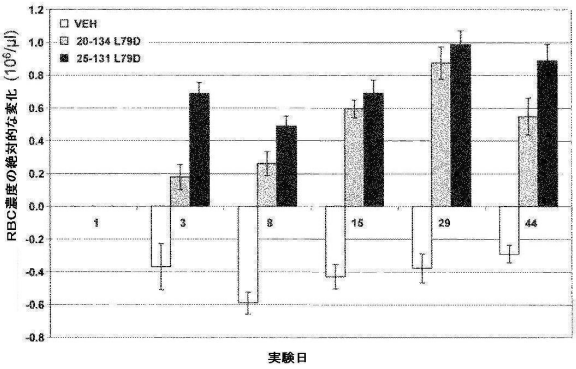


FIGURE 15

【図 1 6】

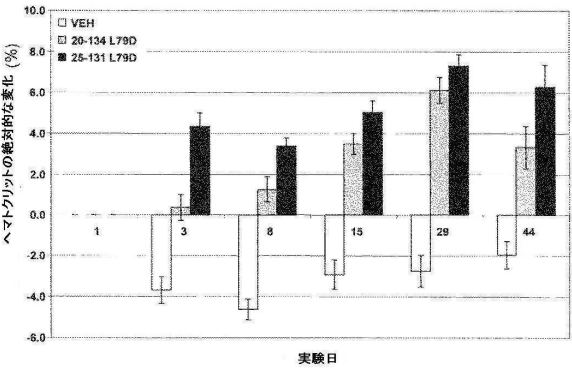


FIGURE 16

【図 1 7】

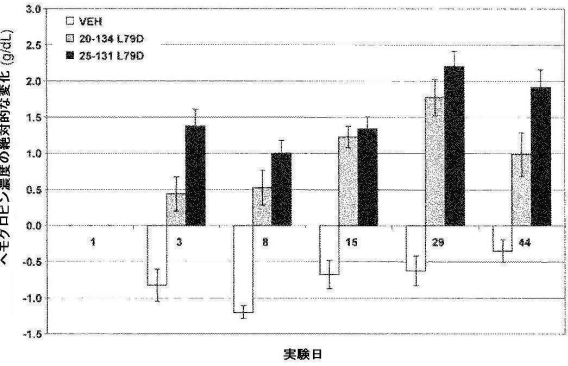


FIGURE 17

10

20

30

40

50

【図 18】

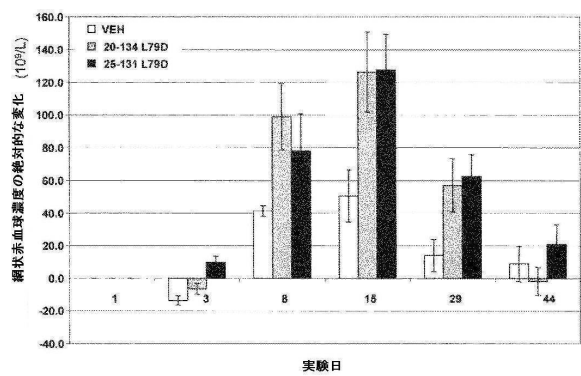


FIGURE 18

【配列表】

0007329573000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 0 7 K 19/00 (2006.01)  
C 1 2 N 15/62 (2006.01)

## F I

C 0 7 K 19/00  
C 1 2 N 15/62 Z

- 弁理士 安藤 健司  
(74)代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦  
(74)代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵  
(74)代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐  
(74)代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一  
(74)代理人 100160255  
弁理士 市川 祐輔  
(74)代理人 100172683  
弁理士 綾 聡平  
(74)代理人 100219265  
弁理士 鈴木 崇大  
(74)代理人 100203208  
弁理士 小笠原 洋平  
(74)代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和  
(74)代理人 100127812  
弁理士 城山 康文  
(72)発明者 ジャスパー シーラ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421-6818, レキシントン, リンカーン テラス 3  
(72)発明者 ロバート スコット ピアソール  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01801, ウォバーン, バード ストリート 21  
(72)発明者 ラビンドラ クマール  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, アーリントン ストリート 421  
審査官 池上 文緒  
(56)参考文献 国際公開第2006/012627 (WO, A1)  
国際公開第2008/097541 (WO, A1)  
国際公開第2007/053775 (WO, A1)  
国際公開第2008/076437 (WO, A1)  
Molecular Human Reproduction, 2007年, Vol.13, No.9, p.675-683  
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 8 / 1 7  
C 0 7 K 1 4 / 7 0 5  
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)  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
U n i P r o t / G e n e S e q