

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-533191

(P2017-533191A)

(43) 公表日 平成29年11月9日(2017.11.9)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 04 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	4 B 06 3
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	4 C 07 6
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	4 C 08 4
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 H 04 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 230 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-518975 (P2017-518975)	(71) 出願人	509307635 セルジーン コーポレイション アメリカ合衆国 ニュージャージー 07 901, サミット, モ里斯 アベニュー 86
(86) (22) 出願日	平成27年10月8日 (2015.10.8)	(71) 出願人	597025806 ワシントン・ユニバーシティ Washington University
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月5日 (2017.6.5)	(71) 出願人	アメリカ合衆国 63130 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/054674	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(87) 國際公開番号	W02016/069234		
(87) 國際公開日	平成28年5月6日 (2016.5.6)		
(31) 優先権主張番号	62/103,515		
(32) 優先日	平成27年1月14日 (2015.1.14)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/062,021		
(32) 優先日	平成26年10月9日 (2014.10.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/167,052		
(32) 優先日	平成27年5月27日 (2015.5.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ActRIIリガンドトラップを用いた心血管疾患の治療

## (57) 【要約】

本明細書に提供されるのは、バイオマーカー、特に、snai1ホモログ1(Snai1)、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、dickkopfホモログ1(Dkk1)、コラーゲン1型1(Col1a1)、アクチビン(すなわち、遊離アクチビン)、runt関連転写因子2(Runx2)、アルカリホスファターゼ(ALP)、骨特異的アルカリホスファターゼ(BSAP)、C末端1型コラーゲンテロペプチド(CTX)、osterix、Klotho、-平滑筋アクチン(-SMA)、ミオカルディン(JVIYOCD)、アクチビン受容体2A型(ActRIIA)、軸阻害タンパク質2(Axin2)、及び/又は平滑筋タンパク質22-(Sm22-)のレベルを、治療に対する対象の応答性、治療の効力、又はアクチビンII型受容体シグナル伝達インヒビターによる治療のための適切な投薬量の指標として用いることにより、対象における血管石灰化及び/もしくは心血管疾患と関連する疾患並びに/又は骨吸収を治療する方法である。

【選択図】図4 A

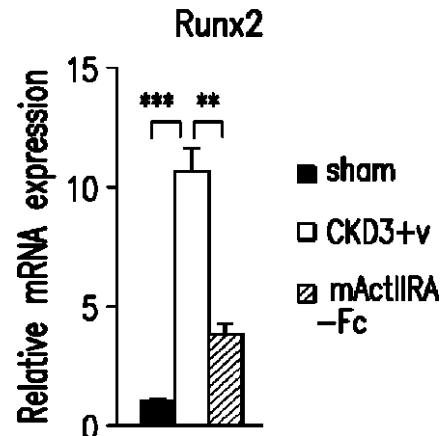


FIG. 4A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

(a) 参照集団におけるrunt関連転写因子2(Runx2)のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル；

(b) 参照集団におけるアルカリホスファターゼ(AIp)のレベルと比較して上昇したAIPのレベル；

(c) 参照集団におけるsnailホモログ1(Snai1)のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル；

(d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル；

(e) 参照集団におけるdickkopfホモログ1(Dkk1)のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル；

(f) 参照集団におけるコラーゲン1型 1(Col1a1)のレベルと比較して上昇したCol1a1のレベル；

(g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル；

(h) 参照集団における骨特異的アルカリホスファターゼ(BSAP)のレベルと比較して上昇したBSAPのレベル；

(i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル；

(j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル；

(k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル；

(l) 参照集団における 平滑筋アクチン(-SMA)のレベルと比較して減少した -SMAのレベル；

(m) 参照集団におけるミオカルディン(MYOCD)のレベルと比較して減少したMYOCDのレベル；

(n) 参照集団における平滑筋タンパク質22- (Sm22-) のレベルと比較して減少したSm22- のレベル

(o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル；

(p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル；

及び/又は  
(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベル  
を有する、前記方法。

## 【請求項 2】

対象における血管石灰化を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

(a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル；

(b) 参照集団におけるAIPのレベルと比較して上昇したAIPのレベル；

(c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル；

(d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル；

(e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル；

(f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル；

(g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル；

(h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル；

(i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル；

(j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル；

(k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル；

(l) 参照集団における -SMAのレベルと比較して減少した -SMAのレベル；

(m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル；

10

20

30

40

50

- (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;
- (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;
- (p) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル; 及び/又は

(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベル  
を有する、前記方法。

#### 【請求項3】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル; 10
- (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;
- (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;
- (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;
- (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;
- (f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;
- (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル;
- (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;
- (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;
- (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;
- (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;
- (l) 参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;
- (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル; 及び/又は
- (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;
- (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル
- (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;

及び/又は

(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベル;  
を有し、該心血管疾患が、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する、前記方法。

#### 【請求項4】

対象における高いレベルの動脈壁硬化を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;
- (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;
- (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;
- (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;
- (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;
- (f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;
- (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル;
- (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;
- (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;
- (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;
- (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;
- (l) 参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;
- (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル; 及び/又は
- (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;
- (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;
- (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;

及び/又は

30

40

50

(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有する、前記方法。

**【請求項 5】**

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル；
- (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル；
- (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル；
- (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル；
- (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル；
- (f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル；
- (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル；
- (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル；
- (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル；
- (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル；
- (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル；
- (l) 参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル；
- (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル；及び/又は
- (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル；
- (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル；
- (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル；

及び/又は

(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有し、該心血管疾患が、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因する、前記方法。

**【請求項 6】**

対象における左心室肥大(LVH)を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル；
- (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル；
- (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル；
- (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル；
- (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル；
- (f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル；
- (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル；
- (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル；
- (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル；
- (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル；
- (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル；
- (l) 参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル；
- (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル；及び/又は
- (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル；
- (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル；
- (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル；

及び/又は

(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有する、前記方法。

**【請求項 7】**

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

10

20

30

40

50

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;
  - (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;
  - (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;
  - (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;
  - (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;
  - (f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;
  - (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル;
  - (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;
  - (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;
  - (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;
  - (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;
  - (l) 参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;
  - (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル; 及び/又は
  - (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;
  - (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;
  - (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;
- 及び/又は
- (q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベル;
- を有し、該心血管疾患が、左心室肥大と関連し及び/又は左心室肥大に起因する、前記方法。

10

20

30

40

#### 【請求項 8】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;
  - (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;
  - (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;
  - (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;
  - (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;
  - (f) 参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;
  - (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル;
  - (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;
  - (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;
  - (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;
  - (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;
  - (l) 参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;
  - (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル; 及び/又は
  - (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;
  - (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;
  - (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;
- 及び/又は
- (q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベル;

を有し、該心血管疾患が、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する、前記方法。

#### 【請求項 9】

対象における骨吸収を低下させる方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が：

- (a) 参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;
- (b) 参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;
- (c) 参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;
- (d) 参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;
- (e) 参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;

50

- (f) 参照集団における $\text{col}1\text{a}1$ のレベルと比較して上昇した $\text{col}1\text{a}1$ のレベル;
  - (g) 参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベル;
  - (h) 参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;
  - (i) 参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;
  - (j) 参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;
  - (k) 参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;
  - (l) 参照集団における $\text{-SMA}$ のレベルと比較して減少した $\text{-SMA}$ のレベル;
  - (m) 参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;
  - (n) 参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル
  - (o) 参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;
  - (p) 参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;
- 及び/又は

(q) 参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベル  
を有する、前記方法。

#### 【請求項 1 0】

前記ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量が、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、もしくは約1g、又は約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、もしくは約1.5mg/kgである、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。 10

#### 【請求項 1 1】

前記医薬有効用量が注射によって投与される、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。  
。

#### 【請求項 1 2】

前記医薬有効用量が、(i)14日に1回;(ii)21日に1回;(iii)28日に1回、又は(iv)42日に1回投与される、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 1 3】

前記医薬有効用量が連続的に及び/又は無制限に投与される、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 1 4】

前記上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベルが、それぞれ、前記参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、又は500%大きい、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。 30

#### 【請求項 1 5】

前記上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベルが、前記参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きい、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。 40

#### 【請求項 1 6】

前記減少したKlotho、 $\text{-SMA}$ 、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルが、それぞれ、前記参照集団におけるKlotho、 $\text{-SMA}$ 、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、又は10%小さい、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 1 7】

10

20

30

40

50

前記減少したKlotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルが、前記参考集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるKlotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 18】

対象における血管石灰化を治療及び/又は予防する方法であつて：

- (a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること；
- (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと；
- (c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと；並びに
- (d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該血管石灰化を治療及び/又は予防する、前記方法。

10

20

30

40

50

#### 【請求項 19】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であつて：

- (a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること；
- (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと；
- (c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと；並びに
- (d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項 20】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であつて：

- (a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること；
- (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと；
- (c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 $\alpha$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと；並びに
- (d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該心血管疾患が、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因し、該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治

療及び/又は予防する、前記方法。

**【請求項 2 1】**

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であつて：

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること；
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと；
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと；並びに

- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該心血管疾患が、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因し；該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

**【請求項 2 2】**

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であつて：

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること；
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと；
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと；並びに

- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該心血管疾患が、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因し；該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

**【請求項 2 3】**

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であつて：

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること；
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと；
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと；並びに

- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該心血管疾患が、左心室肥大と関連し及び/又は左心室肥大に起因し；該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

**【請求項 2 4】**

10

20

30

40

50

対象における骨吸収を低下させる方法であって:

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに
- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

10

を含み、ここで、該1回目の測定が、治療の開始前又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われ、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該骨吸収を低下させる、前記方法。

#### 【請求項 2 5】

対象における血管石灰化を治療及び/又は予防する方法であって:

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに
- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

20

を含み、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該血管石灰化を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項 2 6】

対象における高いレベルの動脈壁硬化を治療及び/又は予防する方法であって:

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに
- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

30

を含み、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該高いレベルの動脈壁硬化を治療及び/又は予防する、前記方法。

40

#### 【請求項 2 7】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:

- (a) 該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;
- (b) 該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;
- (c) しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに
- (d) 該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与す

50

ること

を含み、ここで、該心血管疾患が、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因し、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項 2 8】

対象における左心室肥大(LVH)を治療及び/又は予防する方法であって:

(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;  
 (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、  
 アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin  
 2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;

(c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、  
 Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD  
 、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに

(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該LVHを治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項 2 9】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:

(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;  
 (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、  
 アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin  
 2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;

(c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、  
 Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD  
 、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに

(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該心血管疾患が、左心室肥大と関連し及び/又は左心室肥大に起因し、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項 3 0】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:

(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;  
 (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、  
 アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin  
 2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;

(c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、  
 Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD  
 、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに

(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項 3 1】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:

(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;  
 (b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、  
 アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin  
 2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;

10

20

30

40

50

(c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに

(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること;  
を含み、

ここで、該心血管疾患が、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因し、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項32】

対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であつて:

(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;  
(b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;

(c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに

(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること;  
を含み、

ここで、該心血管疾患が、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因し、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該心血管疾患を治療及び/又は予防する、前記方法。

#### 【請求項33】

対象における骨吸収を低下させる方法であつて:

(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;  
(b)該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;

(c)しばらくして、該対象におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに

(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与すること

を含み、ここで、該調整用量が、該1回目の測定と該2回目の測定の間の検出された変化に基づき、それにより、該骨吸収を低下させる、前記方法。

#### 【請求項34】

前記ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量が、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、もしくは約1g、又は約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、もしくは約1.5mg/kgである、請求項18～33のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項35】

前記初回用量が注射により投与される、請求項18～34のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項36】

前記初回用量が、(i)14日に1回;(ii)21日に1回,(iii)28日に1回;又は(iv)42日に1回投与される、請求項18～35のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項37】

前記ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量が:

10

20

30

40

50

- (a) Runx2のレベルが参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇しており；  
 (b) Alpのレベルが参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇しており；  
 (c) Snai1のレベルが参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇しており；  
 (d) ホスホsmad2のレベルが参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇しており；  
 (e) Dkk1のレベルが参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇しており；  
 (f) col1a1のレベルが参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇しており；  
 (g) アクチビンのレベルが参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇しており；  
 (h) BSAPのレベルが参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇しており；  
 (i) CTXのレベルが参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇しており；  
 (j) Osterixのレベルが参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇しており；  
 (k) Klothoのレベルが参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少しており；  
 (l) -SMAのレベルが参照集団における-SMAのレベルと比較して減少しており；  
 (m) MYOCDのレベルが参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少しており；  
 (n) Sm22- のレベルが参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少しており；  
 (o) ホスホsmad3のレベルが参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇しており；  
 (p) 尿タンパク質のレベルが参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇しており；  
 (q) ActRIIAのレベルが参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少しており；及び  
 /又は  
 (r) Axin2のレベルが参照集団におけるAxin2のレベルと比較して減少している場合、前記初回用量よりも多い、請求項18～35のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 3 8】**

前記調整用量が、前記初回用量よりも約2.5mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、もしくは約35mg多く、又は該初回用量よりも約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、もしくは約0.5mg/kg多い、請求項37記載の方法。

**【請求項 3 9】**

前記調整用量が前記初回用量よりも高い頻度で投与される、請求項37又は請求項38記載の方法。

**【請求項 4 0】**

前記調整用量が、5、10、15、20、25、28、30、35、又は40日毎に投与される、請求項18～39のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 4 1】**

- 前記ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量が：
- (a) Runx2のレベルが参照集団におけるRunx2のレベルと比較して減少しており；  
 (b) Alpのレベルが参照集団におけるAlpのレベルと比較して減少しており；  
 (c) Snai1のレベルが参照集団におけるSnai1のレベルと比較して減少しており；  
 (d) ホスホsmad2のレベルが参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して減少しており；  
 (e) Dkk1のレベルが参照集団におけるDkk1のレベルと比較して減少しており；  
 (f) col1a1のレベルが参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して減少しており；  
 (g) アクチビンのレベルが参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して減少しており；  
 (h) BSAPのレベルが参照集団におけるBSAPのレベルと比較して減少しており；  
 (i) CTXのレベルが参照集団におけるCTXのレベルと比較して減少しており；  
 (j) Osterixのレベルが参照集団におけるOsterixのレベルと比較して減少しており；  
 (k) Klothoのレベルが参照集団におけるKlothoのレベルと比較して上昇しており；

(l) -SMAのレベルが参照集団における-SMAのレベルと比較して上昇しており；  
 (m)Klothoのレベルが参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して上昇しており；  
 (n)Sm22- のレベルが参照集団におけるSm22- のレベルと比較して上昇しており；  
 (o)ホスホsmad3のレベルが参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して減少しており；及び/又は

(p)尿タンパク質のレベルが参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して減少しております

(q)ActRIIAのレベルが参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して上昇しており；及び/又は

(r)Axin2のレベルが参照集団におけるAxin2のレベルと比較して上昇している場合、前記初回用量よりも少ない、請求項18～33のいずれか一項記載の方法。 10

**【請求項 4 2】**

前記調整用量が、前記初回用量よりも約2.5mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、もしくは約35mg少なく、又は該初回用量よりも約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、もしくは約0.5mg/kg少ない、請求項41記載の方法。

**【請求項 4 3】**

前記調整用量が前記初回用量よりも低い頻度で投与される、請求項41又は42記載の方法。  
。

**【請求項 4 4】**

前記調整用量が、30、35、40、42、50、60、70、80、又は90日毎に投与される、請求項41～43のいずれか一項記載の方法。 20

**【請求項 4 5】**

前記調整用量が連続的に及び/又は無制限に投与される、請求項18～44のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記1回目の測定が治療の開始前に行われる、請求項18～44のいずれか一項記載の方法。  
。

**【請求項 4 7】**

前記1回目の測定が、治療の開始直後又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2ヶ月以内に行われる、請求項18～44のいずれか一項記載の方法。 30

**【請求項 4 8】**

前記2回目の測定が、治療の開始直後又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、又は12ヶ月以内に行われる、請求項18～44のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 4 9】**

(a)前記上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクトビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルが、それぞれ、前記参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクトビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは50%大きく；並びに/又は 40

(b)前記減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルが、それぞれ、該参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、又は100%小さい

請求項37記載の方法。

**【請求項 5 0】**

10

20

30

40

50

(a) 前記上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベルが、前記参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%大きく；並びに/或いは

(b) 前記減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルが、該参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい

請求項49記載の方法。

#### 【請求項 5 1】

(a) 前記上昇したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルが、それぞれ、前記参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく；並びに/或いは

(b) 前記減少したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルが、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい

請求項41記載の方法。

#### 【請求項 5 2】

(a) 前記上昇したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルが、前記参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく；並びに/或いは

(b) 前記減少したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルが、該参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは100%小さい

請求項51記載の方法。

#### 【請求項 5 3】

前記Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルが、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のタンパク質レベルである、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 5 4】

前記Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルが、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のタンパク質レベルである、請求項18~52のいずれか一

10

20

30

40

50

項記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記タンパク質レベルが酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって決定される、請求項53又は54記載の方法。

**【請求項 5 6】**

前記ELISAが

- (a)Runx2レベルを決定するためのRunx2特異的抗体SC-390715(Santa Cruz);
- (b)Alpレベルを決定するためのAlp特異的抗体SC-98652(Santa Cruz);
- (c)Snai1レベルを決定するためのSnai1特異的抗体sc-393172(Santa Cruz);
- (d)ホスホsmad2レベルを決定するためのホスホsmad2特異的抗体sc-101801(Santa Cruz) 10
- ;
- (e)ホスホsmad2レベルを決定するためのホスホsmad3特異的抗体sc-130218(Santa Cruz)
- ;
- (f)Dkk1レベルを決定するためのDkk1特異的抗体sc-374574(Santa Cruz);
- (g)col1a1レベルを決定するためのCol1a1特異的抗体sc-8784(Santa Cruz);
- (h)アクチビンレベルを決定するためのアクチビン特異的抗体A1594(Sigma Aldrich);
- (i)BSAPレベルを決定するためのBSAP特異的抗体SC-98652(Santa Cruz);
- (j)CTXレベルを決定するためのCTX特異的抗体ABIN1173415(Antibodies Online);
- (k)Osterixレベルを決定するためのOsterix特異的抗体SC-22538(Santa Cruz);
- (l)Klothoレベルを決定するためのKlotho特異的抗体SC-22218(Santa Cruz); 20
- (m) -SMAレベルを決定するための-SMA特異的抗体SC-53142(Santa Cruz);
- (n)MYOCDレベルを決定するためのMYOCD特異的抗体SC-21561(Santa Cruz);及び/又は
- (o)Sm22- レベルを決定するためのSm22- 特異的抗体SC-271719(Santa Cruz)
- (p)ActRIIAレベルを決定するためのActRIIA特異的抗体ab135634(Abcam)

を用いて行われる、請求項55記載の方法。

**【請求項 5 7】**

前記Snai1、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルが、それぞれ、Snai1、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のmRNAレベルである、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。 30

**【請求項 5 8】**

前記Snai1、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルが、それぞれ、Snai1、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のmRNAレベルである、請求項18~52のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5 9】**

前記mRNAレベルが、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)によって決定される、請求項57又は58記載の方法。

**【請求項 6 0】**

前記qRT-PCRが

- (a)Runx2レベルを決定するためのRunx2特異的プライマー(配列番号48及び49);
- (b)Alpレベルを決定するためのAlp特異的プライマー(配列番号50及び51);
- (c)col1a1レベルを決定するためのCol1a1特異的プライマー(配列番号82及び83);
- (d)Snai1レベルを決定するためのSnai1特異的プライマー(配列番号78及び79);
- (e)Dkk1レベルを決定するためのDkk1特異的プライマー(配列番号80及び81);
- (f)アクチビンレベルを決定するためのアクチビン特異的プライマー(配列番号84及び85) 40
- ;
- (g)Osterixレベルを決定するためのOsterix特異的プライマー(配列番号52及び53);
- (h)Klothoレベルを決定するためのKlotho特異的プライマー(配列番号54及び55);及び/

又は

(i) Sm22- レベルを決定するためのSm22- 特異的プライマー(配列番号56及び57)を用いて行われる、請求項59記載の方法。

**【請求項 6 1】**

前記レベルが組織におけるものである、請求項1~60のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6 2】**

前記組織が、大動脈、血清、骨髄、肝臓、又は脾臓である、請求項61記載の方法。

**【請求項 6 3】**

前記血管石灰化が、石灰化アテローム性動脈硬化症、石灰化中膜血管障害(別名、メンケベルグ中膜石灰化硬化症)、中膜石灰化、弾性石灰沈着症、石灰沈着性尿毒症性動脈症、石灰化大動脈弁狭窄症、又は門脈石灰化である、請求項2、3、18、又は25のいずれか一項記載の方法。

10

**【請求項 6 4】**

前記心血管疾患が、血管石灰化と関連する疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、骨粗鬆症、高血圧、炎症、2型真性糖尿病、末期腎疾患、切断を要するもの、弾力線維性仮性黄色腫、先天性二尖弁、リウマチ性心疾患、門脈高血圧、又は肝疾患である、請求項1、19、又は26のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6 5】**

前記心血管疾患が慢性腎疾患に続発する、請求項1、19、又は26のいずれか一項記載の方法。

20

**【請求項 6 6】**

前記慢性腎疾患が、ステージ3、4、又は5の慢性腎疾患である、請求項65記載の方法。

**【請求項 6 7】**

前記慢性腎疾患が、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常である、請求項65記載の方法。

。

**【請求項 6 8】**

前記ActRIIシグナル伝達インヒビターが:

(a)配列番号2と90%同一のもの;

30

(b)配列番号2と95%同一のもの;

(c)配列番号2と98%同一のもの;

(d)配列番号2;

(e)配列番号3と90%同一のもの;

(f)配列番号3と95%同一のもの;

(g)配列番号3と98%同一のもの;

(h)配列番号3;

(i)配列番号6と90%同一のもの;

40

(j)配列番号6と95%同一のもの;

(k)配列番号6と98%同一のもの;

(l)配列番号6;

(m)配列番号7と90%同一のもの;

(n)配列番号7と95%同一のもの;

(o)配列番号7と98%同一のもの;

(p)配列番号7;

(q)配列番号12と90%同一のもの;

(r)配列番号12と95%同一のもの;

(s)配列番号12と98%同一のもの;

(t)配列番号12;

(u)配列番号17と90%同一のもの;

(v)配列番号17と95%同一のもの;

(w)配列番号17と98%同一のもの;

50

- (x)配列番号17;
- (y)配列番号20と90%同一のもの;
- (z)配列番号20と95%同一のもの;
- (aa)配列番号20と98%同一のもの;
- (bb)配列番号20;
- (cc)配列番号21と90%同一のもの;
- (dd)配列番号21と95%同一のもの;
- (ee)配列番号21と98%同一のもの;及び
- (ff)配列番号21

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1～67のいずれか一項記載の方法。

10

**【請求項 6 9】**

前記ActRIIシグナル伝達インヒビターが、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1～68のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 0】**

前記ActRIIシグナル伝達インヒビターが、ActRIIAの細胞外ドメイン及びヒトIgG1 Fcドメインからなるヒト化融合タンパク質である、請求項1～69のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 1】**

前記対象がヒトである、請求項1～70のいずれか一項記載の方法。

20

**【請求項 7 2】**

前記参照集団が、1、5、10、25、50、75、100、200、250、300、400、500、又は1000個体からなる、請求項1～71のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 3】**

前記参照集団が健常人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 4】**

前記参照集団が、前記対象と同じ年齢、体重、及び/又は性別の人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 5】**

前記参照集団が、心血管疾患を有しない人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

30

**【請求項 7 6】**

前記参照集団が、血管石灰化を有しない人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 7】**

前記参照集団が、腎疾患を有しない人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 8】**

前記参照集団が、慢性腎疾患を有しない人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7 9】**

前記参照集団が、病理学的に高いレベルの動脈壁硬化を有しない人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

40

**【請求項 8 0】**

前記参照集団が、左心室肥大を有しない人からなる、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

**(1. 関連出願の相互参照)**

本出願は、その各自の内容全体が引用によりかつあらゆる目的のために本明細書中に組

50

み込まれる、2014年10月9日に出願された米国仮特許出願第62/062,021号；2014年11月11日に出願された米国仮特許出願第62/078,321号；2015年1月14日に出願された米国仮特許出願第62/103,515号；2015年5月27日に出願された米国仮特許出願第62/167,052号；及び2015年6月2日に出願された米国仮特許出願第62/170,015号の優先権の恩典を主張する。

【0002】

(2. 政府ライセンス権)

本発明は、国立衛生研究所により与えられた助成金番号DK070790及びDK089137の下で政府の支援によりなされた。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0003】

(3. 配列表)

本出願は、2015年10月6日に作成された、ファイル名12827\_934\_228\_SeqListing.txtとして提出された208キロバイトのサイズの配列表とともに出願されている。この配列表は、その全体が引用によりかつあらゆる目的のために本明細書中に組み込まれている。

【0004】

(4. 分野)

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビンII型受容体シグナル伝達インヒビター(ActRIIシグナル伝達インヒビター、例えば、アクチビンリガンドトラップ)を投与することを含む、方法である。より具体的には、本明細書に提供されるのは、1以上のバイオマーカー、特に、snailホモログ1(Snai1)、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、dickkopfホモログ1(Dkk1)、コラーゲン1型1(Col1a1)、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、runt関連転写因子2(Runx2)、アルカリホスファターゼ(Alp)、骨特異的アルカリホスファターゼ(BSAP)、Osterix、C末端1型コラーゲンテロペプチド(CTX)、Klotho、-平滑筋アクチン(-SMA)、ミオカルディン(MYOCD)、軸阻害タンパク質2(Axin2)、及び/又は平滑筋タンパク質22-(Sm22-)のレベル及び/又は活性を、治療に対する対象の応答性、治療の効力、又はアクチビンII型受容体(ActRII)シグナル伝達インヒビターによる治療のための適切な投薬量の指標として用いることにより、心血管疾患、血管石灰化、高いレベルの動脈壁硬化、左心室肥大、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患、左心室肥大と関連し及び/もしくは左心室肥大に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する心血管疾患の治療のための対象を選択する方法である。本明細書に提供されるのは、対象における骨吸収を低下させる方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターを投与することを含む、方法である。より具体的には、本明細書に提供されるのは、1以上のバイオマーカー、特に、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、Osterix、CTX、Klotho、-SMA、MYOCD、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を、治療に対する対象の応答性、治療の効力、又はActRIIシグナル伝達インヒビターによる治療のための適切な投薬量の指標として用いることにより、骨吸収の低下のための対象を選択する方法である。

【背景技術】

【0005】

(5. 背景)

貧血を伴う腎疾患のよく見られる合併症は血管石灰化であり、これは、多くの場合、心血管疾患をもたらす。腎疾患対象(renal subject)において、アテローム性動脈硬化症及び結果として生じる心血管疾患は、腎疾患それ自体と関連する死亡率とは別に、著しい死亡率をもたらし得る。したがって、腎疾患対象における心血管疾患のための新しい薬物並びに治療及び/又は予防方法の発見及び開発が引き続き必要である。さらに、腎疾患対象は貧血に苦しむことが多いので、貧血及びそれに付随する心血管疾患を、エリスロポエチ

10

20

30

40

50

ンなどの現在使用されている赤血球生成刺激剤(ESA)が保持しない能力を備えた、単一の治療薬を用いて治療することは有益であろう。

#### 【0006】

2つの関連するII型受容体、ActRIIA及びActRIIBが、アクチビンのII型受容体として同定されている(Mathews及びValeの文献、1991, Cell 65:973-982; Attisanoらの文献、1992, Cell 68: 97-108)。アクチビンの他に、ActRIIA及びActRIIBは、BMP7、Nodal、GDF8、及び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することができる(Yamashitaらの文献、1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee及びMcPhersonの文献、2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo及びWhitmanの文献、2001, Mol. Cell 7: 949-957; Ohらの文献、2002, Genes Dev. 16:2749-54)。ALK4は、アクチビン、特に、アクチビンAの主なI型受容体であり、ALK-7は、同様に、アクチビン、特に、アクチビンBの受容体としての役割を果たし得る。10

#### 【0007】

アクチビン受容体IIA型(ActRIIA)の細胞外ドメイン及びヒトIgG1 Fcからなるヒト化融合タンパク質(本明細書では、ActRIIA-hFc又は「ソタテルセプト」と呼ばれる;配列番号7)からなるアクチビンリガンドトラップは、現在、末期腎疾患(ESRD)と関連する貧血及び骨障害を有する対象並びに -サラセニアを有するこれらの対象の治療のための第II相臨床試験で評価されているところである。閉経後の健常女性では、ActRIIA-hFcが、ヘマトクリット(Hct)及びヘモグロビン(Hgb)並びに骨ミネラル密度を顕著に増大させることができた。20

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

##### (6. 概要)

本明細書に提供されるのは、対象における血管石灰化を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;(f)参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における -SMAのレベルと比較して減少した -SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したアクチビン受容体2A型(ActRIIA)のレベルを有する、方法である。参照集団の説明については、例えば、第8.6節を参照されたい。30

#### 【0009】

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上40

10

20

30

40

50

昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;(f)参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有する、方法である。  
。

10

#### 【0010】

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;(f)参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有し、かつ該心血管疾患が、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する、方法である。

20

#### 【0011】

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;(f)参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団にお  
40

30

40

50

ける尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有し、かつ該心血管疾患が、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する、方法である。

【0012】

本明細書に提供されるのは、対象における骨吸収を低下させる方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;(f)参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有する、方法である。  
10

【0013】

本明細書に提供されるのは、対象における動脈壁硬化を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル;(f)参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して上昇したcol1a1のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有する、方法である。  
20

。

【0014】

本明細書に提供されるのは、対象における左心室肥大を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、アクチビン受容体II型(ActRII)シグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含み、ここで、該対象が:(a)参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇したRunx2のレベル;(b)参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇したAlpのレベル;(c)参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇したSnai1のレベル;(d)参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇したホスホsmad2のレベル;(e)参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇したDkk1のレベル  
30  
40  
50

のレベル;(f)参照集団における $\text{col}1\text{a}1$ のレベルと比較して上昇した $\text{col}1\text{a}1$ のレベル;(g)参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル;(h)参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇したBSAPのレベル;(i)参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇したOsterixのレベル;(j)参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇したCTXのレベル;(k)参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少したKlothoのレベル;(l)参照集団における-SMAのレベルと比較して減少した-SMAのレベル;(m)参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少したMYOCDのレベル;(n)参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少したSm22- のレベル;(o)参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇したホスホsmad3のレベル;(p)参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇した尿タンパク質のレベル;及び/又は(q)参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少したActRIIAのレベルを有する、方法である。  
10

#### 【0015】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量は、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、もしくは約1g、又は約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、もしくは約1.5mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量は、約0.1mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量は、約0.3mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量は、約0.5mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量は、約0.7mg/kgである。  
20

#### 【0016】

ある実施態様において、該医薬有効用量は、注射によって投与される。ある実施態様において、該医薬有効用量は、(i)28日に1回;又は(ii)42日に1回投与される。ある実施態様において、該医薬有効用量は、14日に1回投与される。ある実施態様において、該医薬有効用量は、21日に1回投与される。ある実施態様において、該医薬有効用量は、連続的に及び/又は無制限に投与される。

#### 【0017】

ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixのレベルは、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixのレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、又は500%大きい。  
30

#### 【0018】

ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixのレベルは、それぞれ、参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、 $\text{col}1\text{a}1$ 、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きい。  
40

#### 【0019】

ある実施態様において、減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、又は100%小さい。

#### 【0020】

ある実施態様において、減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又は

Sm22- のレベルは、それぞれ、参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくは Sm22- のレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。

#### 【0021】

本明細書に提供されるのは、対象における血管石灰化を治療及び/又は予防する方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。10

#### 【0022】

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。20

#### 【0023】

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含み;かつ該心血管疾患が、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する、方法である。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。30

#### 【0024】

本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。40

)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含み;かつ該心血管疾患が、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する、方法である。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。

#### 【0025】

本明細書に提供されるのは、対象における骨吸収を低下させる方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、骨吸収は、第8.6節に記載されているように評価される。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。

10

20

30

40

50

#### 【0026】

本明細書に提供されるのは、対象における動脈壁硬化を治療及び/又は予防する方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、動脈壁硬化は、第8.6節に記載されているように評価される。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。

#### 【0027】

本明細書に提供されるのは、対象における左心室肥大を治療及び/又は予防する方法であって:(a)該対象に、該対象へのActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(b)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの1回目の測定を行うこと;(c)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルの2回目の測定を行うこと;並びに(d)該対象に、該アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。ある実施態様において、該用量は、第8.3.4節に記載されているように調整される。

#### 【0028】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量は、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、もしくは約1g、又は約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、もしくは約1.5mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量は、約0.1mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量は、約0.3mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量は、約0.5mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量は、約0.7mg/kgである。

#### 【0029】

10

ある実施態様において、初回用量は、注射によって投与される。ある実施態様において、初回用量は、(i)28日に1回；又は(ii)42日に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、14日に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、21日に1回投与される。

#### 【0030】

20

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量は：(a)Runx2のレベルが参照集団におけるRunx2のレベルと比較して上昇しており；(b)Alpのレベルが参照集団におけるAlpのレベルと比較して上昇しており；(c)Snai1のレベルが参照集団におけるSnai1のレベルと比較して上昇しており；(d)ホスホsmad2のレベルが参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して上昇しており；(e)Dkk1のレベルが参照集団におけるDkk1のレベルと比較して上昇しており；(f)Col1a1のレベルが参照集団におけるCol1a1のレベルと比較して上昇しており；(g)アクチビンのレベルが参照集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇しており；(h)BSAPのレベルが参照集団におけるBSAPのレベルと比較して上昇しており；(i)CTXのレベルが参照集団におけるCTXのレベルと比較して上昇しており；(j)Osterixのレベルが参照集団におけるOsterixのレベルと比較して上昇しており；(k)Klothoのレベルが参照集団におけるKlothoのレベルと比較して減少しており；(l) -SMAのレベルが参照集団における -SMAのレベルと比較して減少しており；(m)MYOCDのレベルが参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して減少しており；(n)Sm22- のレベルが参照集団におけるSm22- のレベルと比較して減少しており；(o)ホスホsmad3のレベルが参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して上昇しており；(p)尿タンパク質のレベルが参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して上昇しており；(q)ActRIIAのレベルが参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して減少しており；及び/又は(r)Axin2のレベルが参照集団におけるAxin2のレベルと比較して減少している場合、初回用量よりも多い。

30

#### 【0031】

40

ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも約2.5mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、もしくは約35mg多いか、又は初回用量よりも約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、もしくは約0.5mg/kg多い。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも高い頻度で投与される。ある実施態様において、調整用量は、5、10、15、20、25、28、30、35、又は40日毎に投与される。

#### 【0032】

50

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量は：(a)Runx2のレベルが参照集団におけるRunx2のレベルと比較して減少しており；(b)Alpのレベルが参照集団におけるAlpのレベルと比較して減少しており；(c)BSAPのレベルが参照集団におけるBSAPのレベルと比較して減少しており；(d)Snai1のレベルが参照集団におけるSnai1のレベルと比較して減少しており；(e)ホスホsmad2のレベルが参照集団におけるホスホsmad2のレベルと比較して減少しており；(f)Dkk1のレベルが参照集団におけるDkk1のレベルと比較して減少しており；(g)col1a1のレベルが参照集団におけるcol1a1のレベルと比較して減少しており；(h)アクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベルが参照集団におけるアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベルと比較して減少しており；(i)CTXのレベルが参照集団に

おけるCTXのレベルと比較して減少しており;(j)Osterixのレベルが参照集団におけるOsterixのレベルと比較して減少しており;(k)Klothoのレベルが参照集団におけるKlothoのレベルと比較して上昇しており;(l) -SMAのレベルが参照集団における -SMAのレベルと比較して上昇しており;(m)MYOCDのレベルが参照集団におけるMYOCDのレベルと比較して上昇しており;(n)Sm22- のレベルが参照集団におけるSm22- のレベルと比較して上昇しており;(o)ホスホsmad3のレベルが参照集団におけるホスホsmad3のレベルと比較して減少しており;(p)尿タンパク質のレベルが参照集団における尿タンパク質のレベルと比較して減少しており;(q)ActRIIAのレベルが参照集団におけるActRIIAのレベルと比較して上昇しており;及び/又は(r)Axin2のレベルが参照集団におけるAxin2のレベルと比較して上昇している場合、初回用量よりも少ない。

10

## 【0033】

ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも約2.5mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、もしくは約35mg少ないか、又は初回用量よりも約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、もしくは約0.5mg/kg少ない。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも低い頻度で投与される。ある実施態様において、調整用量は、30、35、40、42、50、60、70、80、又は90日毎に投与される。ある実施態様において、調整用量は、連続的に及び/又は無制限に投与される。

20

## 【0034】

ある実施態様において、1回目の測定は、治療の開始前に行われる。ある実施態様において、1回目の測定は、治療の開始直後又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2カ月以内に行われる。ある実施態様において、2回目の測定は、治療の開始直後又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、もしくは12カ月以内に行われる。

30

## 【0035】

ある実施態様において、(a)上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルは、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/又は(b)減少したKlotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団におけるKlotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。

30

## 【0036】

ある実施態様において、(a)上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルは、それぞれ、参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/或いは(b)減少したKlotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるKlotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。

40

## 【0037】

ある実施態様において、(a)上昇したKlotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/

50

もしくはSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団におけるKlotho、 -SMA、 MYOCD、 ActRIIA、 Axin2、及び/又はSm22- のレベルよりも、約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/又は(b)減少したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルは、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。

## 【0038】

10

ある実施態様において、(a)上昇したKlotho、 -SMA、 MYOCD、 ActRIIA、 Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるKlotho、 -SMA、 MYOCD、 ActRIIA、 Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/或いは(b)減少したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルは、それぞれ、参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルと等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。

20

## 【0039】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、 MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルは、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のタンパク質レベルである。ある実施態様において、該タンパク質レベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって決定される。ある実施態様において、ELISAは、(a)Runx2レベルを決定するためのRunx2特異的抗体SC-390715(Santa Cruz);(b)Alpレベルを決定するためのAlp特異的抗体SC-98652(Santa Cruz);(c)Snai1レベルを決定するためのSnai1特異的抗体sc-393172(Santa Cruz);(d)ホスホsmad2レベルを決定するためのホスホsmad2特異的抗体sc-101801(Santa Cruz);(e)Dkk1レベルを決定するためのDkk1特異的抗体sc-374574(Santa Cruz);(f)col1a1レベルを決定するためのCol1a1特異的抗体sc-8784(Santa Cruz);(g)アクチビンレベルを決定するためのアクチビン特異的抗体A1594(Sigma Aldrich);(h)BSAPレベルを決定するためのBSAP特異的抗体SC-98652(Santa Cruz);(i)CTXレベルを決定するためのCTX特異的抗体ABIN1173415(Antibodies Online);(j)Osterixレベルを決定するためのOsterix特異的抗体SC-22538(Santa Cruz);(k)Klothoレベルを決定するためのKlotho特異的抗体SC-22218(Santa Cruz);(l) -SMAレベルを決定するための-SMA特異的抗体SC-53142(Santa Cruz);(m)MYOCDレベルを決定するためのMYOCD特異的抗体SC-21561(Santa Cruz);(n)Sm22- レベルを決定するためのSm22- 特異的抗体SC-271719(Santa Cruz);(o)ホスホsmad3レベルを決定するためのホスホsmad3特異的抗体sc-11769(Santa Cruz);及び/又は(p)ActRIIAレベルを決定するためのActRIIA特異的抗体ab 135634(Abcam)を用いて行われる。

30

## 【0040】

40

ある実施態様において、Snai1、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、 MYOCD、ホスホsmad3、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルは、それぞれ、Snai1、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、 MYOCD、ホスホsmad3、ホスホsmad3

50

、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のmRNAレベルである。ある実施態様において、該mRNAレベルは、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)によって決定される。ある実施態様において、qRT-PCRは、(a)Runx2レベルを決定するためのRunx2特異的プライマー(配列番号48及び49);(b)Alpレベルを決定するためのAlp特異的プライマー(配列番号50及び51);(c)Snai1レベルを決定するためのSnai1特異的プライマー(配列番号78及び79);(d)Dkk1レベルを決定するためのDkk1特異的プライマー(配列番号80及び81);(e)col1a1レベルを決定するためのcol1a1特異的プライマー(配列番号82及び83);(f)アクチビンレベルを決定するためのアクチビン特異的プライマー(配列番号84及び85);(g)Osterixレベルを決定するためのOsterix特異的プライマー(配列番号52及び53);(h)Klothoレベルを決定するためのKlotho特異的プライマー(配列番号54及び55);及び/又は(i)Sm22- レベルを決定するためのSm22- 特異的プライマー(配列番号56及び57)を用いて行われる。

10

20

30

40

50

## 【0041】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22- 、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、ActRIIA、Axin2、及び/又は-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好ましい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22- 、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2のレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好ましい実施態様において、ホスホsmad3、尿タンパク質、ホスホsmad2、ActRIIA、Axin2、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好ましい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。

20

30

40

50

## 【0042】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22- 、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又は-SMAのレベルは、大動脈におけるものである。

30

40

50

## 【0043】

ある実施態様において、血管石灰化は、石灰化アテローム性動脈硬化症、石灰化中膜血管障害(別名、メンケベルグ中膜石灰化硬化症)、中膜石灰化、弾性石灰沈着症、石灰沈着性尿毒症性動脈症、石灰化大動脈弁狭窄症、又は門脈石灰化である。

30

40

50

## 【0044】

ある実施態様において、心血管疾患は、血管石灰化と関連する疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、骨粗鬆症、高血圧、炎症、2型真性糖尿病、末期腎疾患、切断を要する状態(required amputation)、弾力線維性仮性黄色腫、先天性二尖弁、リウマチ性心疾患、門脈高血圧、又は肝疾患である。

30

40

50

## 【0045】

ある実施態様において、心血管疾患は、慢性腎疾患に続発する。ある実施態様において、慢性腎疾患は、ステージ3、4、又は5の慢性腎疾患である。ある実施態様において、慢性腎疾患は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常である。

30

40

50

## 【0046】

ある実施態様において、対象は、高代謝回転骨疾患、例えば、高代謝回転腎性骨ジストロフィー(ROD)を有する。

30

40

50

## 【0047】

また本明細書に提供されるのは、高代謝回転骨疾患、例えば、高代謝回転RODを治療する方法であって、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効量を対象に投与することを含む、方法である。

30

40

50

## 【0048】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは:(a)配列番号2と90%同一のもの;(b)配列番号2と95%同一のもの;(c)配列番号2と98%同一のもの;(d)配列番号2;(e)配列番号3と90%同一のもの;(f)配列番号3と95%同一のもの;(g)配列番号3と98%同一の

もの;(h)配列番号3;(i)配列番号6と90%同一のもの;(j)配列番号6と95%同一のもの;(k)配列番号6と98%同一のもの;(l)配列番号6;(m)配列番号7と90%同一のもの;(n)配列番号7と95%同一のもの;(o)配列番号7と98%同一のもの;(p)配列番号7;(q)配列番号12と90%同一のもの;(r)配列番号12と95%同一のもの;(s)配列番号12と98%同一のもの;(t)配列番号12;(u)配列番号17と90%同一のもの;(v)配列番号17と95%同一のもの;(w)配列番号17と98%同一のもの;(x)配列番号17;(y)配列番号20と90%同一のもの;(z)配列番号20と95%同一のもの;(aa)配列番号20と98%同一のもの;(bb)配列番号20;(cc)配列番号21と90%同一のもの;(dd)配列番号21と95%同一のもの;(ee)配列番号21と98%同一のもの;及び(ff)配列番号21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAの細胞外ドメイン及びヒトIgG1 Fcドメインからなるヒト化融合タンパク質である。

10

## 【0049】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ソタテルセプト(配列番号7; 例えは、第9節参照)である。ソタテルセプトは、本明細書に記載の方法において有用であるアクチビンリガンドトラップである(第8節参照)。

## 【0050】

ある実施態様において、対象はヒトである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0051】

## (7. 図面の簡単な説明)

【図1】図1Aは、野生型及び模擬モデルと比較したときの腎疾患の間質性線維症モデル(CKD-3)におけるアクチビン-Aレベル(pg/ml)の増大を示している。図1Bは、野生型(WT)と比較したときの腎疾患のアルポートモデル(アルポート200d)におけるアクチビン-Aレベル(pg/ml)の増大及びBMP-7で処置したときのアクチビン-Aレベルの増大を示している。

20

## 【0052】

【図2】図2は、模擬と比較したときのCKD-3モデル(CKD-3 V)の腎臓及び大動脈におけるアクチビンA(インヒビン ) mRNAのレベルの増大を示している。mActRIIA-Fcによる処置は、CKD-3モデル(mActRIIA-Fc)におけるアクチビンA mRNAを減少させる。

30

## 【0053】

【図3】図3Aは、野生型マウス大動脈におけるACTRIIのレベルを示している。図3Bは、模擬処置したマウス大動脈におけるACTRIIのレベルを示している。図3Cは、図3A及び/又は図3Bと比較したときのCKD-3モデルのマウス大動脈におけるACTRIIのレベルの増大を示している。図3Dは、図3Cと比較したときのmActRIIA-Fcで処置したCKD-3モデルのマウス大動脈におけるACTRIIのレベルの減少を示している。

## 【0054】

【図4】図4Aは、ActRIIシグナル伝達のインヒビターによる処置の存在下(CKD3 + ActRII-Fc)及び非存在下(CKD3 + v)での慢性腎疾患のマウスモデルにおけるRunx2のmRNAレベルを示している。図4Bは、ActRIIシグナル伝達のインヒビターによる処置の存在下(CKD3 + ActRII-Fc)及び非存在下(CKD3 + v)での慢性腎疾患のマウスモデルにおけるAlpのmRNAレベルを示している。図4Cは、ActRIIシグナル伝達のインヒビターによる処置の存在下(CKD3 + ActRII-Fc)及び非存在下(CKD3 + v)での慢性腎疾患のマウスモデルにおけるKlothoのmRNAレベルを示している。図4Dは、ActRIIシグナル伝達のインヒビターによる処置の存在下(CKD3 + ActRII-Fc)及び非存在下(CKD3 + v)での慢性腎疾患のマウスモデルにおけるミオカルデイン(MYOCD)のmRNAレベルを示している。図4Eは、ActRIIシグナル伝達のインヒビターによる処置の存在下(CKD3 + ActRII-Fc)及び非存在下(CKD3 + v)での慢性腎疾患のマウスモデルにおけるSm22- (SM22 )のmRNAレベルを示している。

40

## 【0055】

図4Fは、ビヒクリのみ(CKD3 + ビヒクリ)又は模擬で処置したCKD3と比較したときのActRIIシグナル伝達のインヒビターで処置したCKD-3のモデル(CKD3 + ActRII-Fc)におけるアク

50

チン - 平滑筋、Runx2、Klotho、MYOCD、及び - チューブリンのタンパク質レベルを示している。

【0056】

【図5】図5Aは、ビヒクルで処置した(veh. Rx)ときのCKD-3誘導性血管石灰化を示している。図5Bは、ActRIIシグナル伝達のインヒビターで処置した(mActRIIA-Fc Rx)ときのCKD-3誘導性血管石灰化の減少を示している。

【0057】

【図6】図6Aは、野生型(wt)、模擬、ビヒクルで処置したCKD-3モデル(CKD-3 Veh)と比較したときのCKD-3誘導性のカルシウムレベルの増大(CKD-3 22wk)を示している。mActRIIA-Fcによる処置は、CKD-3誘導性のカルシウム蓄積を減少させる(mActRIIA-Fc)。図6Bは、野生型マウス(wt)、模擬処置マウス(模擬)、CKD-3のマウスマodel(CKD-3)、又はActRIIシグナル伝達のインヒビターで処置したCKD-3のマウスマodel(mActRIIA-Fc)の骨量を示している。図6Cは、野生型マウス(wt)、模擬処置マウス(模擬)、CKD-3のマウスマodel(CKD-3)、又はActRIIシグナル伝達のインヒビターで処置したCKD-3のマウスマodel(mActRIIA-Fc)の破骨細胞数を示している。図6Dは、野生型マウス(wt)、模擬処置マウス(模擬)、CKD-3のマウスマodel(CKD-3)、又はActRIIシグナル伝達のインヒビターで処置したCKD-3のマウスマodel(mActRIIA-Fc)の破骨細胞面を示している。

10

【0058】

【図7】図7Aは、内皮特異的Tie2-Cre(「Tek-Cre」とも呼ばれる)マウスと交配させたGNZマウス(Stollerらの文献、Genesis, 2008)で実施されたような細胞系譜追跡のための戦略を示している。図7Bは、模擬マウスにおける内皮細胞系譜追跡を示している。図7Cは、CKDマウスにおける内皮細胞系譜追跡を示している。図7Dは、CKDマウスにおける内皮細胞系譜追跡を示している。

20

【0059】

【図8】図8は、対象の内訳(subject disposition)を示している。注:「・」は、ベースライン時と225日目のペアのQCT測定を行った対象を示している。「\*」は、プラセボを受けている対象が上昇した血清エリスロポエチンレベルを有することを示しており、プロトコルに従わない(off-protocol)エリスロポエチン投与を示唆している。「+」は、プロトコル違反を示している。「‡」は、29日目に血圧上昇に関する中止規則基準を満たした対象を示している;治験を中止し、救援治療を36日目に施し、追跡調査を継続した。対象には、ベースライン時に、不完全な評価に基づいて、非適格血圧に関する誤差を無作為に割り付けた。

30

【0060】

【図9】図9Aは、各治療カテゴリー中の2%を超える大腿骨頸部皮質骨増加を有する対象のパーセンテージを示している。図9Bは、各治療群中の腰椎の骨梁量が増減した対象のパーセンテージを示している。

40

【0061】

【図10】図10Aは、各治療カテゴリー中の合計アガットストンスコアの変化についての対象のパーセンテージを示している。図10Bは、各治療カテゴリー中の平方根変換合計容積スコアの変化についての対象のパーセンテージを示している。

【0062】

【図11】図11は、プラセボ(PBO)で、又は0.3mg/kg(0.3)もしくは0.5mg/kg(0.5)の用量のActRIIシグナル伝達のインヒビターで処置した対象についての骨吸収バイオマーカーCTXの変化率を示している。

【0063】

【図12】図12Aは、10mg/kgのmActRIIA-Fcで、週2回、皮下処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)がイヌリンクリアランスに全く影響を及ぼさなかったことを示している。図12Bは、10mg/kgのmActRIIA-Fcで、週2回、皮下処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)がBUNに全く影響を及ぼさなかったことを示している。図12A及び図12Bは、第9.4.1.1節に記載されているような切除性CKDを有する血管石灰化のモデルを利用して、GFRがWT

50

C57B6マウス(WT)と比較して70%低下していることがイヌリンクリアランス及びBUNによって推定される、CKD-3(ビヒクル処置したものについては、CKD-3 V)と呼ばれるヒトCKDのステージ3に類似した腎機能の減少をもたらした。図12Cは、200日齢のCo14 5欠損マウス(アルポート)がヒトのステージ3~4のCKDと同等のイヌリンクリアランスの低下を有することを示している。<sup>\*p < 0.05</sup>。図12Dは、200日齢のCo14 5欠損マウス(アルポート)がヒトのステージ3~4のCKDと同等のBUNの上昇を有することを示している。<sup>\*p < 0.05</sup>。

#### 【0064】

【図13】図13は、CKDが循環中のアクチビン並びに腎臓及び大動脈ActRIIA発現を増大させることを示している。「WT」=野生型;「模擬」=模擬処置したマウス;「CKD-3 V」=ビヒクル処置したマウス;「CKD-3 R」=mActRIIA-Fcで処置したマウス。図13Aは、第9.4.1.1節に記載の $\text{ldlr}^{-/-}$ -高脂肪食給餌CKD-3マウスモデルにおけるCKDによる循環アクチビン-Aの誘導を示している。図13Bは、第9.4.1.1節に記載のアルポート症候群マウスにおけるCKDによる循環アクチビン-Aの誘導を示している。図13Cは、マウス腎臓及び大動脈におけるインヒビン A発現を示している(アクチビン-Aは、インヒビン A遺伝子のホモ二量体から形成される)。図13Dは、腎臓ホモジネート中のインヒビン Aのタンパク質レベルを示している。1、2、及び3は、個々の試料を表している。図13Eは、大動脈ActRIIAの免疫組織化学を示している。ActRIIA発現は、野生型(WT)及び模擬手術した $\text{ldlr}^{-/-}$ -高脂肪食給餌マウス(模擬)の大動脈で検出された。この発現は、ビヒクルで処置されたCKD-3マウス(CKD-3 V)又はmActRIIA-Fcで処置されたCKD-3マウス(CKD-3 mActRIIA-Fc)で刺激された。スケールバーは20 μmである。図13Fは、WT及び模擬マウスと比較して、CKD-3マウス(ビヒクルで処置したもの、CKD-3 V、又はmActRIIA-Fcで処置したもの、CKD-3 R)における循環フォリスタチンレベルに変化がないことを示している。<sup>\*p < 0.05</sup>、<sup>\*\*\*p < 0.005</sup>。図13Gは、WT及び模擬マウスと比較して、CKD-3マウス(ビヒクルで処置したもの、CKD-3 V、又はmActRIIA-Fcで処置したもの、CKD-3 R)における循環フォリスタチン様3(Fstl3)レベルに変化がないことを示している。<sup>\*p < 0.05</sup>、<sup>\*\*\*p < 0.005</sup>。

#### 【0065】

【図14】図14は、CKDが内皮間葉転換を刺激したことを示している。図14Aは、マウス交配戦略の図式を示している。ROSA26GNZノックインマウス(GNZマウス)は、核局在化GFP-LacZレポーター(GNZ)の発現を妨げる、終止コドン付き配列を有する。内皮細胞でCreリコンビナーゼ(Cre)を発現するTek-Creマウスと交配させたとき、Creリコンビナーゼ(Cre)はloxPに隣接する配列を欠失させ、内皮起源の全ての細胞がGNZレポータータンパク質を産生する。図14B~図14Dは、DAPI核染色を伴う、内皮細胞マーカーCD31とGFPについてのTek-Cre/GNZマウス大動脈の二重免疫染色を示している。矢印は、二重染色された内皮細胞を示している。模擬手術したマウス(図14B)では、内皮細胞のみが核及び細胞質GFP染色を示している。CKD3マウス(図14C及び図14D)では、内皮細胞に加えて、大動脈中膜及び外膜の細胞がGFP染色(矢尻)を示している。スケールバーは20 μmである。図14Eは、EnMTと関連する転写因子であるSnai 1(Medici, D.らの文献、2008. Molecular Biology of the Cell 19:4875-4887.)の大動脈mRNAレベルが、野生型(WT)マウスと比較して、75日齢のアルポート症候群のマウスで増大していることを示している。チューブリンは、ローディング对照としての役割を果たした。1及び2は、個々の試料を表している。

#### 【0066】

【図15】図15は、CKD-3を有する $\text{ldlr}^{-/-}$ -高脂肪食給餌マウスにおける血管石灰化に対するmActRIIA-Fcの効果を示している。図15Aは、ビヒクル処置したCKD-3マウス(CKD-3 V)及びmActRIIA-Fc処置したCKD-3マウス(CKD-3 mActRIIA-Fc)由来の近位大動脈アテローム性動脈硬化性プラークのAlizarin Red染色切片を示している。図15Bは、マウスの群:野生型(wt);模擬手術した $\text{ldlr}^{-/-}$ -高脂肪食給餌(模擬);処置の開始時の22週で安樂死させたCKD-3(CKD-3); 22~28週までビヒクルで処置したCKD-3(CKD-3 V); 22~28週まで、10mg/kgのmActRIIA-Fcで、週2回、皮下処置したCKD-3(CKD-3 R)における大動脈カルシウムレベルを示している。四角は、中央値(四角の中の線)及び25~75パーセンタイルの四分位数範囲を表している。エラーバーは、四分位数範囲の1.5倍を表している。群は、多重比較用のANO

10

20

30

40

50

VA Holm-Sidak法を用いて比較し、 $p < 0.05$ を有意差の水準とした。\* $p < 0.02$ 、各群についてのnは8~12。

#### 【0067】

【図16】図16は、CKD刺激性心疾患に対するActRIIAシグナル伝達の減少の効果を示している。図16Aは、*Idlr*-/-高脂肪食給餌マウスにおけるCKD-3が心重量を増大させ、これが、mActRIIA-Fc処置群では、模擬処置マウスと比較して無効化されたことを示している。CKD-3-Lは、炭酸ランタンで処置したCKD-3マウスを表している。図16Bは、CKD-3が主に左心室で心肥大を生じさせ(中央)、これが、mActRIIA-Fc処置群(右)では、模擬マウス(左)と比較して抑制されたことを示している。三重染色、スケールバーは1mm。図16Cは、心筋線維化の兆候がないことを示した、高倍率での左心室筋細胞の三重染色を示している。スケールバーは20 μm。

10

#### 【0068】

【図17】図17は、*Idlr*-/-高脂肪食給餌CKD-3マウスにおける血管硬化に対するCKD-3効果と、Dkk1中和効果の欠如とを示している。図17Aは、以前に報告された(Wagenseil, J.E.らの文献、2009. *Circulation Research* 104:1217-1224; Wagenseil, J.E.らの文献、2005. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* 289:H1209-H1217.)通りに行われた、左総頸動脈の圧力-直径関係性を示している。図17Bは、野生型マウス(WT-28週)、模擬手術したマウス(模擬-28週)、CKD-3マウス(28週)、及びDkk1モノクローナル抗体で処置したCKD-3マウス(Dkk1 mab-28週)の上行大動脈を示している。図17について、黒は、WT又は模擬手術したマウスを表し、一方、白又は灰色は、CKD-3マウスを表している。値は、平均±標準偏差として提示されている。頸動脈については、N=5~6匹のマウス、上行大動脈については、N=3~6匹のマウス。

20

#### 【0069】

【図18】図18は、腎臓及び大動脈におけるActRIIAシグナル伝達を示している。図18Aは、模擬処置マウス、CKD-3のビヒクル処置マウス(CKD-3 V)及びmActRIIA-Fc処置マウス(CKD-3 R)由来の腎臓(左)及び大動脈(右)ホモジネートのウェスタンによって決定されたアクチビンシグナル伝達を示している。アクチビンレベルは、腎臓ホモジネートで増大したが、大動脈ホモジネートでは増大せず、AIk4(AcvR1B)及びAIk2(AcvR1) 1型受容体は、腎臓ホモジネート中に存在していたが、CKD-3は、AIk4リン酸化を増大させなかった。AIk4及びAIk1(AcvRL1)は、大動脈ホモジネート中に存在していた。CKD-3は、腎臓におけるsmad2/3リン酸化を増大させたが、大動脈におけるsmad2/3リン酸化を増大させず、腎臓Col1A1レベルを増大させた。mActRIIA-Fc処置は、腎臓のホスホsmad2/3及びCol1A1レベルを減少させた。大動脈では、ホスホsmad2/3レベルに対するCKD-3の効果がなかっただけでなく、ホスホErk 1/2レベルに対する効果もなかった。Runx2レベルはCKD-3によって増大し、mActRIIA-Fcによって正常化した。図18Bは、CKD-3マウスの腎臓におけるKlotho mRNA発現の減少及びmActRIIA-Fc処置によるその改善を示している。図18Cは、模擬処置マウス、CKD-3のビヒクル処置マウス及びmActRIIA-Fc処置マウス由来の腎臓及び大動脈ホモジネートのウェスタンにおけるDkk1タンパク質発現によって表されたWntシグナル伝達(左)、並びに血漿Dkk1レベルに対するCKD-3及びmActRIIA-Fcの効果(右)を示している。

30

#### 【0070】

【図19】図19は、健常ドナー(n=10)と比べた、ステージ3のCKDを有する患者(n=30)における血漿アクチビン-Aレベルを示している。データは、試料を市販のELISAキット(R&D systems, Minneapolis, MN)を用いて2連で測定することにより作成された。このアッセイについて、変動係数は2.7%であった。\*\*\* $p < 0.002$ 、スクエア根t検定。

40

#### 【0071】

【図20】図20は、野生型マウス(WT)、模擬処置マウス(模擬)、CKD-3マウス(CKD-3 V)、又はmActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)におけるFGF-23のレベルを示している。

#### 【0072】

【図21】図21Aは、野生型マウス(WT)、模擬手術したマウス(模擬)、ビヒクルで処置し

50

たCKD-3マウス(CKD-3 V)、又はmActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)における循環アクチビンAのレベルを示している。<sup>\*</sup>は、 $p < 0.005$ を示している。図21Bは、模擬手術したマウス(模擬)、ビヒクルで処置したCKD-3マウス(CKD-3 V)、又はmActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)についての骨芽細胞数/骨周囲長数/100mmを示している。CKD-3 V対CKD-3について、 $p < 0.05$ 。図21Cは、模擬手術したマウス(模擬)、ビヒクルで処置したCKD-3マウス(CKD-3 V)、又はmActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)についての骨芽細胞面/骨面のパーセンテージを示している。CKD-3 V対CKD-3について、 $p < 0.05$ 。図21Dは、模擬手術したマウス(模擬)、ビヒクルで処置したCKD-3マウス(CKD-3 V)、又はmActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)についての骨形成速度/骨芽細胞を示している。CKD-3 V対CKD-3について、 $p < 0.05$ 。

10

## 【0073】

【図22】図22Aは、表示された用量のプラセボ又はmActRIIA-Fcで処置したときの研究の全期間を通した対象の内訳を示している。y軸上の各番号は、個々の対象を表している。図22Bは、表示された用量のプラセボ又はmActRIIA-Fcで処置したときに、その腹部大動脈合計アガットストンスコアが<15%進行した対象の比率を示している。図22Cは、表示された用量のプラセボ又はmActRIIA-Fcで処置したときに、大腿骨頸部皮質BMDが>2%増大した対象の比率を示している。

20

## 【0074】

【図23】図23Aは、ActRIIAの細胞外ドメインとIgG1のFcドメインのマウス融合タンパク質(mActRIIA-Fc)の模式図を示している。図23Bは、Idlr-/ -高脂肪食給餌マウスにおけるCKD-MBDに対するmActRIIA-Fc効果の実験設計を示している。4つの群のマウスに、12週(wks)齢から高脂肪食を給餌した。12週で、模擬手術(SO)又は電気焼灼皮質損傷(EC)のいずれかを行った。14週で、SO又は対側性腎摘出(NX)のいずれかを行った。22週齢で、皮下への、週2回、10mg/kgでのビヒクル処置又はmActRIIA-Fcを開始した。WT、正常な参照レベルを得るために通常食を取らせた野生型マウス。模擬、模擬手術したIdlr-/ -高脂肪食給餌マウス；CKD-3、処置開始時の血管カルシウムレベルを定めるために22週で調べたCKD-3 Idlr-/ -高脂肪食給餌マウス；CKD-3 V、ビヒクル処置したCKD-3 Idlr-/ -高脂肪食給餌マウス；CKD-3 R、mActRIIA-Fc処置したCKD-3 Idlr-/ -高脂肪食給餌マウス；WTマウス、模擬マウス、CKD-3 Vマウス、及びCKD-3 Rマウスは、28週齢で安楽死させた。

30

## 【0075】

【図24】図24Aは、大動脈ホモジネート中のActRIIAのウェスタンによって決定されたマウス大動脈におけるActRIIAの発現を示している。図24Bは、図24Aの免疫プロット定量を示している。この定量について、 $n = 4$ 、<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ 。図24Cは、模擬マウスの大動脈におけるActRIIAの免疫蛍光検出を示している。図24Dは、CKD-3マウスの大動脈におけるActRIIAの免疫蛍光検出を示している。ActRIIAは大動脈VSMC発現していたが、内皮細胞では検出されなかった。VSMC ActRIIAレベルは、模擬と比較して、CKDで検出可能であり続けた。CD31(矢印)は、内皮細胞マーカーとして使用した。核はDAPIによって染色した。スケールバーは20 μm。

30

## 【0076】

【図25】図25Aは、CKD-3が、骨芽細胞タンパク質(Runx2及びアルカリホスファターゼ(Alp))のmRNA発現の増大、並びに大動脈平滑筋細胞22 (Tagln)のレベルの減少(これらは全て、mActRIIA-Fcによる処置によって無効化された)を引き起こすことを示している。大動脈ミオカルディン(Myocd)レベルはCKDによって減少したが、mActRIIA-Fcによる影響は受けなかった。図25Bは、大動脈ホモジネート中のタンパク質のウェスタンを示している。図25Cは、図25Bのウェスタンの免疫プロット定量を示している。CKDは、大動脈 - 平滑筋細胞アクチンタンパク質のレベルの減少及び骨芽細胞Runx2のレベルの増大を引き起す。これらは、mActRIIA-Fcによる処置によって無効化されたが、ミオカルディンレベルは変化しなかった。この定量について、 $n = 4$ 、<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ 。

40

## 【0077】

【図26】図26Aは、ビヒクル由来のAlizarin Redによる近位大動脈アテローム性動脈硬

50

化性プラークの切片の染色を示した、CKD-3を有する $\text{Idl}^{-/-}$ -高脂肪食給餌マウスにおける大動脈石灰化に対するCKD及びActRIIAリガンドトラップの効果を示している。図26Bは、 $\text{Alizarin Red}$ で染色された近位大動脈アテローム性動脈硬化性プラークによって示された、CKD-3を有し、mActRIIA-Fcで処置された $\text{Idl}^{-/-}$ -高脂肪食給餌マウスにおける大動脈石灰化に対するCKD及びActRIIAリガンドトラップの効果を示している。矢尻は、内膜(i)におけるカルシウム沈着を示している；m-中膜。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。図26Cは、マウスの群：野生型(WT)；模擬手術した $\text{Idl}^{-/-}$ -高脂肪食給餌(模擬)；処置の開始時の22週で安樂させたCKD-3(CKD-3)；22～28週までビヒクリで処置したCKD-3(CKD-3 V)；22～28週まで、10mg/kgのmActRIIA-Fcで、週2回、皮下処置したCKD-3(CKD-3 R)における大動脈カルシウムレベルを示している。四角は、中央値(四角の中の線)及び25～75パーセンタイルの四分位数範囲を表している。エラーバーは、四分位数範囲の1.5倍を表している。群は、多重比較用のANOVA Holm-Sidak法を用いて比較し、 $p < 0.05$ を有意差の水準とした。 $^*p < 0.02$ ；各群についてのnは8～12。

10

## 【0078】

【図27】図27Aは、模擬処置マウス、CKD-3ビヒクリ処置マウス、及びCKD-3 mActRIIA-Fc処置マウス由来の大動脈ホモジネートのウェスタンによるActRIIAシグナル伝達の解析を示している。各群の動物の2つの大動脈由来のホモジネートの免疫プロット。ActRIIA及びアクチビン(インヒビン-A)レベルは、CKD-3マウス由来の大動脈ホモジネートで減少していた。AIk4(AcvR1B)及びAIk1(AcvRL1) 1型受容体は、大動脈ホモジネート中に存在していた。CKD-3は、大動脈におけるsmad2/3リン酸化を減少させ、これは、mActRIIA-Fc処置によって増大した。CKD-3は、ホスホErk 1/2レベルを減少させた。Runx2レベルはCKD-3によって増大し、mActRIIA-Fc処置によって正常化した。図27Bは、p-Smad2/3免疫プロット定量を示している。n = 4、 $^{**}p < 0.01$ 。

20

## 【0079】

【図28】図28Aは、野生型マウスの大動脈における $\beta$ -カテニン発現の免疫蛍光顕微鏡観察を示している。図28Bは、CKDマウスの大動脈における $\beta$ -カテニン発現の免疫蛍光顕微鏡観察を示している。 $\beta$ -カテニンの免疫蛍光は血管平滑筋細胞で見られなかった。 $\beta$ -カテニン発現はCKDマウス由来の大動脈の内皮で見られた。矢尻、内皮細胞における $\beta$ -カテニンとCD31の共局在。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。図28Cは、大動脈Axin2 mRNA発現レベルを示している。図28Dは、模擬処置マウス、CKD-3 V処置マウス、及びCKD-3 R処置マウス由来の大動脈ホモジネートのウェスタンにおけるDkk1タンパク質発現によって及び免疫プロット定量によって表されたWntシグナル伝達の解析を示している。n = 4。図28Eは、血漿Dkk1レベルに対するCKD-3V及びmActRIIA-Fcの効果を示している。 $^*p < 0.05$ 、 $^{**}p < 0.01$ 。

30

## 【0080】

【図29】図29Aは、腎臓klotho mRNAレベルに対するmActRIIA-Fc処置の効果を示し、かつCKD-3が腎臓ホモジネートにおけるklotho遺伝子発現レベルを減少させ、mActRIIA-Fc処置が、CKD-3Vと比較して、それらを有意に増大させたことを示している。 $^*p < 0.05$ 、 $^{**}p < 0.01$ 、 $^{***}p < 0.005$ 。図29Bは、模擬処置マウス、CKD-3ビヒクリ処置マウス、及びmActRIIA-Fc処置マウス由来の腎臓ホモジネートのウェスタンによるActRIIAシグナル伝達の解析を示している。免疫プロットは全て、3つ又は4つの腎臓由来のホモジネートを表したものである。ActRIIAレベルは、CKD-3によっても、mActRIIA-Fcによっても影響を受けなかった。アクチビンA(インヒビン-A)レベルは、CKD-3マウスの腎臓ホモジネートで増大し(定量は図30A～Bに示されている)、mActRIIA-Fcによって減少した。AIk4(AcvR1B)及びAIk2(AcvR1) 1型受容体は、腎臓ホモジネート中に存在していたが、CKD-3 VもCKD-3 Rも、AIk4リン酸化に有意な影響を及ぼさなかった。CKD-3は腎臓のsmad2/3リン酸化を増大させ、mActRIIA-Fc処置は、腎臓のホスホsmad2/3を減少させた。図29Cは、図29B)の免疫プロット定量を示している。 $^*p < 0.01$ 。

40

## 【0081】

【図30】図30Aは、CKD-3V mActRIIA-Fc処置マウス由来の腎臓切片の三重染色を示している。図30Bは、CKD-3V mActRIIA-Fc処置マウス由来の腎臓切片の三重染色を示している

50

。図30Cは、CKD-3V mActRIIA-Fc処置マウス由来の腎臓切片の三重染色を示している。図30Dは、CKD-3 mActRIIA-Fc処置マウス由来の腎臓切片の三重染色を示している。矢尻によって表された間質線維化の領域。CKD-3 mActRIIA-Fc処置マウスの腎臓は、間質線維化が減少していた。スケールバーは50 μm。顕微鏡写真切片をどこから取得したのかということに関する全腎臓冠状切片の表示については、図35を参照されたい。図30Eは、尿タンパク質に対するmActRIIA-Fcの効果を示している。CKD-3Vマウスで顕著なタンパク尿が見られ、これは、mActRIIA-Fc処置によって減少した。<sup>\*</sup>p < 0.05。

#### 【0082】

【図31】図31Aは、アテローム性動脈硬化症の $ldlr^{-/-}$ 高脂肪食給餌CKD-3マウスにおけるCKDによる循環アクチビン-Aの誘導を示している。図31Bは、本明細書に記載のアルポート症候群マウスにおけるCKDによる循環アクチビン-Aの誘導を示している。図31Cは、マウス腎臓におけるインヒビン A( $Inhba$ ) mRNA発現を示している(アクチビン-Aは、インヒビン Aのホモ二量体から形成される)。図31Dは、腎臓ホモジネート中のインヒビン -Aのウェスタンを示している。図31Eは、図31Dの免疫プロット定量を示している。免疫プロット定量について、n = 6; <sup>\*</sup>p < 0.05、<sup>\*\*</sup>p < 0.01、<sup>\*\*\*</sup>p < 0.005。

10

#### 【0083】

【図32】図32Aは、模擬における腎臓 $InhbA$ 免疫染色を示している。図32Bは、CKD-3ビヒクルマウスにおける腎臓 $InhbA$ 免疫染色を示している。模擬マウスでは、時折見られる尿細管周囲間質細胞がアクチビン-Aを発現しているが、CKD-3マウスでは、はるかに多くの尿細管周囲間質細胞が、様々な強度レベルで、アクチビン-Aについて陽性である。スケールバーは50 μm。

20

#### 【0084】

【図33】図33A及び図33Bは、ヒトのステージ3腎疾患と類似したマウスにおける慢性腎疾患を示している。ヒトCKDの病期診断と同様の方法で、CKDをマウスモデルで病期診断した。方法(第9.10.1節)に記載されているような切除性CKDを有する血管石灰化のモデルを用いて、GFRがWT C57B6マウス(WT)と比較して70%低下していることがイヌリンクリアランス及びBUNによって推定される、CKD-3(ビヒクル処置したものについては、CKD-3 V)と呼ばれるヒトCKDのステージ3と同様の腎臓機能の減少をもたらした。10mg/kgのmActRIIA-FcによるCKD-3マウスの週2回の皮下処置(CKD-3 R)は、イヌリンクリアランスにもBUNにも効果がなかった。

30

#### 【0085】

【図34】図34は、Tsuchidaらの文献(Cell Comm. and Signaling, 2009)からのActRIIAシグナル伝達の図表示を示している。II型受容体のActRIIA(主に、アクチビンに対するもの)並びにActRIIB(主に、ミオスタチン及びGDF11に対するもの)に対するアクチビン、ミオスタチン、及びGDF11の結合は、smad 2,3を介する標準的経路を含む、シグナル伝達経路を活性化する。

30

#### 【0086】

【図35】図35A及び図35Bは、CKD-3ビヒクル処置マウスの腎臓(腎臓三重染色)を示している。図35C及び図35Dは、CKD-3 mActRIIA-Fc処置マウスの腎臓(腎臓三重染色)を示している。スケールバーは1mm。電気焼灼損傷による皮質面の傷が矢尻によって表されている。矢印は、図36の高倍率顕微鏡写真が撮影された点を表している。スケールバーは1mm。

40

#### 【0087】

【図36】図36Aは、WTマウス及び模擬マウスと比較して、CKD-3マウスで、循環フォリスタチンレベルに変化がないことを示している。図36Bは、WTマウス及び模擬マウスと比較して、CKD-3マウスで、循環フォリスタチン様3(Fstl3)レベルに変化がないことを示している。

#### 【0088】

【図37】図37は、CKD-3マウスの組織におけるアクチビン受容体相互作用タンパク質(Arip1及びArip2)のレベルを示している。Arip1は、CKD-3マウスの残存腎臓で強く発現しており、Arip2発現よりも2倍を超えて大きい。Arip1は、CKD-3マウスの大動脈で低いレベル

50

で発現しており、一方、大動脈におけるArip2発現は、Arip1の発現の2倍である。

【発明を実施するための形態】

【0089】

(8. 詳細な説明)

(8.1 概説)

本明細書に提供されるのは、一態様において、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患、高いレベルの動脈壁硬化及び/もしくは左心室肥大(LVH)と関連し並びに/又は高いレベルの動脈壁硬化及び/もしくはLVHに起因する心血管疾患を含む高いレベルの動脈壁硬化(例えば、血管コンプライアンスの減少によって示されるもの)及び/又はLVHの治療及び/又は予防方法であって、ActRIIシグナル伝達のインヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を、その治療及び/又は予防を必要としている対象に投与することを含む、方法である。ある実施態様において、該対象は、腎疾患対象である。ActRIIシグナル伝達のインヒビターは、ActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達のインヒビターであることができる。

【0090】

特に、本明細書に提供されるのは、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を、患者集団の指標として、ActRIIシグナル伝達インヒビターによる治療及び/もしくは予防に対する対象の応答性の指標として、ActRIIシグナル伝達インヒビターによる治療の効力の指標として、又はActRIIシグナル伝達インヒビターによる治療のための適切な投薬量の指標として用いることにより、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患、高いレベルの動脈壁硬化、並びに/又は左心室肥大(LVH)を治療及び/又は予防する方法である。Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を用いて、ActRIIシグナル伝達インヒビターによる治療及び/又は予防のための疾患及び/又は状態を特定することもできる。本明細書に記載の方法で使用されるActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達のインヒビター、例えば、本明細書に記載の又は当技術分野で公知のインヒビターのいずれかができる。好ましい実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAの細胞外ドメイン及びヒトIgG1 Fcドメインからなるヒト化融合タンパク質(「ActRIIA-Fc」、例えば、配列番号7)である。

【0091】

本明細書に提供される方法は、野生型マウスと比較したとき、慢性腎疾患誘導性血管石灰化のマウスモデルでは、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及びOsterixのレベルが上昇しており、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及びSm22- のレベルが減少しているという発見に一部基づいている。さらに、理論によって制限されるものではないが、mActRIIA-Fcによるリガンドトラッピングは、慢性腎疾患マウスモデル(Idlr-/マウス、高脂肪食)で血管石灰化を低下させる。本明細書に提示される実施例(第9節参照)で示されるように、mActRIIA-Fcによる慢性腎疾患マウスの処置は、血管石灰化を低下させ、大動脈カルシウムレベルを低下させ、ホスホsmad3レベルを低下させ、尿タンパク質レベルを低下させ、ホスホsmad2レベルを低下させ、Dkk1レベルを低下させ、Runx2レベルを低下させ、Alpレベルを低下させ、BSAPレベルを低下させ、CTXレベルを低下させ、Osterixレベルを低下させ、Klothoレベルを上昇させ、-SMAレベルを上昇させ、Axin2レベルを上昇させ、Sm22- レベルを上昇させた。さらに、本明細書に提供される方法は、mActRIIA-Fcで処置したときの慢性腎疾患マウスにおける血管石灰化の減少が、Dkk1、ホスホsmad2

10

20

30

40

50

、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixレベルの減少、並びにKlotho、-SMA、Axin2、及び/又はSm22- レベルの増大と相關しているという発見に一部基づいている(実施例、第9節を参照されたい)。まとめると、本明細書に提示されるデータは、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルによって、どの対象がActRIIA-Fcに応答し得るかということを特定することができ、並びに/又は該レベルを用いて、ActRIIAシグナル伝達インヒビターに対する臨床応答をモニタリングし及び/もしくは標的患者集団を選択することができることを示している。本明細書に提示されるデータは、ActRIIA-Fc(例えば、mActRIIA-Fc、又はActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)が、慢性腎疾患と関連する血管石灰化を治療するのに有用であることも示している。さらに、本明細書に提示されるデータは、ActRIIA-Fc(例えば、mActRIIA-Fc、又はActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)が、上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベルと関連する疾患、又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベルと関連する疾患を治療するのに有用であることも示している。最後に、本明細書に提示されるデータは、ActRIIA-Fc(例えば、mActRIIA-Fc、又はhActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)が、大動脈アテロームにおけるカルシウム沈着を減少させ、大動脈カルシウムレベルを低下させ、CKD誘導性の心重量の増大を無効化し、腎線維化を減少させるのに有用であり、したがって、心血管疾患を治療するのに有用であることを示している。

#### 【0092】

実施例(第9節参照)に例示されている、本明細書に記載の研究結果は、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、又はSm22- のレベル及び/又は活性の検出を、(i)対象における血管石灰化の度合いのマーカー(例えば、血清バイオマーカー)として、(ii)ActRIIAシグナル伝達インヒビター(例えば、ActRIIA-Fc)に対する対象の応答を測定するためのマーカーとして、又は(iii)治療後の対象におけるActRIIAシグナル伝達インヒビター(例えば、ActRIIA-Fc)の薬力学的效果を評価するために使用できることを示しており、ここで、対象は、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患有する対象である。したがって、ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、Axin2、及び/又はSm22- を、ActRIIA-Fc(例えば、ActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)治療の効力の指標として及び/又はActRIIA-Fc(例えば、ActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)による治療に対する応答の欠如の指標として、本明細書に記載の方法で使用することができる。さらに、本明細書に記載されているように、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- を、ActRIIA-Fc(例えば、ActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)の経時的治療効力を評価するための信頼できる分子マーカーとして使用することができる。さらに、具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、血液中のSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性の検出(例えば、血管平滑筋細胞機能の障害と関連する疾患における異常発現の検出)、並びにSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性に依存する用量でのActRIIAシグナル伝達インヒビター、例えば、ActRIIA-Fcの投与を含む方法である

10

20

30

40

50

。

### 【0093】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ソタテルセプト(配列番号7; 例えば、第9節参照)である。ソタテルセプトは、本明細書に記載の方法で有用であるアクチビンリガンドトラップである(第8節参照)。

### 【0094】

#### (8.2 略語)

本明細書で使用されるように、「Snai 1」又は「Snai1」は、snai1ホモログ1を指す。例えば、Twigg及びWilkieの文献、1999, Hum Genet. 105(4):320-326を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号NM\_005985.3は、例示的なヒトSnai1核酸配列を提供する。  
GenBank(商標)アクセッション番号NP\_005976.2は、例示的なヒトSnai1アミノ酸配列を提供する。

10

### 【0095】

本明細書で使用されるように、「ホスホsmad3」は、デカペントプレジック(decapentaplegic)ホモログ3に対するリン酸化母体を指す。例えば、Matsuzakiの文献、2013, Cytokine Growth Factor Rev, 24(4):385-399を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号NM\_005902.3は、例示的なヒトホスホsmad3核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセッション番号NP\_005893.1は、例示的なヒトホスホsmad3アミノ酸配列を提供する。

### 【0096】

本明細書で使用されるように、「ホスホsmad2」は、デカペントプレジックホモログ2に対するリン酸化母体を指す。例えば、Matsuzakiの文献、2013, Cytokine Growth Factor Rev, 24(4):385-399を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号NM\_001003652.3は、例示的なヒトホスホsmad2核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセッション番号NP\_001003652.1は、例示的なヒトホスホsmad2アミノ酸配列を提供する。

20

### 【0097】

本明細書で使用されるように、「Dkk1」は、dickkopf関連タンパク1を指す。例えば、Fang, Y.らの文献、2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号NM\_012242.2は、例示的なヒトDkk1核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセッション番号NP\_036374.1は、例示的なヒトDkk1アミノ酸配列を提供する。

30

### 【0098】

本明細書で使用されるように、「col1a1」は、コラーゲン1型、1を指す。例えば、Korkkoらの文献、1998, Am. J. Hum. Genet., 62:98-110を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号XM\_005257059.2は、例示的なヒトcol1a1核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセッション番号XP\_005257116.2は、例示的なヒトcol1a1アミノ酸配列を提供する。

### 【0099】

本明細書で使用されるように、「Runx2」は、runt関連転写因子2を指す。例えば、Komoriの文献、2010, Adv Exp Med Biol, 658:43-49を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号NM\_001145920.2は、例示的なヒトRunx2核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセッション番号NP\_001139392.1は、例示的なヒトRunx2アミノ酸配列を提供する。

40

### 【0100】

本明細書で使用されるように、「Alp」又は「Alpl」は、アルカリホスファターゼを指す。本明細書で使用されるように、「BSAP」は、骨特異的アルカリホスファターゼを指す。例えば、Martinsらの文献、2013, Bone, 56(2):390-397を参照されたい。GenBank(商標)アクセッション番号NM\_000478.4は、例示的なヒトAlp核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセッション番号NP\_000469.3は、例示的なヒトAlpアミノ酸配列を提供する。

### 【0101】

本明細書で使用されるように、「CTX」は、C末端テロペプチドI型コラーゲンを指す。例えば、Rosenらの文献、2000, Calcif Tissue Int. 66(2): 100-103を参照されたい。

### 【0102】

50

本明細書で使用されるように、「Osterix」は、Sp7転写因子としても知られる、Osterixを指す。例えば、Caoらの文献、2005, Cancer Res. 65(4):1124-1128を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_001173467.2は、例示的なヒトOsterix核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_001166938.1は、例示的なヒトOsterixアミノ酸配列を提供する。

#### 【0103】

本明細書で使用されるように、「Klotho」は、Klothoを指す。例えば、Matsumuraらの文献、1998, Biochem Biophys Res Commun, 242:626-630を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_004795.3は、例示的なヒトKlotho核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_004786.2は、例示的なヒトKlothoアミノ酸配列を提供する。

10

#### 【0104】

本明細書で使用されるように、「 $\alpha$ -SMA(alpha-SMA)」又は「SMA」又は「 $\alpha$ -SMA」は、平滑筋アクチンを指す。例えば、Nowakらの文献、1999, Nat. Genet. 23:208-212を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_001100.3は、例示的なヒト $\alpha$ -SMA核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_001091.1は、例示的なヒト $\alpha$ -SMAアミノ酸配列を提供する。

#### 【0105】

本明細書で使用されるように、「MYOCD」は、ミオカルディンを指す。例えば、Imamuraらの文献、2010, Gene, 464:1-10を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_001146312.2は、例示的なヒトMYOCD核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_001139784.1は、例示的なヒトMYOCDアミノ酸配列を提供する。

20

#### 【0106】

本明細書で使用されるように、「Sm22- $\alpha$  (Sm22-alpha)」又は「Sm22 $\alpha$ 」又は「Sm22-」は、「トランスゲリン」、「Tagln」、又は「Tagln1」としても知られる、平滑筋タンパク質22 $\alpha$ を指す。例えば、Camoretti-Mercadoの文献、1998, Genomics, 49:452-457を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_001001522.1は、例示的なヒトSm22-核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_001001522.1は、例示的なヒトSm22- $\alpha$ アミノ酸配列を提供する。

#### 【0107】

本明細書で使用されるように、「ActRII」は、アクチビン受容体II型を指す。本明細書で使用されるように、「ActRIIA」は、アクチビン受容体IIA型を指す。例えば、Mathews及びValeの文献、1991, Cell 65:973-982を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_001278579.1は、例示的なヒトActRIIA核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_001265508.1は、例示的なヒトActRIIAアミノ酸配列を提供する。本明細書で使用されるように、「ActRIIB」は、アクチビン受容体IIB型を指す。例えば、Attisanoらの文献、1992, Cell 68: 97-108を参照されたい。GenBank(商標)アクセション番号NM\_001106.3は、例示的なヒトActRIIB核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_001097.2は、例示的なヒトActRIIBアミノ酸配列を提供する。

30

#### 【0108】

本明細書で使用されるように、「Axin2」は、軸インヒビター2を指す。GenBank(商標)アクセション番号NM\_004655.3は、例示的なヒトAxin2核酸配列を提供する。GenBank(商標)アクセション番号NP\_004646.3は、例示的なヒトアミノ酸配列を提供する。

40

#### 【0109】

本明細書で使用されるように、「mActRIIA-Fc」又は「ActRIIA-mFc」は、マウスアクチビンIIA型受容体-IgG1融合タンパク質を指す。例えば、米国特許第8,173,601号を参照されたい。本明細書で使用されるように、「mActRIIB-Fc」又は「ActRIIB-mFc」は、マウスアクチビンIIB型受容体-IgG1融合タンパク質を指す。例えば、米国特許第8,173,601号を参照されたい。本明細書で使用されるように、「hActRIIA-Fc」又は「ActRIIA-hFc」は、ヒトアクチビンIIA型受容体-IgG1融合タンパク質を指す。例えば、米国特許第8,173,601号を参照されたい。本明細書で使用されるように、「hActRIIB-Fc」又は「ActRIIB-hFc」

50

は、ヒトアクチビンIIB型受容体-IgG1融合タンパク質を指す。例えば、米国特許第8,173,601号を参照されたい。

【0110】

本明細書で使用されるように、「LVH」は、左心室肥大を指す。

【0111】

(8.3 治療及び/又は予防方法)

(8.3.1 心血管疾患及び/又は血管石灰化)

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患、高いレベルの動脈壁硬化、左心室肥大、左心室肥大と関連し及び/もしくは左心室肥大に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、対象は、腎疾患対象である。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されている。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されていない。

10

【0112】

ある実施態様において、対象は、参照集団におけるRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したRunx2のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したAlpのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したSnai1のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、参照集団における尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇した尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したDkk1のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したcol1a1のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したBSAPのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したCTXのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したOsterixのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したKlothoのレベル及び/もしくは活性、参照集団における-SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少した-SMAのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるMYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したMYOCDのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるSm22-のレベル及び/もしくは活性と比較して減少したSm22-のレベル及び/もしくは活性;並びに/又は参照集団におけるActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したActRIIAのレベル及び/もしくは活性を有する。

20

30

40

【0113】

ある実施態様において、対象は、対象における事前のRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したRunx2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したAlpのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したSnai1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、対象における事前

50

の尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇した尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したDkk1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したcol1a1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したBSAPのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したCTXのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したOsterixのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したKlothoのレベル及び/もしくは活性、対象における事前の-SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少した-SMAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のMYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したMYOCDのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したActRIIAのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は対象における事前のSm22- のレベル及び/もしくは活性と比較して減少したSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、対象における事前のRunx2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAlpのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のSnai1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、対象における事前の尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のDkk1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のcol1a1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のBSAPのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のCTXのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のOsterixのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のKlothoのレベル及び/もしくは活性、対象における事前の-SMAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のMYOCDのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のActRIIAのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は対象における事前のSm22- のレベル及び/もしくは活性は、(i)心血管疾患;(ii)血管石灰化;(iii)血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患;(iv)腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患;(v)高いレベルの動脈壁硬化;並びに/又は左心室肥大(LVH)の症状の発症又はこれら疾患の診断の1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24、又は48カ月前のそれぞれのレベルである。

#### 【0114】

ある実施態様において、対象は、第8.3.4節に記載されているような方法に従って治療される。ある実施態様において、対象における血管石灰化は、第8.6節に記載されているようなアガットストンスコアを測定することにより解析される。

#### 【0115】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療されるべき対象は、第8.6節に記載されているようなSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を有する。したがって、ある具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法は、(i)第8.6節に記載されているようなSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性に基づいて対象を選択すること;並びに(ii)ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含む。具体的な実施態様において、対象は、心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患有する。

10

20

30

40

50

起因する心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、腎疾患有する。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患有伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されている。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患有伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されていない。ある実施態様において、対象における血管石灰化は、第8.6節に記載されているようなアガットストンスコアを測定することにより解析される。具体的な実施態様において、対象は、高いレベルの動脈壁硬化と診断されている。具体的な実施態様において、対象は、LVHと診断されている。具体的な実施態様において、対象は、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、LVHと関連し及び/又はLVHに起因する心血管疾患有する。

10

## 【0116】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているように決定される。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のタンパク質レベル及び/又は活性である。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のmRNAレベル及び/又は活性である。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、及び/又はActRIIA、Axin2、-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好みの実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22-、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2のレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好みの実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好みの実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。ある実施態様において、アクチビンのレベルは、参照集団に対して対象で上昇している。ある実施態様において、対象におけるフォリスタチンのレベルは、参照集団におけるフォリスタチンのレベルとほぼ等しい。

20

30

30

## 【0117】

ある実施態様において、参照集団は、第8.6節に記載されているような集団である。ある実施態様において、対象は、第8.4節に記載されているような対象である。

40

## 【0118】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIA-Fc、例えば、ActRIIA-hFc(例えば、配列番号7)である。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第8.5節に記載されているようなActRIIシグナル伝達インヒビターである。

50

## 【0119】

ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているような用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、初回用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているような頻度で投与される。ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているように投与される。

【 0 1 2 0 】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、第8.8節に記載されているような、第2の医薬活性剤と組み合わせて利用される。

【 0 1 2 1 】

ある実施態様において、心血管疾患又は慢性腎疾患との関連における「治療する(treat)」、「治療」、又は「治療する(treating)」は、それぞれ、心血管疾患又は慢性腎疾患の少なくとも1つの症状の改善を含む。

[ 0 1 2 2 ]

当業者によって認識されているように、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-

10

、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数のレベル及び/又は活性を、それぞれ、対応する参照集団における該レベル及び/又は活性と比較することができる。し

たがって、ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、ア  
クチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRI

IA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの1つのレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において Runx2、Alp、Spai1

あるので、各反応は活性を比較する。ある実施意様において、RankX2、Atp、Smad1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYO CD、Smad3、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尾尾シルバ質のうちの2つのレベル及

CD、Sm22-<sup>-</sup>、小鼠 Smad3、ActRIIA、AktII<sup>2</sup>、及び豚タブハグ質のうちの2つのレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様における下記の値は、AktII<sup>2</sup>、Smad3、ActRIIA、AktII<sup>2</sup>、Sm22-<sup>-</sup>、及ぶ二種の Smad3 が各々約 1.00 の活性を示すことを示す。

懸様において、Ranx2、Alp、SnaT1、小スモウマド2、Dkk1、colla1、アクトビン、BSAP、C1X、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホスモウマド3、ActRIIA、Axin2、及び尿

タンパク質のうちの3つのレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk

1、*col1a1*、アクチビン、BSAP、CTX、*osterix*、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの3つのレベル及び/又は活性を対応

する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho

o、 -SMA、 MYOCD、 Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの4つのレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較

する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、

Axin2、及び尿タンパク質のうちの5つのレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホ

スホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-エヌスホsmad3、ActRIIA、Axin2 及び尾タンパク質のうちの6つのレベル及び又

は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2, Alp, Snp1, 来ス来smad2, Dkk1, col121, アクチニン, BSAP, CTX, C

にて、Ranx2、Atp、Shh、ホスホsmad2、DKK1、Cortat、ソクソビン、Bax、GIX、sterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの2つの上ベル乃びく又は活性を対応する参照集団におけるその上ベル乃びく

又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、

colla1、アクチニン、BSAP、CIX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの8つのレベル及び/又は活性を対応する

参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、

-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの9つのレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する

。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin

2、及び尿タンパク質のうちの10のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsm

20

30

40

50

ad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの11のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの12のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの13のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの14のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの15のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの16のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質のうちの17のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。ある実施態様において、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質の各々のレベル及び/又は活性を対応する参照集団におけるそのレベル及び/又は活性と比較する。  
10

#### 【 0 1 2 3 】

(8.3.2 Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- と関連する疾患)  
30

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- と関連する1以上の疾患を治療及び/又は予防する方法であって、対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含む、方法である。

#### 【 0 1 2 4 】

ある実施態様において、対象は、第8.4節に記載されているような対象である。

#### 【 0 1 2 5 】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIA-Fc、例えば、ActRIIA-hFc(例えば、配列番号7)である。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第8.5節に記載されているようなActRIIシグナル伝達インヒビターである。

#### 【 0 1 2 6 】

ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているような用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、初回用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているような頻度で投与される。ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているように投与される。ある実施態様において、医薬有効用量は、本明細書に記載されているような特定のバイオマーカーのレベル及び/又は活性に応じて調整される。  
40  
50

## 【0127】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、第8.8節に記載されているような、第2の医薬活性剤と組み合わせて利用される。

## 【0128】

## (8.3.3 慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常)

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を治療する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における骨吸収を低下させる方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの医薬有効用量を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、対象は、心血管疾患有する。ある実施態様において、対象は、血管石灰化を有する。ある実施態様において、対象は、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する心血管疾患有する。ある実施態様において、対象は、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する心血管疾患有する。ある実施態様において、対象は、腎疾患対象である。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されている。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されていない。

10

## 【0129】

ある実施態様において、対象は、参照集団におけるRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したRunx2のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したAlpのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したSnai1のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、参照集団における尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇した尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したDkk1のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したcol1a1のレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したBSAPのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したCTXのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したOsterixのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したKlothoのレベル及び/もしくは活性、参照集団における-SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少した-SMAのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるMYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したMYOCDのレベル及び/もしくは活性、参照集団におけるActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したActRIIAのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は参照集団におけるSm22- のレベル及び/もしくは活性と比較して減少したSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又は-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好ましい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、Osterix、sm22-、Klotho、-SMA、MYOCD、及び/又はActRIIAのレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好ましい実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、及びcol1a1、並びに/又はActRIIAのレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好ましい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。

20

30

40

50

るものである。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ActRIIA、及び/又は-SMAのレベルは、大動脈におけるものである。

#### 【0130】

ある実施態様において、対象は、対象における事前のRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したRunx2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したAlpのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したSnai1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、対象における事前の尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇した尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したDkk1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したcol1a1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したBSAPのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したCTXのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したOsterixのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したKlothoのレベル及び/もしくは活性、対象における事前-SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少した-SMAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前-MYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したMYOCDのレベル及び/もしくは活性、対象における事前-ActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したActRIIAのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は対象における事前-Sm22-のレベル及び/もしくは活性と比較して減少したSm22-のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、対象における事前のRunx2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAlpのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のSnai1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、対象における事前の尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のDkk1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のcol1a1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のBSAPのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のCTXのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のOsterixのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のKlothoのレベル及び/もしくは活性、対象における事前-SMAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前-MYOCDのレベル及び/もしくは活性、対象における事前-ActRIIAのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は対象における事前-Sm22-のレベル及び/もしくは活性は、CKD-MBDの症状の発症又はCKD-MBDの診断の1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24、又は48カ月前のそれぞれのレベルである。

#### 【0131】

ある実施態様において、対象は、第8.3.4節に記載されているような方法に従って治療される。ある実施態様において、対象における血管石灰化は、第8.6節に記載されているようなアガットストンスコアを測定することにより解析される。

#### 【0132】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療されるべき対象は、第8.6節に記載されているようなSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を有する。

10

20

30

40

50

したがって、ある具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法は、(i)第8.6節に記載されているようなSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性に基づいて対象を選択すること;並びに(ii)ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含む。具体的な実施態様において、対象は、心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、血管石灰化を有する。具体的な実施態様において、対象は、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、腎疾患を有する。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されている。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されていない。具体的な実施態様において、対象は、高いレベルの動脈壁硬化を有する。具体的な実施態様において、対象は、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患有する。具体的な実施態様において、対象は、LVHを有する。具体的な実施態様において、対象は、LVHと関連し及び/又はLVHに起因する心血管疾患有する。

## 【0133】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているように決定される。ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixのレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又は-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好ましい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22-、Klotho、-SMA、ActRIIA、Axin2、及びMYOCDのレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好ましい実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好ましい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又はSm22- のタンパク質レベル及び/又は活性である。

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、及び/又はSm22- のmRNAレベル及び/又は活性である。ある実施態様において、アクチビンのレベルは、参照集団に対して対象で上昇している。ある実施態様において、対象におけるフォリストチンのレベルは、参照集団におけるフォリストチンのレベルとほぼ等しい。

## 【0134】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、参照集団は、第8.6節に記載されているような集団である。ある実施態様において、対象は、第8.4節に記載されているような対象である。

#### 【0135】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIA-Fc、例えば、ActRIIA-hFc(例えば、配列番号7)である。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第8.5節に記載されているようなActRIIシグナル伝達インヒビターである。

#### 【0136】

ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているような用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、初回用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているような頻度で投与される。ある実施態様において、医薬有効用量は、第8.7節に記載されているように投与される。

10

#### 【0137】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、第8.8節に記載されているような、第2の医薬活性剤と組み合わせて利用される。

#### 【0138】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)の医薬有効用量を投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.13mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を14日に1回の間隔で皮下投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.26mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を14日に1回の間隔で皮下投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.3mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を28日に1回の間隔で皮下投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.5mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を28日に1回の間隔で皮下投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.7mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を28日に1回の間隔で皮下投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.1mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を14日に1回の間隔で静脈内投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における末期腎疾患を治療する方法であって、該対象に、0.2mg/kgのActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドトラップ)を14日に1回の間隔で皮下投与することを含む、方法であり、ここで、該対象は、血液透析を受けており、かつ該対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIA-hFc(配列番

20

30

40

50

号7)である。

【0139】

(8.3.4 調整された投与量)

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性をさらに用いて、(i)対象にとっての適切な投与量を評価し(ここで、該対象は、治療を受けるべき候補であるか、もしくはActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、アクチビンリガンドドラップ)による治療を受けている);(ii)治療中にActRIIシグナル伝達インヒビターの投薬量を調整するかどうかを評価し;及び/又は(iii)ActRIIシグナル伝達インヒビターの適切な維持用量を評価することができる。Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性が、参照集団における該レベル及び/又は活性よりも大きいか又はそれよりも小さい場合、ActRIIシグナル伝達インヒビターの投与を、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性に応じて、開始し、増大させ、低下させ、遅延させ、又は中止することができる。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患、CKD-MBD、高いレベルの動脈壁硬化、LVH、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患、並びに/又はLVHと関連し及び/もしくはLVHに起因する心血管疾患を治療及び/又は予防する方法であって、(i)該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの初回用量を投与すること;(ii)対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性の1回目の測定を行うこと;(iii)しばらくして、対象におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性の2回目の測定を行うこと;並びに(iv)該対象に、ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量を投与することを含む。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIA-Fc、例えば、ActRIIA-hFc(例えば、配列番号7)である。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第8.5節に記載されているようなActRIIシグナル伝達インヒビターである。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されている。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されていない。ある実施態様において、対象における血管石灰化は、第8.6.6節に記載されているようなアガットストンスコアを測定することにより解析される。ある実施態様において、調整用量は、1回目の測定と2回目の測定の間の検出された変化に基づく。

【0140】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているように決定される。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性は、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はSm22-のタンパク質レベル及び/又は活性で

10

20

30

40

50

ある。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性は、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のmRNAレベル及び/又は活性である。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又は-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好ましい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22-、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、又はAxin2のレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好ましい実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好ましい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。ある実施態様において、アクチビンのレベルは、参照集団に対して対象で上昇している。ある実施態様において、フォリスタチンのレベルは、参照集団に対して対象で正常である。ある実施態様において、対象における血管石灰化は、第8.6節に記載されているようなアガットストンスコアを測定することにより解析される。

10

20

30

40

50

#### 【0141】

ある実施態様において、参照集団は、第8.6節に記載されているような集団である。ある実施態様において、対象は、第8.4節に記載されているような対象である。

#### 【0142】

ある実施態様において、初回用量は、第8.7節に記載されているような用量である。ある実施態様において、初回用量は、第8.7節に記載されているような頻度で投与される。ある実施態様において、初回用量は、第8.7節に記載されているように投与される。

#### 【0143】

ある実施態様において、1回目の測定及び/又は2回目の測定は、第8.6節に記載されているように行われる。ある実施態様において、1回目の測定は、治療の開始前に行われる。ある実施態様において、1回目の測定は、治療の開始後又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは2ヶ月以内に行われる。ある実施態様において、2回目の測定は、治療の開始直後又は最大でもその1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、又は12ヶ月以内に行われる。

#### 【0144】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量は、Runx2のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、Alpのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、Snai1のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、ホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、ホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性が参照集団における尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、Dkk1のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、col1a1のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、BSAPのレベル及び/もしくは活性が参照

集団におけるBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、CTXのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、Osterixのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、Klothoのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、-SMAのレベル及び/もしくは活性が参照集団における-SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、MYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、ActRIIAのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、Axin2のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるAxin2のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、並びに/又はSm22- のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるSm22- のレベル及び/もしくは活性と比較して減少している場合、初回用量よりも多い。ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixのレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、減少したKlotho、-SMA、ALP、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又は-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好みしい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22-、Klotho、-SMA、ActRIIA、Axin2、及びMYOCDのレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好みしい実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好みしい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。

#### 【0145】

ある実施態様において、調整用量は、第8.7節に記載されているような用量である。ある実施態様において、調整用量は、第8.7節に記載されているような頻度で投与される。ある実施態様において、調整用量は、第8.7節に記載されているように投与される。

#### 【0146】

ある実施態様において、対象は、対象における事前のRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したRunx2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したAlpのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したSnai1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、対象における事前の尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇した尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したDkk1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したcol1a1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したBSAPのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したCTXのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇したOsterixのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したKlothoのレベル及び/もしくは活性、対象における事前の-SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少した-SMAのレベル及び/もしくは活性、対象における事

10

20

30

40

50

前のMYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したMYOCDのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して減少したActRIIAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAxin2のレベル及び/もしくは活性と比較して減少したAxin2のレベル及び/もしくは活性、並びに/又は対象における事前のSm22-

のレベル及び/もしくは活性と比較して減少したSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、対象における事前のRunx2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAlpのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のSnai1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性、対象における事前の尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のDkk1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のcol1a1のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のBSAPのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のCTXのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のOsterixのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のKlothoのレベル及び/もしくは活性、対象における事前の-SMAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のMYOCDのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のActRIIAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のActRIIAのレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAxin2のレベル及び/もしくは活性、対象における事前のAxin2のレベル及び/もしくは活性、並びに/又は対象における事前 Sm22- のレベル及び/もしくは活性は、(i)心血管疾患;(ii)血管石灰化;(iii)血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患;(iv)腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患;(v)CKD-MBD;(vi)高いレベルの動脈壁硬化;(vii)LVH;(viii)高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患;並びに/又は(ix)LVHと関連し及び/もしくはLVHに起因する心血管疾患の症状の発症又はこれらの疾患の診断の1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24、又は48カ月前のそれぞれのレベルである。

#### 【0147】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの調整用量(例えば、アクチビンリガンドトラップ)は、Runx2のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるRunx2のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、Alpのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるAlpのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、Snai1のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるSnai1のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、ホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるホスホsmad2のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、ホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるホスホsmad3のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性が参照集団における尿タンパク質のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、Dkk1のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるDkk1のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、col1a1のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるcol1a1のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、BSAPのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるBSAPのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、CTXのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるCTXのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、Osterixのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して減少しており、Klothoのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるKlothoのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、-SMAのレベル及び/もしくは活性が参照集団における -SMAのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、MYOCDのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるMYOCDのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、ActRIIAのレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるActRIIAのレベル及び/もしくは活性と比較して上昇しており、Axin2のレベル及び/もしくは活性が参照集団におけるAxin2のレベル及び/もし

10

20

30

40

50

くは活性と比較して上昇しており、並びに/又はSm22- のレベル及び/もしくは活性が参考集団におけるSm22- のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇している場合、初回用量よりも少ない。ある実施態様において、上昇したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、減少したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はOsterixのレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及び/又は-SMAのレベルは、組織におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好ましい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22-、Klotho、-SMA、ActRIIA、Axin2、及びMYOCDのレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好ましい実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好ましい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、Sm22-、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又は-SMAのレベルは、大動脈におけるものである。

10

20

30

40

50

#### 【0148】

ある実施態様において、参考集団は、第8.6節に記載されているような集団である。ある実施態様において、調整用量は、第8.7節に記載されているような用量である。ある実施態様において、調整用量は、第8.7節に記載されているような頻度で投与される。ある実施態様において、調整用量は、第8.7節に記載されているように投与される。

#### 【0149】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、第8.8節に記載されているような、第2の医薬活性剤と組み合わせて利用される。

#### 【0150】

当業者によって認識されているように、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数のレベル及び/又は活性を、独立にかつそれぞれ、対応する参考集団における該レベル及び/又は活性、例えば、上の第8.3.1節に記載のものと比較することができる。

#### 【0151】

##### (8.4 患者集団)

本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、任意の哺乳動物、例えば、齧歯類及び靈長類、及び好ましい実施態様においては、ヒトであることができる。ある実施態様において、本明細書に記載の方法を用いて、任意の哺乳動物、例えば、齧歯類及び靈長類、及び好ましい実施態様においては、ヒト対象において、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患、高代謝回転ROD、高いレベルの動脈壁硬化、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患、LVH、並びに/又はLVHと関連し及び/もしくはLVHに起因する心血管疾患を治療し;或いは血管石灰化、動脈(例えば、血管)硬化、LVH、大動脈カルシウムレベル、内皮間葉転換、及び/もしくは骨形成をモニタリングし及び/もしくは減少させ、並びに/又は骨ミネラル密度及び/もしくは血管平滑筋細胞機能を増大させることができる。

#### 【0152】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参考集団におけるアクチビンのレベルと比較して上昇したアクチビンのレベルを有する。ある実施態

様において、アクチビンレベルは、腎臓、血漿、又は大動脈のアクチビンレベルである。ある実施態様において、アクチビンは、アクチビンAである。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるフォリスタチンのレベルと比較してほぼ等しいフォリスタチンのレベルを有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるフォリスタチンのレベルと比較したときのフォリスタチンのレベルと比較して上昇したフォリスタチンのレベルを有しない。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるフォリスタチンのレベルと比較したときのフォリスタチンのレベルと比較して減少したフォリスタチンのレベルを有しない。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるフォリスタチン様3のレベルと比較してほぼ等しいフォリスタチン様3のレベルを有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるフォリスタチン様3のレベルと比較したときのフォリスタチン様3のレベルと比較して上昇したフォリスタチン様3のレベルを有しない。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるフォリスタチン様3のレベルと比較して減少したフォリスタチン様3のレベルを有しない。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるインヒビンのレベルと比較してほぼ等しいインヒビンのレベルを有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるインヒビンのレベルと比較したときのインヒビンのレベルと比較して上昇したインヒビンのレベルを有しない。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団におけるインヒビンのレベルと比較したときのインヒビンのレベルと比較して減少したインヒビンのレベルを有しない。ある実施態様において、対象における遊離アクチビンのレベルは、アクチビンレベルに対するインヒビン、フォリスタチン、及びフォリスタチン様3レベルの化学量論的組成によって決定される。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、増大した遊離アクチビンのレベルを有する。

#### 【0153】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、ホスホerk 1/2が増大していない。ある実施態様において、ホスホerk 1/2は、大動脈のホスホerk 1/2である。

#### 【0154】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参照集団における内皮間葉転換(EnMT)と比較して増大したEnMTを有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、例えば、Snai1などの、EnMTと関連する転写因子の増大した発現を有する。ある実施態様において、対象における増大したEnMTは、参照集団における骨芽細胞転換と比較して、対象における増大した骨芽細胞転換をもたらす。ある実施態様において、対象における増大したEnMTは、参照集団における血管硬化と比較して、対象における増大した血管硬化をもたらす。ある実施態様において、対象における増大したEnMTは、参照集団における血管石灰化と比較して、対象における増大した血管石灰化をもたらす。ある実施態様において、対象における増大したEnMTは、参照集団における血管平滑筋機能と比較して、対象における減少した血管平滑筋機能をもたらす。ある実施態様において、対象における増大したEnMTは、参照集団におけるLVHと比較して、対象における増大したLVHをもたらす。

#### 【0155】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、腎線維化を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、糸球体硬化症を有する。

#### 【0156】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチ

10

20

30

40

50

ビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)血管石灰化;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)心血管疾患;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する心血管疾患;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する心血管疾患;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)CKD-MBD;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)高いレベルの動脈壁硬化;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性を有する。

しくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)LVH;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、(i)LVHと関連し及び/又はLVHに起因する心血管疾患;並びに(ii)それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。

### 【0157】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、それぞれ、(i)心血管疾患;(ii)血管石灰化;(iii)血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患;(iv)腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患;(v)CKD-MBD;(vi)高いレベルの動脈壁硬化;(vii)LVH;(viii)高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患;並びに/又は(ix)LVHと関連し及び/もしくはLVHに起因する心血管疾患の症状の発症又はこれらの疾患の診断の1、2、3、4、5、6、8、10、12、18、24、又は48カ月前の対象における事前のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルと比較して、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性、並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性を有する。

### 【0158】

ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されている。ある他の実施態様において、対象は、慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常を有すると診断されていない。ある実施態様において、参照集団は、第8.6節に記載されているような集団である。ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベルは、第8.6節に記載されている通りである。ある実施態様において、減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、及び/又はSm22- のレベルは、第8.6節に記載されている通りである。

### 【0159】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したSnai1レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したホスホsmad2レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したホスホsmad3レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇した尿タンパク質レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したDkk1レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したCol1a1レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したRunx2レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したAlpレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したBSAPレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したCTXレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したOsterixレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、上昇したActRIIAレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、減少したKlothoレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、減少した-SMAレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、減少したMYOCDレベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、減少したSm22- レベルと関連する疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、減少したActRIIAレベルと関連する疾患有する。

#### 【0160】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は心血管疾患有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は血管石灰化を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する心血管疾患有する。ある実施態様において、血管石灰化は、第8.6節に記載されているように決定される。ある実施態様において、血管石灰化は、アガットストンスコアによって決定される。ある実施態様において、血管石灰化は、石灰化アテローム性動脈硬化症、石灰化中膜血管障害(別名、メンケベルグ中膜石灰化硬化症)、中膜石灰化、弾性石灰沈着症、石灰沈着性尿毒症性動脈症、石灰化大動脈弁狭窄症、及び/又は門脈石灰化である。ある実施態様において、石灰化アテローム性動脈硬化症と関連する疾患は、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、骨粗鬆症、高血圧、炎症、2型真性糖尿病、末期腎疾患、切斷を要する状態、弾力線維性仮性黄色腫、末期腎疾患、高脂血症、先天性二尖弁、リウマチ性心疾患、及び/又は肝疾患である。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、CKD誘導性の増大した心重量を有する。ある実施態様において、対象は、心肥大を有する。ある実施態様において、対象は、筋細胞肥大を有する。ある実施態様において、対象は、増大した動脈及び/又は血管硬化を有する。ある実施態様において、対象はLVHを有する。

#### 【0161】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、所望しないほど高いレベルの大動脈カルシウム、血管石灰化、高いレベルの動脈壁硬化、及び/又は骨芽細胞数を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象、例えば、慢性腎疾患有する対象は、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、所望しないほど高いレベルの大動脈カルシウム、血管石灰化、高いレベルの動脈壁硬化、及び/又は骨芽細胞数

10

20

30

40

50

を生じるリスクに曝されている。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、大動脈アテロームにおけるカルシウム沈着を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、大動脈硬化の形態の高いレベルの動脈壁硬化を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、高血圧を増大させるレベルの高いレベルの動脈壁硬化を有する。

#### 【0162】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、腎疾患と関連し及び/又は腎疾患に起因する心血管疾患有する。ある実施態様において、腎疾患は慢性腎疾患である。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は慢性腎疾患有する。ある実施態様において、対象は、慢性腎疾患に続発する心血管疾患有する。ある実施態様において、慢性腎疾患は、ステージ3、ステージ4、ステージ5、又はステージ5Dに達している。具体的な実施態様において、腎疾患は末期腎疾患である。ある実施態様において、対象は、成人における $60\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満又は小児対象における $89\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満の糸球体濾過量を有する。Moeらの文献、2006, Kidney International 69:1945-1953を参照されたい。ある実施態様において、対象は成人であり、ここで、該対象は、 $50\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $40\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $30\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $20\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満、又は $10\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満の糸球体濾過量を有する。ある実施態様において、対象は小児対象であり、ここで、該小児対象は、 $80\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $70\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $60\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $50\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $40\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $30\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 、 $20\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満、又は $10\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満の糸球体濾過量を有する。理論に束縛されるものではないが、成人対象における $60\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満の糸球体濾過量及び小児対象における $89\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 未満の糸球体濾過量は、カルシウムレベル、リンレベル、PTHレベル、及びビタミンD代謝の検出可能な異常をもたらし;かつこれらのマーカーの異常なレベルは、骨疾患をもたらす。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、低下したイヌリンクリアランスを有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団と比較して、低下した血液尿素窒素レベルを有する。ある実施態様において、対象は、高リン血症である。ある実施態様において、対象は、腎線維化を有する。

#### 【0163】

ある実施態様において、対象は、アルポート症候群を有する。ある実施態様において、対象は、アルポート症候群と関連するCOL4A5遺伝子の1以上の体細胞突然変異を有する。

#### 【0164】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、慢性腎疾患、すなわち、CKD-ミネラル/骨障害(CKD-MBD)と関連する骨病変を有する。Moeらの文献、2006, Kidney International 69:1945-1953を参照されたい。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における骨梁量と比較して、減少した骨梁量を有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における骨梁幅と比較して、減少した骨梁幅を有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における浸食面対骨面比と比較して、増大した浸食面対骨面比を有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における破骨細胞レベルと比較して、増大した破骨細胞レベルを有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における骨芽細胞面対骨面比と比較して、増大した骨芽細胞面対骨面比を有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における骨芽細胞レベルと比較して、増大した骨芽細胞レベルを有する。ある実施態様において、対象は、参照集団、例えば、第8.6節に記載されているような参照集団における骨形成速度と比較して、低下した骨形成速度を有する。ある実施態様において、CKD-MB

10

20

30

40

50

Dは、腎性骨ジストロフィー及び血管石灰化からなる。ある実施態様において、CKD-MBDは、腎性骨ジストロフィーからなる。ある実施態様において、CKD-MBDは、低代謝回転CKD-MBDである。ある実施態様において、CKD-MBDは、高レベルの動脈壁硬化及び/又はLVHからなる。低代謝回転CKD-MBDは、下の表1に示す組織学的特徴によって診断されることがある。米国腎臓財団(National Kidney Foundation)のウェブサイト上の米国腎臓財団、腎疾患予後改善対策ガイドライン(Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines)を参照されたい。ある実施態様において、対象は、高代謝回転RODを有する。

#### 【0165】

表1. 低代謝回転CKD-MBDの組織学的特徴

#### 【表1】

特徴	無形成骨症	骨軟化症
<b>骨形成</b>		
骨梁量	正常、少ない	変動する 少ない、正常、又は多い
類骨量	正常、少ない	多い～極めて多い
類骨層幅	正常、小さい	大きい～極めて大きい
骨芽細胞の数	少ない	少ない
骨形成速度	低い～極めて低い	低い～極めて低い
骨石灰化遅延時間	正常	長い
<b>骨吸収</b>		
浸食骨周囲長	正常、小さい	変動する 多くの場合、小さいが大きいこともあり得る
破骨細胞の数	少ない	少ないが、正常又は多いこともあり得る
骨髓線維化	なし	なし

#### 【0166】

ある実施態様において、対象は、血液透析を受けている。

#### 【0167】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は末期腎疾患有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、透析を受けている。

#### 【0168】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、参考集団における骨吸収と比較して、増大した骨吸収を有する。ある実施態様において、増大した骨吸収は、CTXのレベルによって決定される。ある実施態様において、CTXのレベルは、第8.6節に記載されているように決定される。ある実施態様において、骨吸収は、第8.6節に記載されているように評価される。

#### 【0169】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、任意の年齢であることができる。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、18歳未満である。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、13歳未満である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、12歳未満、11歳未満、10歳未満、9歳未満、8歳未満、7歳未満、6歳未満、又は5歳未満である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、1～3歳、3～5歳、5～7歳、7～9歳、9～11歳、11～13歳、13～15歳、15～20歳、20～25歳、25～30歳、又は30歳超である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、30～35歳、35～40歳、40～45歳、45～50歳、50～55歳、55～60歳、又は60歳超である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される対象は、60～65歳、65～70歳、70～75歳、75～80歳、又は80歳超である。

#### 【0170】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、末期腎疾患を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、血液透析を受けている。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、エリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象は、末期腎疾患を有し、血液透析を受けており、かつエリスロポエチン刺激剤を以前に投与されたことがある。

【0171】

当業者によって認識されているように、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 $\beta$ -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-  
、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数のレベル及び/又は活性を、独立にかつそれぞれ、例えば、上の第8.3.1節に記載されているような、対応する参照集団における該レベル及び/又は活性と比較することができる。  
10

【0172】

(8.5 ActRIIシグナル伝達のインヒビター)

本節に記載の及び当技術分野で公知のActRIIシグナル伝達インヒビターを本明細書に提供される方法で使用することができる。ある実施態様において、本節に記載のActRIIシグナル伝達インヒビターを本明細書に提供される方法で使用することができる(第8.3節参照)。

【0173】

本明細書に包含されるActRIIシグナル伝達受容体のインヒビターとしては、ActRIIAシグナル伝達インヒビター及びActRIIBシグナル伝達インヒビターが挙げられる(下記参照)。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAシグナル伝達に特異的である。他の実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIBシグナル伝達に特異的である。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAシグナル伝達を優先的に阻害する。他の実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIBシグナル伝達を優先的に阻害する。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAシグナル伝達とActRIIBシグナル伝達の両方を阻害する。  
20

【0174】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達のインヒビターは、ActRIIのアクチビン結合ドメインを含むポリペプチドであることができる。理論に束縛されるものではないが、そのようなアクチビン結合ドメインを含むポリペプチドは、アクチビンを捕捉し、それにより、アクチビンシグナル伝達を妨げる。これらのアクチビン結合ドメインを含むポリペプチドは、ActRIIの細胞外ドメインの全て又は一部(すなわち、ActRIIAの細胞外ドメインの全てもしくは一部又はActRIIBの細胞外ドメインの細胞外ドメインの全てもしくは一部)を含み得る。具体的な実施態様において、ActRIIの細胞外ドメインは可溶性である。  
30

【0175】

ある実施態様において、アクチビン結合ドメインを含むポリペプチドを抗体のFc部分に連結させる(例えば、ActRII受容体のアクチビン結合ドメインを含むポリペプチドと抗体のFc部分とを含むコンジュゲートを作製する)。理論に束縛されるものではないが、抗体部分は、増大した安定性をコンジュゲートに付与する。ある実施態様において、アクチビン結合ドメインを、リンカー、例えば、ペプチドリンクを介して、抗体のFc部分に連結させる。  
40

【0176】

本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達のインヒビターは、細胞外又は細胞内のいずれかで、直接的又は間接的に、ActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達を阻害する分子を含む。いくつかの実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、受容体そのものとの相互作用を介して、ActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達を阻害する。他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び  
50

方法で使用されるActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、ActRIIA及び/又はActRIIBリガンド、例えば、アクチビンとの相互作用を介して、ActRIIAシグナル伝達及び/又はActRIIBシグナル伝達を阻害する。

【0177】

(8.5.1 ActRIIAシグナル伝達のインヒビター)

本明細書で使用されるように、「ActRIIA」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体IIA型(ActRIIA)タンパク質のファミリー及びそのようなActRIIAタンパク質から突然変異生成又は他の修飾によって得られた変異体を指す。本明細書中でのActRIIAに対する言及は、現在同定されている形態のいずれか1つに対する言及であると理解される。ActRIIAファミリーのメンバーは、一般に、システインに富む領域を含むリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び予想上のセリン/トレオニンキナーゼ活性を有する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。10

【0178】

本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターとしては、限定するものではないが、アクチビン結合可溶性ActRIIAポリペプチド；アクチビン(特に、<sub>A</sub>又は<sub>B</sub>とも呼ばれる、アクチビンA又はBサブユニット)に結合し、ActRIIA結合を破壊する抗体；ActRIIAに結合し、アクチビン結合を破壊する抗体；アクチビン又はActRIIA結合について選択された非抗体タンパク質(そのようなタンパク質並びにその設計及び選択方法の例については、例えば、その各々が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、WO/2002/088171号、WO/2006/055689号、WO/2002/032925号、WO/2005/037989号、US 2003/0133939号、及びUS 2005/0238646号を参照)；並びにFcドメインにコンジュゲートすることができる、アクチビン又はActRIIA結合について選択されたランダム化ペプチドが挙げられる。20

【0179】

ある実施態様において、アクチビン又はActRIIA結合活性を有する2以上の異なるタンパク質(又は他の部分)、特に、それぞれI型(例えば、可溶性I型アクチビン受容体)及びII型(例えば、可溶性II型アクチビン受容体)結合部位を遮断するアクチビンバインダーを1つに連結させて、ActRIIAシグナル伝達を阻害し、したがって、本明細書に記載の組成物及び方法で使用することができる、二機能性又は多機能性結合分子を作出することができる。ある実施態様において、ActRIIAシグナル伝達を阻害するアクチビン-ActRIIAシグナル伝達軸アンタゴニストとしては、核酸アプタマー、小分子、並びに本明細書に記載の組成物及び方法で使用される他の薬剤が挙げられる。30

【0180】

(8.5.1.1 ActRIIAポリペプチドを含むActRIIAシグナル伝達インヒビター)

「ActRIIAポリペプチド」という用語には、ActRIIAファミリーメンバーの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドが含まれる。例えば、ActRIIAポリペプチドには、ActRIIAポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のActRIIAの配列に由来するポリペプチドが含まれる。例えば、ActRIIAポリペプチドは、ActRIIAタンパク質及び/又はアクチビンに結合し、それらの機能を阻害することができる。ActRIIBポリペプチドは、骨成長及び骨石灰化を促進するその能力について選択することができる。ActRIIAポリペプチドの例としては、ヒトActRIIA前駆ポリペプチド(配列番号1)並びに可溶性ヒトActRIIAポリペプチド(例えば、配列番号2、3、7、及び12)が挙げられる。そのアミノ酸配列が配列番号1に示されているActRIIA前駆ポリペプチドに関して、ヒトActRIIA前駆ポリペプチドのシグナルペプチドは、アミノ酸位置1～20に位置し；細胞外ドメインは、アミノ酸位置21～135に位置し、ヒトActRIIA前駆ポリペプチド(配列番号1)のN結合型グリコシル化部位は、配列番号1のアミノ酸位置43及び56に位置する。配列番号1のヒトActRIIB前駆ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4(Genbank エントリーNM\_001616のヌクレオチド164～1705)として開示されている。配列番号2の可溶4050

性ヒトActRIIAポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号5として開示されている。配列の説明については、表21を参照されたい。

#### 【0181】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAポリペプチドは、可溶性ActRIIAポリペプチドである。ActRIIAタンパク質の細胞外ドメインは、アクチビンに結合することができ、かつ通常、可溶性であり、したがって、可溶性アクチビン結合ActRIIAポリペプチドと呼ぶことができる。したがって、本明細書で使用される場合、「可溶性ActRIIAポリペプチド」という用語は、通常、ActRIIAタンパク質の任意の天然の細胞外ドメインを含む、ActRIIAタンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチド並びにその任意の変異体(突然変異体、断片、及びペプチド模倣形態を含む)を指す。可溶性ActRIIAポリペプチドは、アクチビンに結合することができる;しかしながら、野生型ActRIIAタンパク質は、アクチビンへの結合に関してGDF8/11と比べて顕著な選択性を示さない。天然又は改変ActRIIAタンパク質を第二のアクチビン選択性結合剤とカップリングさせることにより、該タンパク質に、アクチビンに対する特異性の付加を与えることができる。可溶性アクチビン結合ActRIIAポリペプチドの例としては、配列番号2、3、7、12、及び13に示される可溶性ポリペプチドが挙げられる。可溶性アクチビン結合ActRIIAポリペプチド他の例は、ActRIIAタンパク質の細胞外ドメインに加えて、シグナル配列、例えば、ミツバチメリチンリーダー配列(配列番号8)、組織プラスミノーゲン活性化因子(TPA)リーダー(配列番号9)、又は天然のActRIIAリーダー(配列番号10)を含む。配列番号13に示されるActRIIA-hFcポリペプチドでは、TPAリーダーが使用されている。10

#### 【0182】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達のインヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIAのアクチビン結合ドメインを含むコンジュゲート/融合タンパク質を含む。ある実施態様において、該アクチビン結合ドメインは、リンカー、例えば、ペプチドリンカーを介して、抗体のFc部分に連結される。任意に、Fcドメインは、Asp-265、リジン322、及びAsn-434などの残基に1以上の突然変異を有する。ある場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asp-265突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べてFc受容体に結合する能力が低下している。他の場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asn-434突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメイン比べてMHCクラスI関連Fc受容体(FcRN)に結合する能力が増大している。Fcドメインに融合したActRIIAの可溶性細胞外ドメインを含む例示的な融合タンパク質は、配列番号6、7、12、及び13に示されている。20

#### 【0183】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIAの細胞外ドメイン、又はその一部を含み、ここで、該ActRIIAシグナル伝達インヒビターは、配列番号6、7、12、及び13から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIAの細胞外ドメイン、又はその一部を含み、ここで、該ActRIIAシグナル伝達インヒビターは、配列番号6、7、12、及び13から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む。30

#### 【0184】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達のインヒビターは、ActRIIAの細胞外ドメインの切断形態を含む。切断は、ActRIIAポリペプチドのカルボキシ末端及び/又はアミノ末端にあることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチドの細胞外ドメインと比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25アミノ酸長いものであることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したAc40

10

20

30

40

50

tRIIAポリペプチドの細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のN末端アミノ酸であることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIAポリペプチドの細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のC末端アミノ酸であることができる。例えば、ActRIIAの切断形態としては、アミノ酸20～119；20～128；20～129；20～130；20～131；20～132；20～133；20～134；20～131；21～131；22～131；23～131；24～131；及び25～131を有するポリペプチドが挙げられ、ここで、該アミノ酸位置は、配列番号1におけるアミノ酸位置を指す。

#### 【0185】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達のインヒビターは、1以上のアミノ酸置換を有するActRIIAの細胞外ドメインを含む。ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達のインヒビターは、アミノ酸置換も保有するActRIIA細胞外ドメインの切断形態を含む。

#### 【0186】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターは、ヒトActRIIA受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターは、ヒトActRIIA受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターは、ヒトActRIIA受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質であり、ここで、該ヒトActRIIA受容体の切断された細胞外ドメインは、1以上のアミノ酸置換を保有する。

#### 【0187】

ActRIIAポリペプチドの機能的に活性のある断片は、例えば、ActRIIAポリペプチドをコードする核酸の対応する断片から組換え產生されたポリペプチドをスクリーニングすることにより得ることができる。さらに、断片を、従来のメリフィールド固相f-Moc又はt-Boc化学などの当技術分野で公知の技術を用いて化学合成することができる。該断片を(組換えによるか又は化学合成によって)产生し、試験して、ActRIIAタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るペプチジル断片を同定することができる。

#### 【0188】

さらに、ActRIIAポリペプチドの機能的に活性のある変異体は、例えば、ActRIIAポリペプチドをコードする対応する突然変異核酸から組換え產生された修飾ポリペプチドのライプラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。該変異体を产生し、試験して、ActRIIAタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るものを作り出すことができる。ある実施態様において、ActRIIAポリペプチドの機能的変異体は、配列番号2又は3から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。ある場合には、該機能的変異体は、配列番号2又は3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%、又は100%同一なアミノ酸配列を有する。

#### 【0189】

機能的変異体は、例えば、ActRIIAポリペプチドの構造を、治療効力、又は安定性(例えば、エクスピボでの保存期間及びインビボでのタンパク質分解に対する抵抗性)を増強するような目的で修飾することにより作製することができる。アクチビン結合を保持するように選択された場合のそのような修飾ActRIIAポリペプチドは、天然のActRIIAポリペプチドの機能的等価物とみなすことができる。修飾ActRIIAポリペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失、又は付加によって产生することもできる。例えば、ロイシンとイソロイシンもしくはバリンとの、アスパラギン酸とグルタミン酸との、トレオニンとセリンとの单

10

20

30

40

50

独置換、又はあるアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との同様の置換(例えば、保存的突然変異)によって、得られる分子の生物活性が大きく影響を受けることはないであろうと予想するのは合理的である。保存的置換は、その側鎖において関連があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。ActRIIAポリペプチドのアミノ酸配列の変化によって機能的ホモログが生じるかどうかは、野生型ActRIIAポリペプチドと同様の様式で細胞内の応答を引き起こす変異体ActRIIAポリペプチドの能力を評価することにより容易に決定することができる。

#### 【0190】

ある実施態様において、本明細書に提供される本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAシグナル伝達インヒビターは、該ポリペプチドのグリコシル化を改変することができる1以上の特定の突然変異を有するActRIIAポリペプチドを含むことができる。そのような突然変異は、1以上のグリコシル化部位、例えば、O結合型又はN結合型グリコシル化部位を導入し又は消失させることができる。アスパラギン結合型グリコシル化認識部位は、通常、適当な細胞グリコシル化酵素によって特異的に認識されるアスパラギン-X-トレオニン(又はアスパラギン-X-セリン)(ここで、「X」は、任意のアミノ酸である)というトリペプチド配列を含む。改変は、野生型ActRIIAポリペプチドの配列への1以上のセリンもしくはトレオニン残基の付加、又は該残基による置換によって行うこともできる(0結合型グリコシル化部位の場合)。グリコシル化認識部位の1番目もしくは3番目のアミノ酸位置のうち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(及び/又は2番目の位置におけるアミノ酸欠失)は、修飾されたトリペプチド配列中の非グリコシル化をもたらす。ActRIIAポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ActRIIAポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的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応じて、糖(複数可)を、(a)アルギニン及びヒスチジン;(b)遊離カルボキシル基;(c)遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基;(d)遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基;(e)芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの芳香族残基;又は(f)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方針は、引用により本明細書中に組み込まれる、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330号、及びAplin及びWristonの文献(1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。ActRIIAポリペプチド上に存在する1以上の炭水化物部分の除去は、化学的に及び/又は酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は同等の化合物へのActRIIAポリペプチドの暴露を含み得る。この処理は、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除くほとんど又は全ての糖の切断をもたらすが、アミノ酸配列は無傷のまま残す。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddinらの文献(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52及びEdgeらの文献(1981) Anal. Biochem. 118:131によりさらに記載されている。ActRIIAポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraらの文献(1987) Meth. Enzymol. 138:350により記載されているような種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。ActRIIAポリペプチドの配列は、適切な場合、使用される発現系の種類に応じて調整することができるが、それは、哺乳動物、酵母、昆虫、及び植物の細胞が全て、該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することができるためである。一般に、ヒトで使用されるActRIIAタンパク質は、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又はCHO細胞株で発現させることができるが、他の発現系、例えば、他の哺乳動物発現細胞株、グリコシル化酵素が改変されている酵母細胞株、及び昆虫細胞も同様に有用であると考えられる。

#### 【0191】

本明細書にさらに提供されるのは、突然変異体、特に、ActRIIAポリペプチドのコンビナトリアル突然変異体のセット、及び切断突然変異体を作製する方法であり;コンビナトリアル突然変異体のプールは、機能的変異体配列を同定するのに特に有用である。そのよ

10

20

30

40

50

うなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして作用することができるか、又はその代わりに、新規の活性を全て併せ持つ、ActRIIAポリペプチド変異体を作製することであり得る。種々のスクリーニングアッセイは以下に提供されており、そのようなアッセイを用いて、変異体を評価することができる。例えば、ActRIIAポリペプチド変異体を、ActRIIAリガンドに結合する能力、ActRIIAリガンドのActRIIAポリペプチドへの結合を妨げる能力、又はActRIIAリガンドによって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することができる。

#### 【0192】

天然のActRIIAポリペプチドと比べて選択的な又は全般的に増大した効力を有する、コンビナトリアル由来の変異体を作製することができる。同様に、突然変異生成によって、対応する野生型ActRIIAポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生じさせることができる。例えば、改変タンパク質を、タンパク質分解、又は天然のActRIIAポリペプチドの破壊、さもなければ、不活化をもたらす他の細胞プロセスに対してより安定な状態又はあまり安定でない状態にすることができる。そのような変異体、及びそれらをコードする遺伝子を用いて、ActRIIAポリペプチドの半減期を調節することにより、ActRIIAポリペプチドレベルを改変することができる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的效果を生じることができ、対象における組換えActRIIAポリペプチドレベルのより厳しい制御を可能にすることができる。Fc融合タンパク質では、突然変異をリンカー(存在する場合)及び/又はFc部分中で生成させて、タンパク質の半減期を変化させることができます。

10

20

30

40

#### 【0193】

コンビナトリアルライブラリーは、各々が潜在的ActRIIAポリペプチド配列の少なくとも一部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーによって生成させることができる。例えば、潜在的ActRIIAポリペプチドヌクレオチド配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、又はその代わりに、より大きな融合タンパク質のセット(例えば、ファージディスプレイの場合)として発現可能となるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することができる。

#### 【0194】

潜在的ホモログのライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成装置で実行することができ、その後、合成遺伝子を発現用の適当なベクターに連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である(例えば、Narang, S Aの文献(1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraらの文献(1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton編, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakuraらの文献(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraらの文献(1984) Science 198:1056; Ikeらの文献(1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照されたい)。そのような技術は、他のタンパク質の定方向進化において利用されている(例えば、Scottらの文献(1990) Science 249:386-390; Robertsらの文献(1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlinらの文献(1990) Science 249: 404-406; Cwirlaらの文献(1990) PNAS USA 87: 6378-6382; 並びに米国特許第5,223,409号、第5,198,346号、及び第5,096,815号を参照されたい)。

30

40

#### 【0195】

或いは、他の形態の突然変異生成を用いて、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、ActRIIAポリペプチド変異体を、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成などを用いるスクリーニングによって(Rufらの文献(1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wangらの文献(1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balintらの文献(1993) Gene 137:109-118; Grodbergらの文献(1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashimaらの文献(1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowmanらの文献(1991) Biochemistry 30:10832-10838; 及びCunninghamらの文献(1989) Science 244:1081-1085)、リンカースキャニング突然変異生成によって(Gustinらの文献(1993) Virology 193:653-660; Brown

50

らの文献(1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnightらの文献(1982) Science 232:316);飽和突然変異生成によって(Meyersらの文献(1986)Science 232:613); PCR突然変異生成によって(Leungらの文献(1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19);又は化学的突然変異生成などを含むランダム突然変異生成によって(Millerらの文献(1992) 細菌遺伝学の短期講座(A Short Course in Bacterial Genetics), CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;及びGreenerらの文献(1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)、ライプラリーから作製し、単離することができる。特にコンビナトリアル設定でのリンカースキャニング突然変異生成は、ActRIIAポリペプチドの切断(生物活性)形態を同定する魅力的な方法である。

## 【0196】

10

点突然変異及び切断によって作製されたコンビナトリアルライプラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、さらに言うなら、特定の性質を有する遺伝子産物のcDNAライプラリーをスクリーニングするための、広範な技術が当技術分野で公知である。そのような技術は、一般に、ActRIIAポリペプチドのコンビナトリアル突然変異生成によって作製される遺伝子ライプラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライプラリーのスクリーニングに最も広く使用されている技術は、通常、遺伝子ライプラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、適当な細胞を得られたベクターのライプラリーで形質転換すること、及びコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出によって、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的簡単な単離が容易になる条件下で発現させることを含む。好ましいアッセイとしては、アクチビン結合アッセイ及びアクチビン媒介性細胞シグナル伝達アッセイが挙げられる。

20

## 【0197】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物のインヒビターで使用されるActRIIAポリペプチドは、該ActRIIAポリペプチドに天然に存在する任意の修飾に加えて、翻訳後修飾をさらに含み得る。そ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、及びアシリル化を挙げることができるが、これらに限定されない。結果として、修飾されたActRIIAポリペプチドは、非アミノ酸要素、例えば、ポリエチレンギリコール、脂質、多糖又は单糖、及びホスフェートを含有し得る。ActRIIAポリペプチドの機能性に対するそのような非アミノ酸要素の効果は、当業者に公知の任意の方法によって試験することができる。ActRIIAポリペプチドが、該ActRIIAポリペプチドの新生形態を切断することによって細胞内で產生される場合、翻訳後プロセシングもまた、該タンパク質の正確なフォールディング及び/又は機能に重要であり得る。様々な細胞(例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、W138、NIH-3T3、又はHEK293)は、そのような翻訳後活性のための特異的細胞装置及び特徴的機構を有しており、該細胞を、ActRIIAポリペプチドの正確な修飾及びプロセシングを保証するように選択することができる。

30

## 【0198】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物のインヒビターで使用されるActRIIAポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、ActRIIAポリペプチドの少なくとも一部及び1以上の融合ドメインを有する融合タンパク質が含まれる。そのような融合ドメインのよく知られた例としては、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、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(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)、又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。融合ドメインを、所望の特性を付与するように選択することができる。例えば、いくつかの融合ドメインは、親和性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。親和性精製の目的で、親和性クロマトグラフィー用の関連するマトリックス、例えば、グルタチオン、アミラーゼ、及びニッケル又はコバルトコンジュゲート樹脂が使用される。そのようなマトリックスの多くは、「キット」形態で入手可能であり、これには、例えば、Pharmacia GST精製システム及び(HIS<sub>6</sub>)融合パートナーと合わせて有用な、QIAexpress(商標)システム(Qiagen)がある。別の例として、融合ドメインを、ActRIIAポリペプチドの検出を容易にするように選択することができる。そのような検

40

50

出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質(例えば、GFP)及び通常、特異的抗体が利用可能な短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体がすぐに利用可能である周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)、及びc-mycタグが挙げられる。場合により、融合ドメインは、例えば、第Xa因子又はトロンビン用のプロテアーゼ切断部位を有し、該部位は、関連するプロテアーゼが融合タンパク質を部分消化し、それにより、組換えタンパク質をそれから遊離させることを可能にする。その後、遊離したタンパク質を、後続のクロマトグラフィー分離によって融合ドメインから単離することができる。ある好ましい実施態様において、ActRIIAポリペプチドを、インビボでActRIIAポリペプチドを安定化するドメイン(「スタビライザー」ドメイン)と融合させる。「安定化する」とは、血清半減期を延長する全てのことを意味し、これは、破壊の減少によるものか、腎臓によるクリアランスの減少によるものか、又は他の薬物動態作用によるものかを問わない。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範なタンパク質に望ましい薬物動態特性を付与することが知られている。同様に、ヒト血清アルブミンへの融合は、望ましい特性を付与することができる。選択され得る他のタイプの融合ドメインとしては、多量体化(例えば、二量体化、四量体化)ドメイン及び(望ましい場合、追加の生物学的機能、例えば、骨成長又は筋肉成長のさらなる刺激を付与する)機能ドメインが挙げられる。

10

## 【0199】

融合タンパク質の様々なエレメントを、所望の機能と一致する任意の方法で配置し得ることが理解される。例えば、ActRIIAポリペプチドを異種ドメインのC末端に配置することができ、又はその代わりに、異種ドメインをActRIIAポリペプチドのC末端に配置することができる。ActRIIAポリペプチドドメイン及び異種ドメインは、融合タンパク質中で隣接している必要がなく、追加のドメイン又はアミノ酸配列を、どちらかのドメインのC末端もしくはN末端、又はこれらのドメインの間に含めることができる。

20

## 【0200】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物のインヒビターで使用されるActRIIAポリペプチドは、ActRIIAポリペプチドを安定化することができる1以上の修飾を含むことができる。例えば、そのような修飾は、ActRIIAポリペプチドのインビトロ半減期を向上させるか、ActRIIAポリペプチドの循環半減期を向上させるか、又はActRIIAポリペプチドのタンパク質分解を低下させることができる。そのような安定化修飾としては、融合タンパク質(例えば、ActRIIAポリペプチド及びスタビライザードメインを含む融合タンパク質を含む)、グリコシル化部位の修飾(例えば、ActRIIAポリペプチドへのグリコシル化部位の付加を含む)、並びに炭水化物部分の修飾(例えば、ActRIIAポリペプチドからの炭水化物部分の除去を含む)を挙げることができるが、これらに限定されない。融合タンパク質の場合、ActRIIAポリペプチドを、スタビライザードメイン、例えば、IgG分子(例えば、Fcドメイン)に融合させる。本明細書で使用されるように、「スタビライザードメイン」という用語は、融合タンパク質の場合に見られる融合ドメイン(例えば、Fc)を指すだけでなく、炭水化物部分などの非タンパク質性修飾、又はポリエチレングリコールなどの非タンパク質性ポリマーも含む。

30

## 【0201】

ある実施態様において、他のタンパク質から単離されているか、又は別 の方法で他のタンパク質を実質的に含まない、単離及び/又は精製された形態のActRIIAポリペプチドを、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。ActRIIAポリペプチドは、通常、組換え核酸からの発現によって產生することができる。

40

## 【0202】

ある態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAポリペプチドは、本明細書に開示される断片、機能的変異体、及び融合タンパク質を含む、ActRIIAポリペプチド(例えば、可溶性ActRIIAポリペプチド)のいずれかをコードする単離された及び/又は組換え核酸を用いて作製される。例えば、配列番号4は、天然のヒトActRIIA前駆ポリペプチドをコードし、一方、配列番号5は、ActRIIAのプロセシングされた細胞外ド

50

メインをコードする。そのような核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。そのような核酸は、DNA又はRNA分子であり得る。これらの核酸を、例えば、ActRIIAポリペプチドを作製する方法で、又は直接的な治療剤として(例えば、遺伝子療法の手法で)使用することができる。

#### 【0203】

ある態様において、ActRIIAポリペプチドをコードする核酸には、配列番号4又は5の変異体である核酸が含まれ得る。変異体ヌクレオチド配列には、1以上のヌクレオチド置換、付加、又は欠失によって異なる配列、例えば、アレル変異体が含まれる。

#### 【0204】

ある実施態様において、ActRIIAポリペプチドをコードする単離された又は組換え核酸配列は、配列番号4又は5と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%同一であり得る。当業者は、配列番号4又は5に相補的な核酸配列、及び配列番号4又は5の変異体を、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの產生に使用し得ることを理解するであろう。さらなる実施態様において、そのような核酸配列は、単離されたもの、組換え体、及び/もしくは異種ヌクレオチド配列に融合されたもの、又はDNAライブラリーに由来するものであることができる。

#### 【0205】

他の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの產生で使用される核酸は、極めてストリンジエントな条件下で、配列番号4もしくは5に表記されたヌクレオチド配列、配列番号4もしくは5の相補配列、又はそれらの断片にハイブリダイズするヌクレオチド配列も含み得る。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシー条件を変化させることができることを理解するであろう。例えば、ハイブリダイゼーションを、約45°での $6.0 \times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、次いで、50°での $2.0 \times$ SSCの洗浄で実施することができる。例えば、洗浄工程での塩濃度を、50°で約 $2.0 \times$ SSCの低いストリンジエンシーから50°で約 $0.2 \times$ SSCの高いストリンジエンシーまで選択することができる。さらに、洗浄工程での温度を、室温、約22°での低いストリンジエンシー条件から約65°での高いストリンジエンシー条件へと上昇させることができる。温度と塩の両方を変化させることができ、又は他の変数を変化させながら、温度もしくは塩濃度を一定に保つことができる。一実施態様において、室温での $6 \times$ SSC、次に、室温での $2 \times$ SSCでの洗浄の低いストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする核酸を、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。

#### 【0206】

遺伝暗号の縮重のために配列番号4又は5に示される核酸とは異なる単離された核酸も、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの產生で使用することができる。例えば、いくつかのアミノ酸は、複数のトリプレットによって指定される。同じアミノ酸を特定するコドン、又はシノニム(例えば、CAUとCACは、ヒスチジンについてのシノニムである)は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント突然変異」を生じさせることができる。しかしながら、対象タンパク質のアミノ酸配列の変化を実際にもたらすDNA配列多型が哺乳動物細胞の間に存在すると考えられる。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1以上のヌクレオチドにおけるこれらの変異(variation)(ヌクレオチドの最大約3~5%)が、天然のアレル変異(variation)が原因で、所与の種の個体間に存在し得ることを理解するであろう。

#### 【0207】

ある実施態様において、組換え核酸を、発現コンストラクト中の1以上の調節ヌクレオチド配列に機能的に連結することができる。調節ヌクレオチド配列は、通常、発現に使用される宿主細胞に適したものである。種々の宿主細胞について、数多くの種類の適切な発現ベクター及び好適な調節配列が当技術分野で公知である。一般に、該1以上の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダー又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、並びにエンハンサー又はアクチベ

10

20

30

40

50

ーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。当技術分野で公知の構成的又は誘導性プロモーターが本明細書で企図される。プロモーターは、天然プロモーター、又は複数のプロモーターのエレメントを組み合わせるハイブリッドプロモーターのどちらかであり得る。発現コンストラクトは、細胞内でプラスミドなどのエピソーム上に存在してもよく、又は発現コンストラクトは、染色体に挿入されてもよい。好ましい実施態様において、発現ベクターは、形質転換した宿主細胞の選択を可能にする選択可能マーカー遺伝子を含む。選択可能マーカー遺伝子は当技術分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なる。

#### 【0208】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用される核酸は、ActRIIAポリペプチドをコードし、少なくとも1つ以上の調節配列に機能的に連結されているスクレオチド配列を含む発現ベクター中に提供することができる。調節配列は当技術分野で認められており、ActRIIAポリペプチドの発現を導くように選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節配列は、Goeddelの文献；遺伝子発現技術：酵素学の方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology), Academic Press, San Diego, Calif.(1990)に記載されている。例えば、それに機能的に連結されたときDNA配列の発現を制御する多種多様な発現制御配列のいずれかをこれらのベクター中に用いて、ActRIIAポリペプチドをコードするDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40の初期及び後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルス又はサイトメガロウイルス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又はTRCシステム、その発現がT7 RNAポリメラーゼによって誘導されるT7プロモーター、ラムダファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖系酵素のプロモーター、酸ホスファターゼ、例えば、Pho5のプロモーター、酵母の接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、並びに原核もしくは真核細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、並びにこれらの様々な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及び/又は発現が望まれるタンパク質の種類のような因子によって決ま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、そのコピー数を制御する能力、及び該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考慮されるべきである。

#### 【0209】

本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用される組換え核酸は、クローニングされた遺伝子、又はその一部を、原核細胞、真核細胞(酵母、鳥類、昆虫、もしくは哺乳動物)、又はその両方における発現に好適なベクター中に連結することにより产生することができる。組換えActRIIAポリペプチドの产生用の発現ビヒクルとしては、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、好適なベクターとしては、大腸菌(*E. coli*)などの原核細胞における発現用の、以下のタイプのプラスミド：pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、及びpUC由来プラスミドが挙げられる。

#### 【0210】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌におけるベクターの増殖を促進する原核生物配列と、真核細胞で発現される1以上の真核生物転写ユニットの両方を含む。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 及びpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適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うちのいくつかは、原核細胞と真核細胞の両方における複製及び薬物耐性選択を容易にするために、pBR322などの細菌プラスミド由来の配列で修飾されている。或いは、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、又はエプスタイン-バーウィルス(pHEBo、pREP由来、及びp205)などのウイルスの派生物を、真核細胞におけ

10

20

30

40

50

るタンパク質の一過性発現に使用することができる。(レトロウイルスを含む)他のウイルス発現系の例は、以下の遺伝子療法送達系の記載において見出すことができる。プラスミドの調製及び宿主生物の形質転換に利用される様々な方法は、当技術分野で周知である。原核細胞と真核細胞の両方に関する他の好適な発現系、及び一般的な組換え手順については、分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning A Laboratory Manual)、第3版、Sambrook、Fritsch、及びManiatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)を参照されたい。いくつかの例において、バキュロウイルス発現系の使用によって組換えポリペプチドを発現させることが望ましい場合がある。そのようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター(例えば、pVL1392、pVL1393、及びpVL941)、pAcUW由来ベクター(例えば、pAcUW1)、並びにpBlueBac由来ベクター(例えば、 $\beta$ -gal含有pBlueBac III)が挙げられる。

10

## 【0211】

Pcmv-Scriptベクター(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4ベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)、及びpCI-neoベクター(Promega, Madison, Wis.)などのベクターを、CHO細胞内での対象ActRIIAポリペプチドの產生用に設計することができる。明らかになるように、対象遺伝子コンストラクトを用いて、例えば、精製用の、融合タンパク質又は変異体タンパク質を含む、タンパク質を產生するために、培養で増殖した細胞内での対象ActRIIAポリペプチドの発現を生じさせることができる。

20

## 【0212】

1以上の該対象ActRIIAポリペプチドのコード配列(例えば、配列番号4又は5)を含む組換え遺伝子でトランスフェクトされた宿主細胞を、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの產生で使用することができる。宿主細胞は、任意の原核又は真核細胞であり得る。例えば、本明細書に提供されるActRIIAポリペプチドを、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を用いる)、酵母、又は哺乳動物細胞で発現させることができる。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

20

## 【0213】

したがって、本明細書に提供されるのは、ActRIIAポリペプチドを產生する方法である。例えば、ActRIIA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を、ActRIIAポリペプチドの発現が生じるのを可能にする適当な条件下で培養することができる。ActRIIAポリペプチドを分泌させ、細胞とActRIIAポリペプチドを含む培地の混合物から単離することができる。或いは、ActRIIAポリペプチドを細胞質内又は膜画分に保持し、細胞を回収し、溶解させ、タンパク質を単離することができる。細胞培養物には、宿主細胞、培地、及び他の副産物が含まれる。細胞培養用の好適な培地は、当技術分野で周知である。対象ActRIIAポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、ActRIIAポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体による免疫親和性精製、及びActRIIAポリペプチドに融合したドメインに結合する物質による親和性精製(例えば、プロテインAカラムを用いて、ActRIIA-Fc融合体を精製することができる)を含む、タンパク質を精製するための当技術分野で公知の技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞、又はその両方から単離することができる。好ましい実施態様において、ActRIIAポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質である。一実施態様において、精製は、例えば、以下のもの:プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーのうちの3つ以上を、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される。精製は、ウイルス濾過及びバッファー交換で終了させることができる。本明細書で実証されるように、ActRIIA-hFcタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定して98%を超える純度、SDS PAGEにより決定して95%を超える純度に精製された。この精製レベルは、マウスの骨に対する望ましい効果並びにマウス、ラット、及び非ヒト靈長類における許容し得る安全性プロファイルを達成するのに十分であった。

30

40

50

## 【0214】

別の実施態様において、組換えActRIIAポリペプチドの所望の部分のN末端におけるポリ-(His)/エンテロキナーゼ切断部位配列などの精製リーダー配列をコードする融合遺伝子は、Ni<sup>2+</sup>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することができます。次いで、精製リーダー配列をエンテロキナーゼによる処理によって後から除去し、精製ActRIIAポリペプチドを提供することができる(例えば、Hochuliらの文献(1987) J. Chromatography 411:177; 及びJanknechtらの文献、PNAS USA 88:8972を参照されたい)。

## 【0215】

融合遺伝子を作製する技術は周知である。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の接続は、ライゲーションのための平滑末端又は互い違い末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要な場合の付着末端の充填(filling-in)、望ましくない接続を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的ライゲーションを利用する従来の技術に従って実施される。別の実施態様において、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む従来の技術によって合成することができる。或いは、後からアニーリングさせてキメラ遺伝子配列を生成させることができると2つの連続する遺伝子断片間の相補的突出を生じさせるアンカープライマーを用いて、遺伝子断片のPCR増幅を実施することができる(例えば、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、Ausubelら編、John Wiley & Sons: 1992を参照されたい)。

10

## 【0216】

ActRIIA-Fc融合タンパク質は、安定にトランスフェクトされたCHO-DUKX BI 1細胞で、配列番号9の組織プラスミノーゲンリーダー配列を用いて、pAID4ベクター(SV40 ori/エンハンサー、CMVプロモーター)から発現させることができる。Fc部分は、配列番号7に示されるヒトIgG1 Fc配列である。ある実施態様において、発現させたとき、含まれるタンパク質は、ActRIIA-Fc融合タンパク質1分子当たり、平均で約1.5~2.5モルのシアル酸を有する。

20

## 【0217】

ある実施態様において、ActRIIA-Fc融合体の長い血清半減期は、ヒト対象で25~32日であることができる。さらに、CHO細胞で発現される物質は、ヒト293細胞で発現されるActRIIA-hFc融合タンパク質について報告されたものよりも高いアクチビンBリガンドに対する親和性を有することができる(del Reらの文献、J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35)。さらに、理論に束縛されるものではないが、TPAリーダー配列の使用は、他のリーダー配列よりも大きな産生をもたらし、天然のリーダーで発現されるActRIIA-Fcとは異なり、極めて純粋なN末端配列を提供することができる。天然のリーダー配列の使用は、各自異なるN末端配列を有する2つの主要な種のActRIIA-Fcを生じさせることができる。

30

## 【0218】

(8.5.2 ActRIIBシグナル伝達のインヒビター)

40

本明細書で使用されるように、「ActRIIB」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体II型(ActRIIB)タンパク質のファミリー及び突然変異生成又は他の修飾によってそのようなActRIIBタンパク質から得られた変異体を指す。本明細書中でのActRIIBに対する言及は、該受容体の現在同定されている形態のいずれか1つに対する言及であると理解される。ActRIIBファミリーのメンバーは、一般に、システインに富む領域を含むリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び予想上のセリン/トレオニンキナーゼ活性を有する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。

## 【0219】

本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターとしては、限定するものではないが、アクチビン結合可溶性ActRIIBポリペプチド; アクチビン(特に、<sub>A</sub>又は<sub>B</sub>とも呼ばれる、アクチビンA又はBサブユニット)に結合し、ActRIIB結合を破壊する抗体; ActRIIBに結合し、アクチビン結合を破壊する抗体; アクチビン又はActRIIB結合について選択された非抗体タンパク質; 及びFcドメインにコンジュゲートするこ

50

とができる、アクチビン又はActRIIB結合について選択されたランダム化ペプチドが挙げられる。

#### 【0220】

ある実施態様において、アクチビン又はActRIIB結合活性を有する2以上の異なるタンパク質(又は他の部分)、特に、それぞれI型(例えば、可溶性I型アクチビン受容体)及びII型(例えば、可溶性II型アクチビン受容体)結合部位を遮断するアクチビンバインダーを1つに連結させて、ActRIIBを阻害し、したがって、本明細書に記載の組成物及び方法で使用することができる、二機能性又は多機能性結合分子を作出することができる。ある実施態様において、ActRIIBを阻害するアクチビン-ActRIIBシグナル伝達軸アンタゴニストとしては、核酸アプタマー、小分子、並びに本明細書に記載の組成物及び方法で使用される他の薬剤が挙げられる。

10

#### 【0221】

##### (8.5.2.1 ActRIIBポリペプチドを含むActRIIBシグナル伝達インヒビター)

本明細書で使用されるように、「ActRIIBポリペプチド」という用語は、ActRIIBファミリーメンバーの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドを指す。例えば、ActRIIBポリペプチドには、ActRIIBポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のActRIIB受容体の配列に由来するポリペプチドが含まれる。例えば、ActRIIBポリペプチドは、ActRIIBタンパク質及び/又はアクチビンに結合し、それらの機能を阻害することができる。ActRIIBポリペプチドの例としては、ヒトActRIIB前駆ポリペプチド(配列番号16又は配列番号28)が挙げられる。そのアミノ酸配列が配列番号16又は配列番号28に示されているActRIIB前駆ポリペプチド(すなわち、ヒトActRIIB前駆ポリペプチド)に関して、該ActRIIB前駆ポリペプチドのシグナルペプチドは、アミノ酸1~18に位置し;細胞外ドメインは、アミノ酸19~134に位置し、潜在的N結合型グリコシル化部位は、アミノ酸位置42及び65に位置する。配列番号16のヒトActRIIB前駆ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号19として開示されている(配列番号19は、アミノ酸位置64に対応するコドンでアラニンを提供するが、その代わりにアミノ酸位置64に対応するコドンでアルギニンを提供するように、当技術分野で公知の方法を用いて、当業者によって、容易に修飾されることができる)。配列の説明については、表21を参照されたい。

20

#### 【0222】

別途、具体的に表記されない限り、本明細書に記載の全てのActRIIB関連ポリペプチドに関するアミノ酸の付番は、配列番号16及び配列番号28(これらは、位置64で発現されるアミノ酸だけが異なる)に関するアミノ酸付番に基づく。例えば、ActRIIBポリペプチドがアミノ酸位置79で置換/突然変異を有すると記載されている場合、位置79は、ActRIIBポリペプチドが由来する配列番号16又は配列番号28中の79番目のアミノ酸を指すものと理解されるべきである。同様に、ActRIIBポリペプチドがアミノ酸位置64でアラニン又はアルギニンを有すると記載されている場合、位置64は、ActRIIBポリペプチドが由来する配列番号16又は配列番号28中の64番目のアミノ酸を指すものと理解されるべきである。

30

#### 【0223】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、ActRIIBのアクチビン結合ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施態様において、ActRIIBのアクチビン結合ドメインは、ActRIIBの細胞外ドメイン、又はその部分を含む。具体的な実施態様において、ActRIIBの細胞外ドメイン又はその部分は可溶性である。ActRIIBポリペプチドの例示的な修飾形態は、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許出願公開第20090005308号及び第20100068215号に開示されている。

40

#### 【0224】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポ

50

リペプチドは、可溶性ActRIIBポリペプチドである。「可溶性ActRIIBポリペプチド」という用語は、通常、ActRIIBタンパク質の任意の天然の細胞外ドメインを含む、ActRIIBタンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチド並びにその任意の変異体(突然変異体、断片、及びペプチド模倣形態を含む)を指す。可溶性ActRIIBポリペプチドは、アクチビンに結合することができる;しかしながら、野生型ActRIIBタンパク質は、アクチビンへの結合に関してGDF8/11と比べて顕著な選択性を示さない。ある実施態様において、様々な結合特性を有するActRIIBの改変形態を本明細書に提供される方法で使用することができる。そのような改変形態は、例えば、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 2006/012627号及びWO 2010/019261号に開示されている。天然又は改変ActRIIBタンパク質を第二のアクチビン選択性的結合剤とカップリングさせることにより、該タンパク質に、アクチビンに対する特異性の付加を与えることができる。例示的な可溶性ActRIIBポリペプチドとしては、ヒトActRIIBポリペプチドの細胞外ドメイン(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43)が挙げられる。

10

## 【0225】

ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号16のアミノ酸64に対応する位置のアラニン(本明細書中、「A64」と呼ばれる)を有する、Hildenらの文献(Blood, 1994, 83(8):2 163-70)によって開示されたActRIIB細胞外配列を有するFc融合タンパク質は、アクチビン及びGDF-11に対する比較的低い親和性を保有することが示されている。対照的に、ActRII B前駆アミノ酸配列の位置64のアルギニン(本明細書中、「R64」と呼ばれる)を有するFc融合タンパク質は、低ナノモル濃度から高ピコモル濃度の範囲のアクチビン及びGDF-11に対する親和性を有する(例えば、その開示が完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許出願公開第20100068215号を参照されたい)。位置64のアルギニンを有するActRIIB前駆アミノ酸配列は、配列番号28に示されている。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法に従って使用されるActRIIBポリペプチドは、(i)ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号16のアミノ酸64に対応する位置のアラニン;又は(ii)Act RIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号28の位置64のアルギニンのどちらかを含み得る。他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法に従って使用されるActRII Bポリペプチドは、ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸64に対応する位置にアラニンでもアルギニンでもないアミノ酸を含み得る。

20

## 【0226】

ActRIIB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は、アクチビンに対する受容体の親和性を低下させている(例えば、Attisanoらの文献、Cell, 1 992, 68(1):97-108を参照されたい)。配列番号28のアミノ酸20~119を含むActRIIB-Fc融合タンパク質(すなわち、配列番号32)の「ActRIIB(20-119)-Fc」は、プロリンノット領域及び完全な膜近傍領域を含む、配列番号28のアミノ酸20~134を含むActRIIB-Fc融合タンパク質(すなわち、配列番号31)の「ActRIIB(20-134)-Fc」と比べて、GDF-11及びアクチビンに対する結合が低下している。しかしながら、配列番号28のアミノ酸20~129を含むAct RIIB-Fc融合タンパク質の「ActRIIB(20-129)-Fc」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、ActRIIBの非切斷型細胞外ドメインと比べて、同様の、しかし、若干低下した活性を保持している。したがって、配列番号28(又は配列番号16)のアミノ酸13 4、133、132、131、130、及び129で終結する細胞外ドメインを含むActRIIBポリペプチドは全て活性を有すると考えられるが、アミノ酸134又は133で終結するコンストラクトが最も高い活性を有し得る。同様に、配列番号28のP129及びP130の突然変異がリガンド結合をそれほど減少させないという事実によって示されるように、残基129~134のいずれかでの突然変異は、リガンド結合親和性を大幅に変化させるとは考えられない。したがって、本明細書に記載の方法及び組成物に従って使用されるActRIIBポリペプチドは、配列番号28(又は配列番号16)のアミノ酸109(すなわち、最後のシスティン)で早くも終わり得るが、配列番号28(又は配列番号16)のアミノ酸位置109と119又はその間で終わる形態は、低下したリガンド結合能を有すると考えられる。

30

40

50

## 【0227】

配列番号16及び配列番号28のアミノ酸29は、ActRIIB前駆体配列中の最初のシステインに相当する。配列番号16もしくは配列番号28のN末端のアミノ酸29、又はこれらのアミノ酸位置の前から始まるActRIIBポリペプチドは、リガンド結合活性を保持していると考えられる。配列番号16又は配列番号28の位置24におけるアラニンからアスパラギンへの突然変異は、リガンド結合にそれほど影響を及ぼすことなく、N結合型グリコシル化配列を導入する。これは、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸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の間の領域中の突然変異が良好に許容されることを裏付けるものである。特に、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置20、21、22、23、及び24から始まるActRIIBポリペプチドは活性を保持しており、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置25、26、27、28、及び29から始まるActRIIBポリペプチドも活性を保持すると考えられる。配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置22、23、24、又は25から始まるActRIIBポリペプチドは最も大きい活性を有する。

10

## 【0228】

まとめるに、本明細書に記載の方法及び組成物に従って使用されるActRIIB前駆タンパク質(すなわち、配列番号16又は配列番号28)の活性部分(すなわち、ActRIIBポリペプチド)は、通常、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸29～109を含み、そのようなActRIIBポリペプチドは、例えば、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸19～29のいずれか1つに対応する残基から始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～134のいずれか1つに対応する位置で終わることができる。本明細書に包含されるActRIIBポリペプチドの具体的な例としては、配列番号16又は配列番号28の19～29、20～29、又は21～29のアミノ酸位置から始まり、配列番号16又は配列番号28の119～134、119～133、又は129～134、129～133のアミノ酸位置で終わるものが挙げられる。本明細書に包含されるActRIIBポリペプチドの他の具体的な例としては、配列番号16又は配列番号28の20～24(又は21～24、又は22～25)のアミノ酸位置から始まり、配列番号16又は配列番号28の109～134(もしくは109～133)、119～134(もしくは119～133)、又は129～134(もしくは129～133)のアミノ酸位置で終わるものが挙げられる。これらの範囲に含まれる変異体ActRIIBポリペプチド、特に、配列番号16又は配列番号28の対応する部分との少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性又は配列相同性を有するものも企図される。

20

30

## 【0229】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、ActRIIBの細胞外ドメインの切断形態を含む。切断は、ActRIIBポリペプチドのカルボキシ末端及び/又はアミノ末端にあることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチド細胞外ドメインと比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25アミノ酸長いものであることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチド細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のN末端アミノ酸であることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチド細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のC末端アミノ酸であることができる。例えば、ActRIIBの切断形態としては、アミノ酸20～119；20～128；20～129；20～130；20～131；20～132；20～133；20～134；20～131；21～131；22～131；23～131；24～131；及び25～131を有するポリペプチドが挙げられ、ここで、該アミノ酸位置は、配列番号16又は配列番号28におけるアミノ酸位置を指す。

40

## 【0230】

ActRIIBのさらなる例示的な切断形態としては、(i)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～29のいずれかのアミノ酸から始まり(任意に、配列番号16又は配列番号28の22～25から始まり)、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～134のいずれかで終わるポリペ

50

10 プチド;(ii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～29のアミノ酸のいずれかから始まり(任意に、配列番号16又は配列番号28の22～25から始まり)、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～133のいずれかで終わるポリペプチド;(iii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のアミノ酸のいずれかから始まり(任意に、配列番号16又は配列番号28の22～25から始まり)、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～133のいずれかで終わるポリペプチド;(iv)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～134のいずれかで終わるポリペプチド;(v)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～133のいずれかで終わるポリペプチド;(vi)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～134のいずれかで終わるポリペプチド;(vii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128～133のいずれかで終わるポリペプチド;(viii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128～133のいずれかで終わるポリペプチド;(ix)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～134のいずれかで終わるポリペプチド;(x)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～133のいずれかで終わるポリペプチド;(xi)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128～133のいずれかで終わるポリペプチドが挙げられる。具体的な実施態様において、ActRIIBポリペプチドは、配列番号16もしくは配列番号28のアミノ酸位置25から始まり、配列番号16もしくは配列番号28のアミノ酸位置131で終わるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。別の具体的な実施態様において、ActRIIBポリペプチドは、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43のアミノ酸配列からなるか、又はそれから本質的になる。

### 【0231】

30 本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドはいずれも、ホモ二量体として産生することができる。本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドはいずれも、IgG重鎖由来の定常領域、例えば、Fcドメインを含む異種部分を有する融合タンパク質として製剤化することができる。本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドはいずれも、任意に、配列番号16又は配列番号28に対する1以上の追加のアミノ酸置換、欠失、又は挿入と組み合わせて、配列番号16又は配列番号28の位置79に対応する位置に酸性アミノ酸を含むことができる。

### 【0232】

40 具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、1以上のアミノ酸置換/突然変異を有するActRIIBの細胞外ドメインを含む。そのようなアミノ酸置換/突然変異は、例えば、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置79のロイシンからアスパラギン酸又はグルタミン酸などの酸性アミノ酸への交換であり得る。例えば、配列番号16又は配列番号28の位置L79をActRIIB細胞外ドメインポリペプチド中で改変して、改変されたアクチビン-ミオスタチン(GDF-11)結合特性を付与することができる。L79A及びL79P突然変異は、アクチビン結合よりも大きい程度にGDF-11結合を低下させる。L79E及びL79D突然変異はGDF-11結合を保持する一方で、大きく低下したアクチビン結合を示す。

### 【0233】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、アミノ酸置換、例えば、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置79のロイシンからアスパラギン酸又はグルタミン酸などの酸性アミノ酸への交換も保有するActRIIB細胞外ドメインの切断形態を含む。具体的な実施態様において、本明細書

10

20

30

40

50

に記載の組成物及び方法で使用されるアミノ酸置換も保有するActRIIBポリペプチドの細胞外ドメインの切断形態は、配列番号23である。切断され及び/又は1以上のアミノ酸置換を保有するActRIIBの形態は、上で論じられているような抗体のFcドメインに連結させることができる。

#### 【0234】

ActRIIBポリペプチドの機能的に活性のある断片は、例えば、ActRIIBポリペプチドをコードする核酸の対応する断片から組換え產生されたポリペプチドをスクリーニングすることにより得ることができる。さらに、断片を、従来のメリフィールド固相f-Moc又はt-Boc化学などの当技術分野で公知の技術を用いて化学合成することができる。当業者によって認識されているように、例えば、ペプチド合成用の様々な樹脂及び溶液相系を含む他の技術を用いて、本明細書に記載のペプチジル断片を合成することができる。該断片を(組換えによるか又は化学合成によって)产生し、試験して、ActRIIBタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るペプチジル断片を同定することができる。

10

#### 【0235】

さらに、ActRIIBポリペプチドの機能的に活性のある変異体は、例えば、ActRIIBポリペプチドをコードする対応する突然変異核酸から組換え產生された修飾ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。該変異体を产生し、試験して、ActRIIBタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るものと同定することができる。ある実施態様において、ActRIIBポリペプチドの機能的変異体は、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、該機能的変異体は、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一なアミノ酸配列を有する。

20

#### 【0236】

機能的変異体は、例えば、ActRIIBポリペプチドの構造を、治療効力、又は安定性(例えば、エクスピボでの保存期間及びインビボでのタンパク質分解に対する抵抗性)を増強するような目的で修飾することにより作製することができる。アクチビン結合を保持するように選択された場合のそのような修飾ActRIIBポリペプチドは、天然のActRIIBポリペプチドの機能的等価物とみなすことができる。修飾ActRIIBポリペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失、又は付加によって产生することもできる。例えば、ロイシンとイソロイシンもしくはバリンとの、アスパラギン酸とグルタミン酸との、トレオニンとセリンとの単独置換、又はあるアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との同様の置換(例えば、保存的突然変異)によって、得られる分子の生物活性が大きく影響を受けることはないであろうと予想するのは合理的である。保存的置換は、その側鎖において関連があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。ActRIIBポリペプチドのアミノ酸配列の変化によって機能的ホモログが生じるかどうかは、野生型ActRIIBポリペプチドと同様の様式で細胞内の応答を引き起こす変異体ActRIIBポリペプチドの能力を評価することにより容易に決定することができる。

30

#### 【0237】

ActRIIBポリペプチド突然変異体、特に、ActRIIBポリペプチドのコンビナトリアル突然変異体のセット、及び切断突然変異体;コンビナトリアル突然変異体のプールは、機能的変異体配列を同定するのに特に有用であり、本明細書に記載の方法及び組成物で使用することができる。そのようなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして作用することができるか、又はその代わりに、新規の活性を全て併せ持つ、ActRIIBポリペプチド変異体を作製することであり得る。

40

#### 【0238】

ActRIIBのリガンド結合ポケットは、配列番号16又は配列番号28の残基Y31、N33、N35、

50

L38～T41、E47、E50、Q53～K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78～N83、Y85、R87、A92、及びE94～F101によって規定されることが示されている。これらの位置では、保存的突然変異は許容されるが、K74A突然変異は、R40A、K55A、F82A、及び位置L79での突然変異がそうであるように、良好に許容されると考えられる。R40は、ゼノパス(Xenopus)では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ActRIIBではR、及びゼノパスActRIIBではKであり、それゆえ、R、K、Q、N、及びHを含むアミノ酸がこの位置で許容される。したがって、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドの一般式は、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸29～109を含むが、任意に、配列番号16又は配列番号28の20～24又は22～25の範囲のアミノ酸位置から始まり、配列番号16又は配列番号28の129～134の範囲のアミノ酸位置で終わり、リガンド結合ポケット内に1、2、5、又は15以下の保存的アミノ酸変化を含み、かつリガンド結合ポケット内の配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置40、53、55、74、79、及び/又は82に0、1、又はそれより多くの非保存的変化を含むものである。そのようなActRIIBポリペプチドは、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸29～109の配列との80%、90%、95%、又は99%を超える配列同一性又は配列相同性を保持し得る。ばらつきが特に良好に許容され得る結合ポケットの外側の部位としては、ActRIIBの細胞外ドメインのアミノ末端及びカルボキシ末端、並びに位置42～46及び65～73が挙げられる。配列番号16又は配列番号28の位置65におけるアスパラギンからアラニンへの変化(N65A)は、A64バックグラウンドでのリガンド結合を実際に改善し、したがって、R64バックグラウンドでのリガンド結合に悪影響を及ぼさないと考えられる。この変化は、おそらくは、A64バックグラウンドでのN65におけるグリコシル化を消失させ、したがって、この領域での顕著な変化が許容される可能性が高いことを示している。R64A変化はあまり許容されないが、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は、位置64で許容され得る。

10

20

30

40

50

## 【0239】

リガンド結合ドメイン内に突然変異を有するActRIIBポリペプチドの具体的な例として、変異体ActRIIBポリペプチドが、アクチビンではなく、GDF8に優先的に結合するように、ActRIIBのリガンド結合ドメインの正電荷を有するアミノ酸残基Asp(D80)を異なるアミノ酸残基に突然変異させることができる。具体的な実施態様において、D80残基を、非荷電アミノ酸残基、負電荷を有する(negative)アミノ酸残基、及び疎水性アミノ酸残基:からなる群から選択されるアミノ酸残基に変化させる。さらなる具体的な例として、疎水性残基L79を酸性アミノ酸のアスパラギン酸又はグルタミン酸に改変して、GDF11結合を保持したまま、アクチビン結合を大きく低下させることができる。当業者によって認識されているように、記載された突然変異、変異体、又は修飾の大部分は、核酸レベルで、又は場合によっては、翻訳後修飾もしくは化学合成によって生成させることができる。そのような技術は、当技術分野で周知である。

## 【0240】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達のインヒビターは、抗体のFc部分に連結したActRIIB受容体の細胞外ドメイン(例えば、アクチビン結合ドメイン)を含むコンジュゲート/融合タンパク質を含む。そのようなコンジュゲート/融合タンパク質は、本明細書に開示されるActRIIBポリペプチドのいずれか(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43のいずれか)、当技術分野で公知の任意のActRIIBポリペプチド、又は当技術分野で公知の及び/もしくは本明細書に提供される方法を用いて作製される任意のActRIIBポリペプチドを含み得る。

## 【0241】

ある実施態様において、該細胞外ドメインは、リンカー、例えば、ペプチドリンカーを介して、抗体のFc部分に連結される。例示的なリンカーとしては、短いポリペプチド配列、例えば、2～10個、2～5個、2～4個、2～3個のアミノ酸残基(例えば、グリシン残基)、例えば、Gly-Gly-Glyリンカーなどが挙げられる。具体的な実施態様において、該リンカーは、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly(GGG)を含む。別の具体的な実施態様において、該リンカ

ーは、アミノ酸配列Thr-Gly-Gly-Gly(TGGG)を含む。任意に、Fcドメインは、Asp-265、リジン322、及びAsn-434などの残基に1以上の突然変異を有する。ある場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asp-265突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べて、Fc受容体に結合する能力が低下している。他の場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asn-434突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べて、MHCクラスI関連Fc-受容体(FcRN)に結合する能力が増大している。Fcドメインに融合したActRIIBの可溶性細胞外ドメインを含む例示的な融合タンパク質は、配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、及び47に示されている。

## 【0242】

10

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIBの細胞外ドメイン、又はその部分を含み、ここで、該ActRIIBシグナル伝達インヒビターは、配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、及び47から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIBの細胞外ドメイン、又はその部分を含み、ここで、該ActRIIBシグナル伝達インヒビターは、配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、及び47から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む。

20

## 【0243】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、ヒトActRIIB受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、ヒトActRIIB受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、ヒトActRIIB受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質であり、ここで、該ヒトActRIIB受容体の切断された細胞外ドメインは、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸79に対応するアミノ酸位置にアミノ酸置換を保有する。一実施態様において、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸79に対応するアミノ酸位置でのアミノ酸置換は、ロイシンからアスパラギン酸への置換(すなわち、L79D突然変異)である。

30

## 【0244】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、配列番号24又は25であり、これらは、ヒトActRIIB受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質を表し、ここで、該ActRIIB細胞外ドメインは、配列番号28のアミノ酸25～131を含み、L79D突然変異を有する。配列番号24のActRIIB-Fc融合タンパク質をコードする核酸配列は、配列番号45に示されている。

## 【0245】

40

別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBシグナル伝達インヒビターは、配列番号34又は35であり、これらは、ヒトActRIIB受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質を表し、ここで、該ActRIIB細胞外ドメインは、配列番号16のアミノ酸25～131を含み、L79D突然変異を有する。

## 【0246】

アスパラギン結合型グリコシル化認識部位は、通常、適当な細胞グリコシル化酵素によって特異的に認識されるアスパラギン-X-トレオニン(又はアスパラギン-X-セリン)(ここで、「X」は、任意のアミノ酸である)というトリペプチド配列を含む。改変は、野生型ActRIIBポリペプチドの配列への1以上のセリンもしくはトレオニン残基の付加、又はそれらによる置換によって行うこともできる(0結合型グリコシル化部位の場合)。グリコシル化認識部位の1番目もしくは3番目のアミノ酸位置のうちの一方もしくは両方における種々の

50

アミノ酸置換もしくは欠失(及び/又は2番目の位置におけるアミノ酸欠失)は、修飾されたトリペプチド配列中の非グリコシル化をもたらす。ActRIIBポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ActRIIBポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的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応じて、糖(複数可)を、(a)アルギニン及びヒスチジン;(b)遊離カルボキシル基;(c)遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基;(d)遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基;(e)芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの芳香族残基;又は(f)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方針は、引用により本明細書中に組み込まれる、1987年9月11日に公開された国際特許出願第WO 87/05330号、並びにAplin及びWristonの文献(1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。ActRIIBポリペプチド上に存在する1以上の炭水化物部分の除去は、化学的に及び/又は酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は同等の化合物へのActRIIBポリペプチドの暴露を含み得る。この処理は、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除くほとんど又は全ての糖の切断をもたらすが、アミノ酸配列は無傷のまま残す。化学的脱グリコシル化はさらに、Hakimuddinらの文献(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52により、及びEdgeらの文献(1981) Anal. Biochem. 118:131により記載されている。ActRIIBポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraらの文献(1987) Meth. Enzymol. 138:350により記載されているような種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。ActRIIBポリペプチドの配列は、適切な場合、使用される発現系の種類に応じて調整することができるが、それは、哺乳動物、酵母、昆虫、及び植物の細胞が全て、該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することができるためである。一般に、ヒトで使用されるActRIIBタンパク質は、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又はCHO細胞株で発現されるが、他の発現系、例えば、他の哺乳動物発現細胞株、グリコシル化酵素が改変されている酵母細胞株、及び昆虫細胞も同様に有用であると考えられる。

#### 【0247】

具体的な実施態様において、ActRIIB(R64)-Fc形態と比べてActRIIB-Fc融合タンパク質の血清半減期を延長するさらなるN結合型グリコシル化部位(N-X-S/T)の付加を含む突然変異ActRIIBポリペプチドを本明細書に記載の方法及び組成物で使用することできる。具体的な実施態様において、配列番号16又は配列番号28の位置24におけるアスパラギン(A24N)の導入は、より長い半減期を付与するNXT配列の生成をもたらす。他のNX(T/S)配列は、42～44(NQS)及び65～67(NSS)に見出すことができるが、後者は、位置64のRでは(すなわち、R64ポリペプチド中では)効率的にグリコシル化することができない。N-X-S/T配列は、通常、上で詳述されている、ActRIIBのリガンド結合ポケットの外側の位置で導入することができる。非内在性N-X-S/T配列の導入のため特に好ましい部位としては、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～29、20～24、22～25、109～134、120～134、又は129～134が挙げられる。N-X-S/T配列は、ActRIIB配列とFc又は他の融合体成分との間のリンカーに導入することもできる。そのような部位は、既存のSもしくはTに対して正しい位置にNを導入することによるか、又は既存のNに対応する位置にSもしくはTを導入することにより、最小限の労力で導入することができる。したがって、N結合型グリコシル化部位を生成させる望ましい改変は：A24N、R64N、S67N(おそらくは、N65A改変と併存する)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S、及びR112Tである(これらの位置に対応する全てのアミノ酸位置について、それらを配列番号16又は配列番号28に見出すことができる)。グリコシル化によって保護が生じるので、グリコシル化されると予測される任意のSを、免疫原性部位を生成させることなく、Tに改変することができる。同様に、グリコシル化されると予測される任意のTをSに改変することができる。したがって、改変S67T及びS44Tは本明細書に包含される。同様に、A24N改変体において、S26T改変を使用することができる。したがって、ActRIIBポリペプチドは、1以上の追加の非内在性N結合型グリコシル

10

20

30

40

50

化コンセンサス配列を含むことができる。

【0248】

種々のスクリーニングアッセイを用いて、ActRIIBポリペプチド変異体を評価することができる。例えば、ActRIIBポリペプチド変異体を、ActRIIBリガンドに結合する能力、ActRIIBリガンドのActRIIBポリペプチドへの結合を妨げる能力、又はActRIIBリガンドによって生じ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することができる。ActRIIBポリペプチド又はその変異体の活性を、細胞ベースのアッセイ又はインビボアッセイで試験することもできる。

【0249】

天然のActRIIBポリペプチドと比べて選択的な又は全般的に増大した効力を有する、コンビナトリアル由来の変異体を作製することができる。同様に、突然変異生成によって、対応する野生型ActRIIBポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生じさせることができる。例えば、改変タンパク質を、タンパク質分解、又は天然のActRIIBポリペプチドの破壊、さもなければ、不活化をもたらす他の細胞プロセスに対してより安定な状態又はあまり安定でない状態にするにすることができる。そのような変異体、及びそれらをコードする遺伝子を用いて、ActRIIBポリペプチドの半減期を調節することにより、ActRIIBポリペプチドレベルを改変することができる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的効果を生じることができ、対象における組換えActRIIBポリペプチドレベルのより厳しい制御を可能にすることができる。Fc融合タンパク質では、突然変異をリンカー(存在する場合)及び/又はFc部分中で生成させて、タンパク質の半減期を改変することができる。

10

20

30

40

【0250】

コンビナトリアルライブラリーは、各々の潜在的ActRIIBポリペプチド配列の少なくとも一部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーによって生成させることができる。例えば、潜在的ActRIIBポリペプチドヌクレオチド配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、又はその代わりに、より大きな融合タンパク質のセット(例えば、ファージディスプレイの場合)として発現可能となるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結して遺伝子配列にすることができる。

【0251】

潜在的ホモログのライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成装置で実行することができ、その後、合成遺伝子を発現用の適当なベクターに連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である(例えば、Narang, S Aの文献(1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraらの文献(1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton編, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakuraらの文献(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraらの文献(1984) Science 198:1056; Ikeらの文献(1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照されたい)。そのような技術は、他のタンパク質の定方向進化において利用されている(例えば、Scottらの文献(1990) Science 249:386-390; Robertsらの文献(1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlinらの文献(1990) Science 249: 404-406; Cwirlaらの文献(1990) PNAS USA 87: 6378-6382; 並びに米国特許第5,223,409号、第5,198,346号、及び第5,096,815号を参照されたい)。

30

40

【0252】

或いは、他の形態の突然変異生成を用いて、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、ActRIIBポリペプチド変異体を、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成などを用いるスクリーニングによって(Rufらの文献(1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wangらの文献(1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balintらの文献(1993) Gene 137:109-118; Grodbergらの文献(1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashimaらの文献(1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowmanらの文献(1991) Biochemistry 30:10832-10838; 及びCunninghamらの文献(1989) Science 244:1081-1085)、リンカースキャニング突然変異生成によって(Gustinらの文献(1993) Virology 193:653-660; Brown

50

らの文献(1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnightらの文献(1982) Science 232:316);飽和突然変異生成によって(Meyersらの文献(1986)Science 232:613); PCR突然変異生成によって(Leungらの文献(1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19);又は化学的突然変異生成などを含むランダム突然変異生成によって(Millerらの文献(1992) 細菌遺伝学の短期講座(A Short Course in Bacterial Genetics), CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;及びGreenerらの文献(1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)、ライプラリーから作製し、単離することができる。特にコンビナトリアル設定でのリンカースキャニング突然変異生成は、ActRIIBポリペプチドの切断(生物活性)形態を同定する魅力的な方法である。

## 【0253】

10

点突然変異及び切断によって作製されたコンビナトリアルライプラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、さらに言うなら、特定の性質を有する遺伝子産物のcDNAライプラリーをスクリーニングするための、広範な技術が当技術分野で公知である。そのような技術は、一般に、ActRIIBポリペプチドのコンビナトリアル突然変異生成によって作製される遺伝子ライプラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライプラリーのスクリーニングに最も広く使用されている技術は、通常、遺伝子ライプラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、適当な細胞を得られたベクターのライプラリーで形質転換すること、及びコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出によって、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的簡単な単離が容易になる条件下で発現させることを含む。好ましいアッセイとしては、アクチビン結合アッセイ及びアクチビン媒介性細胞シグナル伝達アッセイが挙げられる。

20

## 【0254】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドは、ActRIIBポリペプチドに天然に存在する任意の修飾に加えて、翻訳後修飾をさらに含み得る。そ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、及びアシリル化が挙げられるが、これらに限定されない。結果として、修飾されたActRIIBポリペプチドは、非アミノ酸要素、例えば、ポリエチレンギリコール、脂質、多糖又は单糖、及びホスフェートを含有し得る。ActRIIBポリペプチドの機能性に対するそのような非アミノ酸要素の効果は、当業者に公知の任意の方法によって試験することができる。ActRIIBポリペプチドが、ActRIIBポリペプチドの新生形態を切断することによって細胞内で産生される場合、翻訳後プロセシングもまた、タンパク質の正確なフォールディング及び/又は機能に重要であり得る。様々な細胞(例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、W138、NIH-3T3、又はHEK293)は、そのような翻訳後活性のための特異的細胞装置及び特徴的機構を有しており、該細胞を、ActRIIBポリペプチドの正確な修飾及びプロセシングを保証するために選択することができる。

30

## 【0255】

ある態様において、ActRIIBポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、ActRIIBポリペプチドの少なくとも一部及び1以上の融合ドメインを有する融合タンパク質が含まれる。そのような融合ドメインのよく知られた例としては、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンストラ\_nsフェラーゼ(GST)、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(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)、又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。融合ドメインを、所望の特性を付与するように選択することができる。例えば、いくつかの融合ドメインは、親和性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。親和性精製の目的で、親和性クロマトグラフィー用の関連するマトリックス、例えば、グルタチオン、アミラーゼ、及びニッケル又はコバルトコンジュゲート樹脂が使用される。そのようなマトリックスの多くは、「キット」形態で入手可能であり、これには、例えば、Pharmacia GST精製システム及び(HIS6)融合パートナーと合わせて有用な、QIAexpress(商標)システム(Qiagen)がある。別の例として、融合ドメインを、ActRIIBポリペプチドの検出を容易にするように選択することができる。そのような検出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質(例えば、G

40

50

FP)及び通常、特異的抗体が利用可能な短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体がすぐに利用可能である周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)、及びc-mycタグが挙げられる。場合により、融合ドメインは、例えば、第Xa因子又はトロンビン用のプロテアーゼ切断部位、を有し、該部位は、関連するプロテアーゼが融合タンパク質を部分消化し、それにより、組換えタンパク質をそれから遊離させることを可能にする。その後、遊離したタンパク質を、後続のクロマトグラフィー分離によって融合ドメインから単離することができる。ある好ましい実施態様において、ActRIIBポリペプチドを、インビボでActRIIBポリペプチドを安定化するドメイン(「スタビライザー」ドメイン)と融合させる。「安定化する」とは、血清半減期を延長する全てのことを意味し、これは、破壊の減少によるものか、腎臓によるクリアランスの減少によるものか、又は他の薬物動態作用によるものかを問わない。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範なタンパク質に望ましい薬物動態特性を付与することができる。同様に、ヒト血清アルブミンへの融合は、望ましい特性を付与することができる。選択され得る他のタイプの融合ドメインとしては、多量体化(例えば、二量体化、四量体化)ドメイン及び(望ましい場合、追加の生物学的機能、例えば、骨成長又は筋肉成長のさらなる刺激を付与する)機能ドメインが挙げられる。

10

## 【0256】

融合タンパク質の様々なエレメントを、所望の機能と一致する任意の方法で配置し得ることが理解される。例えば、ActRIIBポリペプチドを異種ドメインのC末端に配置することができ、又はその代わりに、異種ドメインをActRIIBポリペプチドのC末端に配置することができる。ActRIIBポリペプチドドメイン及び異種ドメインは、融合タンパク質中で隣接している必要がなく、追加のドメイン又はアミノ酸配列を、どちらかのドメインのC末端もしくはN末端、又はこれらのドメインの間に含めることができる。

20

## 【0257】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドは、ActRIIBポリペプチドを安定化することができる1以上の修飾を含む。例えば、そのような修飾は、ActRIIBポリペプチドのインビトロ半減期を向上させるか、ActRIIBポリペプチドの循環半減期を向上させるか、又はActRIIBポリペプチドのタンパク質分解を低下させる。そのような安定化修飾としては、融合タンパク質(例えば、ActRIIBポリペプチド及びスタビライザードメインを含む融合タンパク質を含む)、グリコシリ化部位の修飾(例えば、ActRIIBポリペプチドへのグリコシリ化部位の付加を含む)、並びに炭水化物部分の修飾(例えば、ActRIIBポリペプチドからの炭水化物部分の除去を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。融合タンパク質の場合、ActRIIBポリペプチドを、スタビライザードメイン、例えば、IgG分子(例えば、Fcドメイン)に融合させる。本明細書で使用されるように、「スタビライザードメイン」という用語は、融合タンパク質の場合に見られる融合ドメイン(例えば、Fc)を指すだけでなく、炭水化物部分などの非タンパク質性修飾、又はポリエチレンギリコールなどの非タンパク質性ポリマーも含む。

30

## 【0258】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物は、単離及び/又は精製されたActRIIBポリペプチドを使用する、すなわち、他のタンパク質から単離されているか、又は別の方法で他のタンパク質を実質的に含まない、ActRIIBポリペプチドを本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。ActRIIBポリペプチドは、通常、組換え核酸からの発現によって產生される。

40

## 【0259】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドは、本明細書に開示される断片、機能的変異体、及び融合タンパク質を含む、単離された及び/又は組換え核酸によってコードされる。例えば、配列番号19は、天然のヒトActRIIB前駆ポリペプチドをコードする。対象核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。そのような核酸は、DNA又はRNA分子であり得る。これらの核酸を、例えば、ActRIIBポリペプチドを作製する方法で、又は直接的な治療剤として(例えば、遺伝子療法の手法で)使用するこ

50

とができる。

#### 【0260】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる核酸は、配列番号19の変異体並びに可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)の変異体である核酸を含むことがさらに理解される。変異体ヌクレオチド配列には、1以上のヌクレオチド置換、付加、又は欠失によって異なる配列、例えば、アレル変異体が含まれる。

#### 【0261】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRII Bポリペプチドを産生するために使用することができる単離された又は組換え核酸配列は、配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%同一である。当業者は、配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)に相補的な核酸配列、並びに配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)の変異体を、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができることを理解するであろう。さらなる実施態様において、該核酸配列は、単離されたもの、組換え体、及び/もしくは異種ヌクレオチド配列と融合したもの、又はDNAライブラリー中のものであることができる。

#### 【0262】

他の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRII Bポリペプチドを産生するために使用することができる核酸は、配列番号19に表記されるヌクレオチド配列もしくは可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)、配列番号19もしくは可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)の相補的配列、又はそれらの断片に高いストリンジエンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシー条件を変化させることができることを理解するであろう。例えば、ハイブリダイゼーションを、約45°での $6.0 \times$  塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、次いで、50°での $2.0 \times$  SSCの洗浄で実施することができる。例えば、洗浄工程での塩濃度を、50°で約 $2.0 \times$  SSCの低いストリンジエンシーから50°で約 $0.2 \times$  SSCの高いストリンジエンシーまで選択することができる。さらに、洗浄工程での温度を、室温、約22°での低いストリンジエンシー条件から約65°での高いストリンジエンシー条件へと上昇させることができる。温度と塩の両方を変化させることができ、又は他の変数を変化させながら、温度もしくは塩濃度を一定に保つことができる。一実施態様において、室温での $6 \times$  SSC、次に、室温での $2 \times$  SSCでの洗浄の低いストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする核酸を、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。

#### 【0263】

遺伝暗号の縮重のために配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)に示される核酸とは異なる単離された核酸を用いて、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生することもできる。例えば、いくつかのアミノ酸は、複数のトリプレットによって指定される。同じアミノ酸を特定するコドン、又はシノニム(例えば、CAUとCACは、ヒスチジンについてのシノニムである)は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント突然変異」を生じさせることができる。しかしながら、対象タンパク質のアミノ酸配列の変化を實際にも

10

20

30

40

50

たらすDNA配列多型が哺乳動物細胞の間に存在すると考えられる。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1以上のヌクレオチドにおけるこれらの変異(variation)(ヌクレオチドの最大約3~5%)が、天然のアレル変異(variation)が原因で、所与の種の個体間に存在し得ることを理解するであろう。ありとあらゆるそのようなヌクレオチド変異(variation)及び結果として生じるアミノ酸多型を本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。

#### 【0264】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIポリペプチドを産生するために使用することができる組換え核酸を、発現コンストラクト中の1以上の調節ヌクレオチド配列に機能的に連結することができる。調節ヌクレオチド配列は、通常、発現に使用される宿主細胞に適したものである。種々の宿主細胞について、数多くの種類の適切な発現ベクター及び好適な調節配列が当技術分野で公知である。一般に、該1以上の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダー又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、並びにエンハンサー又はアクチベーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。当技術分野で公知の構成的又は誘導性プロモーターを本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。プロモーターは、天然プロモーター、又は複数のプロモーターのエレメントを組み合わせるハイブリッドプロモーターのどちらかであり得る。発現コンストラクトは、細胞内でプラスミドなどのエピソーム上に存在してもよく、又は発現コンストラクトは、染色体に挿入されてもよい。好ましい実施態様において、発現ベクターは、形質転換した宿主細胞の選択を可能にする選択可能マーカー遺伝子を含む。選択可能マーカー遺伝子は当技術分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なる。

10

20

30

40

#### 【0265】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる核酸は、ActRIIBポリペプチドをコードし、少なくとも1つの調節配列に機能的に連結されているヌクレオチド配列を含む発現ベクター中に提供される。調節配列は当技術分野で認められており、ActRIIBポリペプチドの発現を導くように選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節配列は、Goeddelの文献;遺伝子発現技術:酵素学の方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology), Academic Press, San Diego, Calif.(1990)に記載されている。例えば、それに機能的に連結されたときDNA配列の発現を制御する多種多様な発現制御配列のいずれかをこれらのベクター中で用いて、ActRIIBポリペプチドをコードするDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40の初期及び後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルス又はサイトメガロウイルス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又はTRCシステム、その発現がT7 RNAポリメラーゼによって誘導されるT7プロモーター、ラムダファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖系酵素のプロモーター、酸ホスファターゼ、例えば、Pho5のプロモーター、酵母の接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、並びに原核もしくは真核細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、並びにこれらの様々な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及び/又は発現が望まれるタンパク質の種類のような因子によって決ま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、そのコピー数を制御する能力、及び該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考慮されるべきである。

#### 【0266】

組換え核酸は、クローニングされた遺伝子、又はその一部を、原核細胞、真核細胞(酵母、鳥類、昆虫、もしくは哺乳動物)、又はその両方における発現に好適なベクター中に連結することにより産生することができる。組換えActRIIBポリペプチドの產生用の発現

50

ビヒクルとしては、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、好適なベクターとしては、大腸菌などの原核細胞における発現用の、以下のタイプのプラスミド：pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、及びpUC由来プラスミドが挙げられる。

#### 【0267】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌におけるベクターの増殖を促進する原核生物配列と、真核細胞で発現される1以上の真核生物転写ユニットの両方を含む。pcDNA1/amp<sup>10</sup>、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 及びpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適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うちのいくつかは、原核細胞と真核細胞の両方における複製及び薬物耐性選択を容易にするために、pBR322などの細菌プラスミド由来の配列で修飾されている。或いは、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、又はエプスタイン-バーウイルス(pHEBo、pREP由来、及びp205)などのウイルスの派生物を、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現に使用することができる。(レトロウイルスを含む)他のウイルス発現系の例は、以下の遺伝子療法送達系の記載において見出すことができる。プラスミドの増殖及び宿主生物の形質転換に利用される様々な方法は、当技術分野で周知である。原核細胞と真核細胞の両方に関する他の好適な発現系、及び一般的な組換え手順については、分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning A Laboratory Manual)、第3版、Sambrook、Fritsch、及びManiatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)を参照されたい。いくつかの例において、バキュロウイルス発現系の使用によって組換えポリペプチドを発現させることが望ましい場合がある。そのようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター(例えば、pVL1392、pVL1393、及びpVL941)、pAcUW由来ベクター(例えば、pAcUW1)、並びにpBlueBac由来ベクター(例えば、-gal含有pBlueBac III)が挙げられる。

#### 【0268】

一実施態様において、Pcmv-Scriptベクター(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4ベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)、及びpCI-neoベクター(Promega, Madison, Wi s.)などのベクターを、CHO細胞内での本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドの產生用に設計することができる。明らかになるように、対象遺伝子コンストラクトを用いて、例えば、精製用の、融合タンパク質又は変異体タンパク質を含む、タンパク質を產生するために、培養で増殖した細胞内での対象ActRIIBポリペプチドの発現を生じさせることができる。

#### 【0269】

1以上の該対象ActRIIBポリペプチドのコード配列(例えば、配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸))を含む組換え遺伝子でトランスフェクトされた宿主細胞を用いて、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを產生することができる。宿主細胞は、任意の原核又は真核細胞であり得る。例えば、ActRIIBポリペプチドを、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を用いる)、酵母、又は哺乳動物細胞で発現させることができる。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

#### 【0270】

したがって、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドを產生する方法である。例えば、ActRIIB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を、ActRIIBポリペプチドの発現が生じるのを可能にする適当な条件下で培養することができる。ActRIIBポリペプチドを分泌させ、細胞とActRIIBポリペプチドを含む培地の混合物から単離することができる。或いは、ActRIIBポリペプチドを細胞質内又は膜画分に保持し、細胞を回収し、溶解させ、タンパク質を単離することができる。細胞培養物には、宿主細胞、培地、及び他の副産物が含まれる。細胞培養用の好適な培地は、当技術分野で周知である。対象ActRIIBポリペプ

10

20

30

40

50

チドを、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、ActRIIBポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体による免疫親和性精製、及びActRIIBポリペプチドに融合しているドメインに結合する物質による親和性精製(例えば、プロテインAカラムを用いて、ActRIIB-Fc融合体を精製することができる)を含む、タンパク質を精製するための当技術分野で公知の技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞、又はその両方から単離することができる。好ましい実施態様において、ActRIIBポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質である。好ましい実施態様において、精製は、例えば、以下のもの:プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーのうちの3つ以上を、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される。精製は、ウイルス濾過及びバッファー交換で終了させることができる。本明細書で実証されるように、ActRIIB-hFcタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定して98%を超える純度、SDS PAGEにより決定して95%を超える純度に精製された。この精製レベルは、マウスの骨に対する望ましい効果並びにマウス、ラット、及び非ヒト靈長類における許容し得る安全性プロファイルを達成するのに十分であった。

10

20

30

40

50

#### 【0271】

別の実施態様において、組換えActRIIBポリペプチドの所望の部分のN末端におけるポリ-(His)/エンテロキナーゼ切断部位配列などの精製リーダー配列をコードする融合遺伝子は、Ni<sup>2+</sup>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することができる。次いで、精製リーダー配列をエンテロキナーゼによる処理によって後から除去し、精製ActRIIBポリペプチドを提供することができる(例えば、Hochuliらの文献(1987) J. Chromatography 411:177; 及びJanknechtらの文献、PNAS USA 88:8972を参照されたい)。

#### 【0272】

融合遺伝子を作製する技術は周知である。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の接続は、ライゲーションのための平滑末端又は互い違い末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要な場合の付着末端の充填(filling-in)、望ましくない接続を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的ライゲーションを利用する従来の技術に従って実施される。別の実施態様において、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む従来の技術によって合成することができる。或いは、後からアニーリングさせてキメラ遺伝子配列を生成させることができ2つの連続する遺伝子断片間の相補的突出を生じさせるアンカープライマーを用いて、遺伝子断片のPCR增幅を実施することができる(例えば、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、Ausubelら編、John Wiley & Sons: 1992を参照されたい)。

#### 【0273】

ActRIIB-Fc融合タンパク質は、安定にトランスフェクトされたCHO-DUKX BI 1細胞で、配列番号8の組織プラスミノーゲンリーダー配列を用いて、pAID4ベクター(SV40 ori/エンハンサー、CMVプロモーター)から発現させることができる。Fc部分は、配列番号7に示されるヒトIgG1 Fc配列を含むことができる。ある実施態様において、発現させたとき、含まれるタンパク質は、ActRIIB-Fc融合タンパク質1分子当たり、平均で約1.5~2.5モルのシアル酸を有する。

#### 【0274】

ある実施態様において、ActRIIB-Fc融合体の長い血清半減期は、ヒト対象で25~32日であることができる。さらに、CHO細胞で発現される物質は、ヒト293細胞で発現されるActRIIB-hFc融合タンパク質について報告されたものよりも高いアクチビンBリガンドに対する親和性を有することができる(del Reらの文献、J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35)。さらに、理論に束縛されるものではないが、TPAリーダー配列の使用は、他のリーダー配列よりも大きな産生をもたらし、天然のリーダーで発現されるActRIIB-Fcとは異なり、極めて純粋なN末端配列を提供することができる。天然のリーダー配列の使用は、各

々異なるN末端配列を有する2つの主要な種のActRIIB-Fcを生じさせることができる。

【0275】

(8.5.3 他のActRII受容体シグナル伝達インヒビター)

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達のインヒビターは、核酸化合物である。

【0276】

ActRII受容体を阻害する核酸化合物のカテゴリーの例としては、アンチセンス核酸、si RNA又はRNAiコンストラクト、及び触媒核酸コンストラクトが挙げられる。核酸化合物は、一本鎖又は二本鎖であり得る。二本鎖化合物は、鎖のどちらか一方が一本鎖である突出又は非相補性領域を含むこともできる。一本鎖化合物は、自己相補性領域を含むことができ、これは、該化合物が、二本鎖らせん構造の領域を含む、いわゆる「ヘアピン」又は「システムループ」構造を形成し得ることを意味する。

10

【0277】

ある実施態様において、ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、1000以下、500以下、250以下、100以下、又は50、35、30、25、22、20、もしくは18以下のヌクレオチドの全長ActRII受容体核酸配列又はアクチビン核酸配列(例えば、<sub>A</sub>又は<sub>B</sub>とも呼ばれる、アクチビンA又はアクチビンBサブユニットの核酸配列)からなる領域に相補的であるヌクレオチド配列を含み得る。具体的な実施態様において、相補性領域は、少なくとも8ヌクレオチド、任意に、少なくとも10又は少なくとも15ヌクレオチド、任意に、15~25ヌクレオチドである。相補性領域は、標的転写物のイントロン、コード配列、又は非コード配列、例えば、コード配列部分に含まれ得る。一般に、ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、約8~約500ヌクレオチド又は塩基対長の長さを有し、任意に、長さは、約14~約50ヌクレオチドである。ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、DNA(特にアンチセンスとして使用される)、RNA、又はRNA:DNAハイブリッドであり得る。どの1つの鎖も、DNAとRNAの混合物、及びDNA又はRNAのどちらかに容易に分類することができない修飾形態を含み得る。同様に、二本鎖核酸化合物は、DNA:DNA、DNA:RNA、又はRNA:RNAであり得、どの1つの鎖も、DNAとRNAの混合物、及びDNA又はRNAのどちらかに容易に分類することができない修飾形態も含み得る。

20

【0278】

ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、骨格(ヌクレオチド間結合を含む、天然の核酸の糖-リン酸部分)又は塩基部分(天然の核酸のプリンもしくはピリミジン部分)に対する1以上の修飾を含む、種々の修飾のいずれかを含み得る。ある実施態様において、アンチセンス核酸化合物は、約15~約30ヌクレオチドの長さを有し、多くの場合、特定の特徴、例えば、血清中での安定性、細胞内での安定性、又は例えば、経口送達化合物の場合は胃、及び吸入化合物の場合は肺などの、該化合物が送達される可能性が高い場所での安定性を改善する1以上の修飾を含む。RNAiコンストラクトの場合、標的転写物に相補的な鎖は、通常、RNA又はその修飾物である。他の鎖は、RNA、DNA、又は任意の他の変形物であり得る。二本鎖又は一本鎖「ヘアピン」RNAiコンストラクトの二重鎖部分は、ある実施態様において、それがDicer基質としての役割を果たす限り、18~40ヌクレオチド長、及び任意に、約21~23ヌクレオチド長の長さを有する。触媒的又は酵素的核酸は、リボザイム又はDNA酵素であり得、修飾形態も含み得る。ある実施態様において、ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、生理的条件下で及び非センス又はセンス対照がほとんど又は全く効果がない濃度で、その標的の発現を約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、又はそれより大きく阻害し得る。核酸化合物の効果を試験するための濃度としては、1、5、10マイクロモル濃度、又はそれを上回る濃度が挙げられる。

30

【0279】

他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達のインヒビターは、抗体である。そのような抗体としては、アクチビン(特に、<sub>A</sub>又は<sub>B</sub>とも呼ばれる、アクチビンA又はBサブユニット)に結合し、ActRII受容体結合を破壊する抗体;及びActRII受容体ポリペプチド(例えば、可溶性ActRIIA又は可溶性ActRIIBポリ

40

50

ペプチド)に結合し、アクチビン結合を破壊する抗体が挙げられる。

【0280】

ActRII受容体ポリペプチド又はアクチビンポリペプチドに由来する免疫原を使用することにより、抗タンパク質/抗ペプチド抗血清又はモノクローナル抗体を標準的なプロトコルによって作製することができる(例えば、抗体:実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)、Harlow及びLane編(Cold Spring Harbor Press: 1988)を参照されたい)。哺乳動物、例えば、マウス、ハムスター、又はウサギを、ActRII受容体ポリペプチドの免疫原性形態、抗体応答を誘発することができる抗原性断片、又は融合タンパク質で免疫することができる。タンパク質又はペプチドに免疫原性を付与する技術には、担体へのコンジュゲーション又は当技術分野で周知の他の技術が含まれる。ActRII受容体又はアクチビンポリペプチドの免疫原性部分は、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫の進捗は、血漿又は血清中の抗体力価の検出によってモニタリングすることができる。標準的なELISA又は他の免疫アッセイを抗原としての免疫原とともに用いて、抗体のレベルを評価することができる。

10

【0281】

動物をActRII受容体ポリペプチドの抗原性調製物で免疫した後、抗血清を得ることができ、望ましい場合、ポリクローナル抗体を血清から単離することができる。モノクローナル抗体を產生するために、抗体產生細胞(リンパ球)を免疫動物から回収し、標準的な体細胞融合法によって骨髄腫細胞などの不死化細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。そのような技術は当技術分野で周知であり、例えば、ハイブリドーマ技術(Kohler及びMilstein(1975) Nature, 256: 495-497により最初に開発されたもの)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbarらの文献(1983) Immunology Today, 4: 72)、及びヒトモノクローナル抗体を產生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleらの文献(1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)、Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)を含む。ハイブリドーマ細胞を、ActRII受容体ポリペプチドと特異的に反応する抗体の產生について免疫化学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を、そのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離することができる。

20

【0282】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、その断片を含むことが意図され、該断片もまた、対象ポリペプチドと特異的に反応する。抗体を従来の技術を用いて断片化し、該断片を、全抗体について上で記載されているのと同じ方法で、有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、F(ab)2断片は、抗体をペプシンで処理することにより作製することができる。得られたF(ab)2断片を処理して、ジスルフィド架橋を還元し、Fab断片を產生することができる。抗体は、抗体の少なくとも1つのCDR領域によって付与されるActRII受容体又はアクチビンポリペプチドに対する親和性を有する二重特異性、单鎖、キメラ、ヒト化、及び完全ヒト分子を含むことがさらに意図される。抗体は、それに付着し、検出されることができる標識をさらに含むことができる(例えば、該標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、又は酵素補因子であることができる)。

30

【0283】

ある実施態様において、抗体は組換え抗体であり、この用語は、一部は分子生物学の技術によって作製される任意の抗体を包含し、これには、CDR移植又はキメラ抗体、ライブラリー選択抗体ドメインから組み立てられたヒト抗体又は他の抗体、单鎖抗体、並びに单ドメイン抗体(例えば、ヒトV<sub>H</sub>タンパク質又はラクダ科V<sub>HH</sub>タンパク質)が含まれる。ある実施態様において、抗体はモノクローナル抗体であることができ、及びある実施態様において。例えば、ActRII受容体ポリペプチド又はアクチビンポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、検出可能な免疫応答を刺激するのに有効な量の抗原ポリペプチドを含む免疫原性組成物をマウスに投与し、該マウスから抗体產生細胞(例えば、脾臓由来の細胞)を取得し、該抗体產生細胞を骨髄腫細胞と融合させて、抗体產生ハイブリドーマを取得し、該抗体產生ハイブリドーマを試験して、該抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを同定することを含み得る。ひとつた

40

50

び取得されれば、ハイブリドーマを、細胞培養物中で、及び任意に、ハイブリドーマ由来細胞が抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する培養条件で増殖させることができる。モノクローナル抗体は、該細胞培養物から精製してもよい。

#### 【0284】

抗体に関して使用される「と特異的に反応する」という形容詞は、当技術分野で一般に理解されているように、抗体が特定のタイプの生物学的試料中の関心対象の抗原の存在を最小限検出するのに有用であるほど、抗体が関心対象の抗原(例えば、ActRII受容体ポリペプチド)と関心対象ではない他の抗原との間で十分に選択的であることを意味することが意図される。治療への応用などの、抗体を利用する特定の方法において、より高度の結合特異性が望ましい場合がある。モノクローナル抗体は、通常、所望の抗原と交差反応性ポリペプチドとを効果的に識別する傾向が(ポリクローナル抗体と比較して)より高い。抗体:抗原相互作用の特異性に影響を及ぼす1つの特徴は、抗原に対する抗体の親和性である。所望の特異性は様々な異なる親和性を伴って達成され得るが、通常、好ましい抗体は、約 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、又はそれ未満の親和性(解離定数)を有する。アクチビンとActRII受容体の異常に強力な結合を考慮すると、中和抗アクチビン又は抗ActRII受容体抗体は、通常、 $10^{-10}$ 以下の解離定数を有すると考えられる。

10

#### 【0285】

さらに、望ましい抗体を同定するために抗体をスクリーニングするために使用される技術は、得られる抗体の特性に影響を及ぼし得る。例えば、抗体を溶液中の抗原に結合させるのに使用する場合、溶液結合を試験することが望ましい場合がある。抗体と抗原の相互作用を試験して、特に望ましい抗体を同定するために、種々の異なる技術が利用可能である。そのような技術としては、ELISA、表面プラズモン共鳴結合アッセイ(例えば、Biacore(商標)結合アッセイ、Biacore AB, Uppsala, Sweden)、サンドイッチアッセイ(例えば、IGEN International社, Gaithersburg, Md.の常磁性ビーズシステム)、ウェスタンプロット、免疫沈降アッセイ、及び免疫組織化学が挙げられる。

20

#### 【0286】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達インヒビターには、別の形態のアクチビン、特に、I型受容体結合ドメイン中に改変を有し、II型受容体に結合することができ、かつ活性のある三重複合体を形成しないものが含まれる。ある実施態様において、アクチビンA、B、C、もしくはE、又は特に、ActRII受容体発現を阻害する核酸、例えば、アンチセンス分子、siRNA、又はリボザイムを、本明細書に記載の組成物及び方法で使用することができる。ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達インヒビターは、TGF- ファミリーの他のメンバーと比べて、特に、GDF8及びアクチビンに対して、GDF11媒介シグナル伝達を阻害する選択性を示す。

30

#### 【0287】

他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達のインヒビターは、ActRII受容体アンタゴニスト活性を有する非抗体タンパク質であり、これには、インヒビン(すなわち、インヒビン サブユニット)、フォリスタチン(例えば、フォリスタチン-288及びフォリスタチン-315)、ケルベロス(Cerberus)、フォリスタチン関連タンパク質('FSRP')、エンドグリン、アクチビンC、(2)-マクログロブリン、並びにM108A(位置108におけるメチオニンからアラニンへの変化)突然変異体アクチビンAが含まれる。

40

#### 【0288】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達インヒビターは、アクチビン生物活性に拮抗し、及び/又はアクチビンに結合するフォリスタチンポリペプチドである。「フォリスタチンポリペプチド」という用語には、フォリスタチンの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドが含まれ、フォリスタチンの任意の機能的単量体又は多量体がさらに含まれる。アクチビン結

50

合特性を保持するフォリスタチンポリペプチドの変異体は、フォリスタチンとアクチビンの相互作用に関する以前の研究に基づいて同定することができる。例えば、引用により完全に本明細書中に含まれるWO2008/030367号には、アクチビン結合に重要であることが示されている具体的なフォリスタチンドメイン(「FSD」)が開示されている。フォリスタチンポリペプチドには、フォリスタチンポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のフォリスタチンの配列に由来するポリペプチドが含まれる。フォリスタチンポリペプチドの例としては、成熟フォリスタチンポリペプチドもしくはより短いアイソフォーム、又は例えば、引用により完全に本明細書中に含まれるWO2005/025601号に記載されているヒトフォリスタチン前駆ポリペプチドの他の変異体が挙げられる。

10

#### 【0289】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIシグナル伝達インヒビターは、アクチビン生物活性に拮抗し、及び/又はアクチビンに結合するフォリスタチン様関連遺伝子(FLRG)である。「FLRGポリペプチド」という用語には、FLRGの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドが含まれる。アクチビン結合特性を保持するFLRGポリペプチドの変異体は、FLRGとアクチビンの相互作用をアッセイするルーチンの方法を用いて同定することができる。例えば、引用により完全に本明細書中に含まれる米国特許第6,537,966号を参照されたい。FLRGポリペプチドには、FLRGポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のFLRGの配列に由来するポリペプチドが含まれる。

20

#### 【0290】

ある実施態様において、フォリスタチンポリペプチド及びFLRGポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、フォリスタチンポリペプチド又はFLRGポリペプチドの少なくとも一部と、例えば、ポリペプチドの単離、検出、安定化、又は多量体化を容易にするドメインなどの1以上の融合ドメインとを有する融合タンパク質が含まれる。好適な融合ドメインは、ActRIIA及びActRIIBポリペプチドに関して上で詳細に論じられている。一実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、Fcドメインに融合したフォリスタチンポリペプチドのアクチビン結合部分を含む融合タンパク質である。別の実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、Fcドメインに融合したFLRGポリペプチドのアクチビン結合部分を含む融合タンパク質である。

30

#### 【0291】

##### (8.6 アッセイ)

様々なActRIIポリペプチド変異体、又は可溶性ActRIIポリペプチド変異体を、ActRIIを阻害するその能力について試験することができる。さらに、化合物を、ActRIIを阻害するその能力について試験することができる。ひとたびActRIIシグナル伝達活性のインヒビターが確認されれば、これらの化合物を本明細書に提供される方法とともに使用することができる。ActRIIは、ActRIIA又はActRIIBであることができる。下記のアッセイは、ActRIIAについて記載されているが、ActRIIBについても同様に実施することができる。

40

#### 【0292】

(8.6.1 Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性の評価)

Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を、当技術分野で公知の又は本明細書に記載の任意の方法によって決定することができる。例えば、組織試料中のSnai1、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、

50

-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルを、例えば、ノーザンプロットティング、PCR解析、リアルタイムPCR解析、又は当技術分野で公知のもしくは本明細書に記載の任意の他の技術を用いて、それぞれ、試料中のSnai1、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Osterix、Alp、BSAP、CTX、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- の転写されたRNAを評価する(例えば、定量する)ことにより決定することができる。Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22- 、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数のレベル及び/又は活性を、独立にかつそれぞれ、例えば、第8.3.1節に記載されているような、対応する参照集団における該レベル及び/又は活性と比較することができることが当業者によって認識されているであろう。一実施態様において、組織試料中のSnai1、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルを、それぞれ、試料中のSnai1、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のmRNAを評価する(例えば、定量する)ことにより決定することができる。具体的な実施態様において、Snai1、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のmRNAレベルは、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)によって決定される。具体的な実施態様において、Runx2 mRNAの核酸配列は、配列番号58の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、Alp mRNAの核酸配列は、配列番号59の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、Snai1 mRNAの核酸配列は、配列番号74の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、Dkk1 mRNAの核酸配列は、配列番号75の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、col1a1 mRNAの核酸配列は、配列番号76の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、アクチビン mRNAの核酸配列は、配列番号77の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、Osterix mRNAの核酸配列は、配列番号60の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、Klotho mRNAの核酸配列は、配列番号61の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、 -SMA mRNAの核酸配列は、配列番号70の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、MYOCD mRNAの核酸配列は、配列番号71の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、Sm22- mRNAの核酸配列は、配列番号62の核酸配列を含む。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Runx2レベルを決定するためのRunx2特異的プライマー(配列番号48及び49)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Alpレベルを決定するためのAlp特異的プライマー(配列番号50及び51)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Snai1レベルを決定するためのSnai1特異的プライマー(配列番号78及び79)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Dkk1レベルを決定するためのDkk1特異的プライマー(配列番号80及び81)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、col1a1レベルを決定するためのcol1a1特異的プライマー(配列番号82及び83)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、アクチビンレベルを決定するためのアクチビン特異的プライマー(配列番号84及び85)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Osterixレベルを決定するためのOsterix特異的プライマー(配列番号52及び53)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Klothoレベルを決定するためのKlotho特異的プライマー(配列番号54及び55)を用いて行われる。具体的な実施態様において、qRT-PCRは、Sm22- レベルを決定するためのSm22- 特異的プライマー(配列番号56及び57)を用いて行われる。

## 【0293】

組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルを、例えば、免疫組織化学的解析、ウェスタンプロットティング、ELISA、免疫沈降、フローサイトメトリー解析、又は当技術分野で公知のもしくは本明細書に記載の任意の他の技術を用いて、それぞれ、試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊

10

20

30

40

50



チビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- を、ELISA法を用いて、ヒト血清中で同定及び定量することができる。組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルを決定するために使用されるELISA法は、ELISAプレートを組織試料(例えば、ヒト血清)でコーティングすること、並びにそれぞれ、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- に特異的な抗体に結合する、それぞれ、組織試料(例えば、ヒト血清)中の、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- を検出することを含むことができる。いくつかの実施態様において、本明細書に記載されているようなSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を決定する際に使用される方法(例えば、ELISA)は、100pg/mlのSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- から検出することができる。具体的な実施態様において、ELISAは、Runx2レベルを決定するためのRunx2特異的抗体SC-390715(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、Alpレベルを決定するためのAlp特異的抗体SC-98652(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、Snai1レベルを決定するためのSnai1特異的抗体sc-393172(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、ホスホsmad2レベルを決定するためのホスホsmad2特異的抗体sc-101801(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、ホスホsmad2レベルを決定するためのホスホsmad3特異的抗体sc-130218(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、Dkk1レベルを決定するためのDkk1特異的抗体sc-374574(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、col1a1レベルを決定するためのcol1a1特異的抗体sc-8784(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)レベルを決定するためのアクチビン特異的抗体A1594(Sigma Aldrich)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、CTXレベルを決定するためのBSAP特異的抗体SC-98652(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、CTXレベルを決定するためのCTX特異的抗体ABIN1173415(Antibodies Online)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、Osterixレベルを決定するためのOsterix特異的抗体SC-22538(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、Klothoレベルを決定するためのKlotho特異的抗体SC-22218(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、-SMAレベルを決定するための-SMA特異的抗体SC-53142(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、MYOCDレベルを決定するためのMYOCD特異的抗体SC-21561(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、Sm22- レベルを決定するためのSm22- 特異的抗体SC-271719(Santa Cruz)を用いて行われる。具体的な実施態様において、ELISAは、ActRIIAレベルを決定するためのActRIIA特異的抗体ab 135634(Abcam)を用いて行われる。

#### 【0294】

本明細書に記載のElisaアッセイに記載されているRunx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22- 、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数のレベルを、独立にかつそれぞれ、例えば、第8.3.1節に記載されているような、対応する参照集団における該レベル及び/又は活性と比較することができる。

#### 【0295】

10

20

30

40

50

試料中(例えば、組織試料、例えば、大動脈、血液、血清、血漿、肝臓、脾臓、及び/又は骨髄の試料中)のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルを測定するアッセイで使用するための抗体は当技術分野で公知であるか、又は当業者に公知の手法を用いて容易に開発することができる。試料中のRunx2のレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-B4293、LS-B4294、LS-B4296の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号sc-390715の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: WH0000860M1の抗体が挙げられる。試料中のAlpのレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-B2877、LS-B1844、LS-C169212の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-98652の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB1405449の抗体が挙げられる。試料中のSnai1のレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-C161335、LS-C198229、及びLS-C169298の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-393172の抗体; 並びにSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB1404386の抗体が挙げられる。試料中のホスホsmad2のレベルを測定するアッセイで使用することができる抗体の例としては、Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CA製の、カタログ番号: sc-101801の抗体; 並びにSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB4200251及びSAB4300252の抗体が挙げられる。試料中のホスホsmad3のレベルを測定するアッセイで使用することができる抗体の例としては、Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CA製の、カタログ番号: sc-130218の抗体; 並びにSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB4300253及びSAB4504210の抗体が挙げられる。試料中のDkk1のレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-C108793、LS-C105116、及びLS-C105117の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-374574の抗体; 並びにSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: WH0022943M1の抗体が挙げられる。試料中のcol1a1のレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-B5932の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-8784の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: C2456の抗体が挙げられる。試料中のアクチビン(例えば、遊離アクチビン)のレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-C308491の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: A1719の抗体が挙げられる。試料中のBSAPのレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-B2877、LS-B1844、LS-C169212の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-98652の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB1405449の抗体が挙げられる。試料中のCTXのレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、ABIN1173415(Antibodies Online)が挙げられる。試料中のOsterixのレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-C139215、LS-C132610、LS-B6531の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-133871の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: WH0121340M1の抗体が挙げられる。試料中のKlothoのレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-C165587、LS-C145689、LS-C8376の抗体; Sant

10

20

30

40

50

a Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-22218の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB1306662の抗体が挙げられる。試料中の -SMAのレベルを測定するアッセイで使用することができる抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-B6000、LS-B5966、LS-B2161の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: SC-21561の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: A5228の抗体が挙げられる。試料中のMYOCDのレベルを測定するアッセイで使用することができる抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-C37407、LS-C153495、LS-c137255の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: SC-53142の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: M8948の抗体が挙げられる。試料中のSm22- のレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、LifeSpan Biosciences社、Seattle, WA製の、カタログ番号LS-B2563、LS-C139114、LS-C210979の抗体; Santa Cruz Biotechnology社、Santa Cruz, CAから入手可能な、カタログ番号: sc-271719の抗体; 及びSigma-Aldrich Co. LLCから入手可能な、製品番号: SAB2501014の抗体が挙げられる。試料中のActRIIAのレベルを測定するアッセイで使用することができるモノクローナル抗体の例としては、Abcam製の、製品コード: ab135634の抗体が挙げられる。

10

## 【0296】

Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- の活性を、限定するものではないが、レポーター遺伝子アッセイ(例えば、それぞれ、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、もしくはSm22- 応答性レポーター遺伝子コンストラクトを含む)又は任意の他の生物活性アッセイを含む、当技術分野で公知の任意のアッセイによって測定することができる。

20

## 【0297】

Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を、本明細書に記載の方法に従って治療される対象から得られた任意の組織試料中で評価することができる。ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、本明細書に記載の方法に従って治療される対象の大動脈、血清、肝臓、脾臓、又は骨髄から得られた試料中で評価される。一実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、本明細書に記載の方法に従って治療される対象の血清から得られた試料中で評価される。別の実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、本明細書に記載の方法に従って治療される対象の大動脈、脾臓から得られた試料中で評価される。また別の実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、本明細書に記載の方法に従って治療される対象の骨髄から得られた試料中で評価される。

30

## 【0298】

当技術分野で公知の又は本明細書に記載のアッセイを用いて決定されるRunx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、

40

50

MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数の活性を、それぞれ、例えば、第8.3.1節に記載されているような、対応する参照集団における該レベル及び/又は活性と比較することができる事が当業者によって認識されているであろう。

#### 【0299】

いくつかの実施態様において、対象の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を、それぞれ、第8.6節に記載されているような参考集団の組織試料中(例えば、同じ組織由来の試料中)のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性と比較する。いくつかの実施態様において、対象の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を、それぞれ、より早い時点(例えば、疾患の発症前、治療の開始前、又は治療中)の対象の組織試料中(例えば、同じ組織由来の試料中)のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性と比較する。いくつかの実施態様において、対象の組織試料(例えば、大動脈、血清、脾臓、肝臓、又は血液骨髄)中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を、それぞれ、対象の別の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性と比較する。いくつかの実施態様において、対象の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を、対象の組織試料中の別の遺伝子産物(例えば、 $\beta$ -アクチン、アクチビンA、アクチビンB)のレベル及び/又は活性と比較する。

#### 【0300】

いくつかの実施態様において、対象の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性を、それぞれ、参考集団の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性と比較する。いくつかの実施態様において、それぞれ、参考集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性と比較して上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性の検出の後に、アクチビン受容体シグナル伝達インヒビター(例えば、本明細書に記載の1以上のアクチビン受容体シグナル伝達インヒビター)を投与する。いくつかの実施態様において、アクチビン受容体シグナル伝達インヒビター(例えば、本明細書に記載の1以上のアクチビン受容体シグナル伝達インヒビター)の投与の後に、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-のレベル及び/又は活性と比較する。

RIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性をモニタリングし、任意に、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性と比較する。いくつかの実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビター(例えば、ActRIIA-hFc、例えば、配列番号7)の第1の用量の投与の後に、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を決定し、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性が、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性が、それぞれ、参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性と比較して減少している場合、該第1の用量よりも多い(例えば、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、又は10倍多い)、ActRIIシグナル伝達インヒビターの第2の用量を投与し、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性が、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性と比較して減少している場合、並びに/又はKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性が、それぞれ、参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性と比較して上昇している場合、該第1の用量よりも少ない(例えば、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、又は10倍少ない)、ActRIIシグナル伝達インヒビターの第2の用量を投与する。ある実施態様において、参照集団は、第8.6節に記載されているような集団である。  
10  
20  
30

### 【0301】

いくつかの実施態様において、治療された対象の組織試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性を、それぞれ、1人以上の健常対象の同じ組織由来の試料中のSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性と比較する。いくつかの実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性が評価される組織は、大動脈、血液、血清、骨髄、肝臓、又は脾臓である。一実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性が評価される組織は、血清である。  
40

### 【0302】

ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/も50

しくはOsterixのレベル及び/もしくは活性は、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性よりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/又は減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/もしくは活性よりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。ある実施態様において、上昇したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベル及び/又は活性は、それぞれ、参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性と等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/或いは減少したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベルは、それぞれ、参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性と等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。ある実施態様において、参照集団は、第8.6節に記載されている通りである。10

### 【0303】

ある実施態様において、上昇したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性は、それぞれ、参照集団におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性よりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/又は減少したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性は、それぞれ、参照集団におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性よりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、もしくは100%小さい。ある実施態様において、上昇したKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、参照集団の上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、もしくは上位1%におけるKlotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22- のレベル及び/もしくは活性と等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/或いは減少したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベル及び/又は活性は、参照集団の下位10%、下位5%、下位4%、下位3%、下位2%、もしくは下位1%におけるSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/もしくはOsterixのレベル及び/もしくは活性と等しいか、又はそれよりも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、200%、もしくは500%大きく;並びに/或いは減少したSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのレベル及び/又は活性は、参照集団は、第8.6節に記載されている通りである。30

### 【0304】

ある実施態様において、アクチビンのレベルは、例えば、フォリスタチンとも、フォリスタチン様3とも、インヒビンとも関連していない、アクチビンなどの、遊離アクチビンのレベルである。遊離アクチビンのレベルは、例えば、(i)試料中、例えば、血漿中のアクチビンの濃度を定量すること;(ii)試料中の、例えば、フォリスタチン、フォリスタチ40

ン様3、及びインヒビンなどの、アクチビンと関連するタンパク質の濃度を定量すること；並びに(iii)アクチビン濃度とアクチビン関連タンパク質の濃度の化学量論的組成比を計算することにより決定することができる。

#### 【0305】

本明細書に記載のアッセイを用いて、他のタンパク質及び/又は転写物、例えば、FGF23、フォリスタチン、フォリスタチン様3、インヒビン、内皮間葉転換に関するタンパク質及び/又は転写物などのレベル及び/又は活性を決定することもできる。

#### 【0306】

ある実施態様において、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- のレベル及び/又は活性は、組織(例えば、組織試料)におけるものである。ある実施態様において、組織は大動脈である。ある実施態様において、組織は腎臓である。ある実施態様において、組織は骨である。ある実施態様において、組織は血清である。好ましい実施態様において、Runx2、Dkk1、Alp、osterix、sm22-、Klotho、-SMA、ActRIIA、Axin2、及びMYOCDのレベル及び/又は活性は、大動脈におけるものである。好ましい実施態様において、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、ActRIIA、Axin2、及びcol1a1のレベル及び/又は活性は、腎臓におけるものである。好ましい実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、血清におけるものである。ある実施態様において、上昇したアクチビンレベルは、尿細管周囲筋線維芽細胞におけるものである。ある実施態様において、上昇したアクチビンレベルは、腎上皮におけるものではない。ある実施態様において、上昇したアクチビンレベルは、尿細管周囲筋線維芽細胞におけるものであり、かつ上昇したアクチビンレベルは、腎上皮におけるものではない。

10

20

30

40

50

#### 【0307】

Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、Sm22-、ホスホsmad3、及び尿タンパク質のうちの1つ又は複数のレベル及び/又は活性を、独立にかつそれぞれ、例えば、第8.3.1節に記載されているような、対応する参照集団における該レベル及び/又は活性と比較することができることが当業者によって認識されているであろう。

#### 【0308】

##### (8.6.2 参照集団)

ある実施態様において、本明細書に記載の参照集団から得られるデータ(例えば、バイオマーカーレベル又は臨床症状)を用いて、本明細書に提供される方法に従って治療される又は治療されるべき対象から得られる類似のデータが病理学的に高い(例えば、増大している)か、又は低い(例えば、減少している)かを決定する。

#### 【0309】

ある実施態様において、参照集団の大きさは、1、5、10、25、50、75、100、200、250、300、400、500、又は1000個体であることができる。ある実施態様において、参照集団は、ランダムボランティアからなる。ある実施態様において、参照集団は、健常人からなる。ある実施態様において、参照集団は、第8.4節に記載されているような患者集団と同じ年齢、体重、及び/又は性別の人からなる。ある実施態様において、参照集団は、心血管疾患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、血管石灰化患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、心血管疾患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、血管石灰化と関連し及び/又は血管石灰化に起因する心血管疾患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、腎疾患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、慢性腎疾患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、病理学的に高いレベルの動脈壁硬化患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/又は高いレベルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は、LVH患有しない人からなる。ある実施態様において、参照集団は

、LVHと関連し及び/又はLVHに起因する心血管疾患有しない人からなる。

【0310】

ある実施態様において、参照集団は、心血管疾患の1以上の症状の発症の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、血管石灰化の1以上の症状の発症の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、慢性腎疾患の1以上の症状の発症の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、高いレベルの動脈壁硬化の1以上の症状の発症の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、LVHの1以上の症状の発症の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、対象における心血管疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、対象における血管石灰化の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、対象における慢性腎疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、ステージ1の慢性腎疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、ステージ2の慢性腎疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、ステージ3の慢性腎疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、ステージ4の慢性腎疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、ステージ5の慢性腎疾患の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、対象における高いレベルの動脈壁硬化の診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、対象におけるLVHの診断の前に、本明細書に提供される方法に従って治療される対象を指す。ある実施態様において、参照集団は、本明細書に提供される方法に従って治療されるか又は本明細書に記載の疾患であると診断される前に、動脈壁硬化の増大を示している人からなる。ある実施態様において、参照集団は、本明細書に提供される方法に従って治療されるか又は本明細書に記載の疾患であると診断される前に、概要(第6節参照)に列挙されたマーカーのうちの1つの上昇傾向を示している人からなる。ある実施態様において、参照集団は、本明細書に提供される方法に従って治療されるか又は本明細書に記載の疾患であると診断される前に、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、Osterix、ホスホsmad3、及び/又は尿タンパク質のレベルの上昇を示している人からなる。ある実施態様において、参照集団は、本明細書に提供される方法に従って治療されるか又は本明細書に記載の疾患であると診断される前に、概要(第6節参照)に列挙されたマーカーのうちの1つの下落傾向を示している人からなる。ある実施態様において、参照集団は、本明細書に提供される方法に従って治療されるか又は本明細書に記載の疾患であると診断される前に、-SMA、MYOCD、Sm22-、又はActRIIAのレベルの減少を示している人からなる。

【0311】

(8.6.3 内皮間葉転換)

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象におけるEnMTを、細胞集団の運命を決定するための系譜追跡アッセイによってモニタリングすることができる。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って治療される対象におけるEnMTを、例えば、Snai1などの、EnMTと関連する1以上のタンパク質又は転写物のレベル及び/又は活性を定量することによりモニタリングすることができる。

【0312】

(8.6.4 骨代謝回転)

骨代謝回転の様々な循環マーカーを用いて、低い骨代謝回転などの骨障害を診断することができる。骨代謝回転の循環マーカーは、骨特異的アルカリホスファターゼ(bAP)、才

10

20

30

40

50

ステオカルシン、プロコラーゲンI型C末端プロペプチド(PICP)、及びインスリン様成長因子-1(IGF-1)などの、骨形成のマーカーであり、一部は、ピリジノリン、デオキシピリジノリン、酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)、TRAP 5b型、ピリジノリン、デオキシピリジノリン及びプロコラーゲンI型C末端テロペプチド(ICTP)、血清又は尿コラーゲン架橋(N-テロペプチド又はC-テロペプチド)、並びに25ヒドロキシビタミンDなどの骨吸収のマーカーである。完全な副甲状腺ホルモン(PTH)分子を測定するためのアッセイを使用することもできる。当業者は、骨ミネラル密度(BMD)、骨量、骨梁量、及び骨梁幅の評価を可能にするイメージング法を認識している。例えば、Tilman B. Drueke及びSharon M. Moeの文献、慢性腎疾患における骨ミネラル代謝の障害:診断及び治療を改善するための国際的なイニシアチブ(Disturbances of bone and mineral metabolism in chronic kidney disease: an international initiative to improve diagnosis and treatment)、Nephrol Dial Transplant(2004) 19: 534-536; Okuno S、Inaba M. の文献、骨代謝回転の生化学的マーカー。新しい局面。透析と骨代謝マーカー(Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Dialysis and bone metabolic marker)、Clin Calcium. 2009 Aug;19(8):1084-91; Herberth J、Monier-Faugere MC、Mawad HW、Branscum AJ、Herberth Z、Wang G、Cantor T、Malluche HHの文献、5つによく使用されるインタクト副甲状腺ホルモンアッセイは、CKD-5対象における骨代謝回転異常のスクリーニングには有用であるが、その診断には有用でない(The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 subjects)、Clin Nephrol. 2009 Jul;72(1):5-14; Lehmann G、Ott U、Kaemmerer D、Schuetze J、Wolf G. の文献、慢性腎疾患ステージ3~5の対象における骨代謝回転の骨組織形態計測及び生化学マーカー(Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in subjects with chronic kidney disease Stages 3 - 5)、Clin Nephrol. 2008 Oct;70(4):296-305; Drueke TB. の文献、副甲状腺ホルモン測定は腎性骨疾患の診断に有用か?(Is parathyroid hormone measurement useful for the diagnosis of renal bone disease?)、Kidney Int. 2008 Mar;73(6):674-6; Yamada S、Inaba M、Kurajoh M、Shidara K、Imanishi Y、Ishimura E、Nishizawa Y. の文献、慢性腎疾患の対象における骨吸収マーカーとしての血清酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRACP5b)の有用性:腎機能障害からの独立性(Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in subjects with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction.)、Clin Endocrinol(Oxf). 2008 Aug;69(2):189-96. Epub 2008 Jan 23を参照されたい。Paul D. Millerの文献、慢性腎疾患における骨粗鬆症の診断及び治療(Diagnosis and Treatment of Osteoporosis in Chronic Renal Disease), 2009も参照されたい。

### 【0313】

軽度の腎機能障害を有するCKD対象における骨吸収をモニタリングするための別のマーカーは、I型コラーゲンN-テロペプチド(S-NTX)の血清濃度である。例えば、Hamano T、Fujii N、Nagasaki Y、Isaka Y、Moriyama T、Okada N、Imai E、Horio M、Ito T. の文献、血清NTXは、グルココルチコイド治療を受けた慢性腎疾患の対象に対する抗吸収療法を評価するための実用的マーカーである(Serum NTX is a practical marker for assessing anti-resorptive therapy for glucocorticoid treated subjects with chronic kidney disease.)、Bone. 2006 Nov;39(5):1067-72. Epub 2006 Jun 16を参照されたい。

### 【0314】

定量的コンピュータ断層撮影(QCT)を用いて、骨代謝回転を決定することもできる。

### 【0315】

対象における骨芽細胞転換をモニタリングするために、例えば、Runx2及びAlpなどのマーカーを評価することができる。血管平滑筋機能及び分化した血管平滑筋細胞のレベルをモニタリングするために、例えば、Sm22-などのマーカーを評価することができる。

### 【0316】

(8.6.5 カルシウムレベル)

10

20

30

40

50

カルシウムレベルを、例えば、カルシウムイオン選択的電極などの、当業者に公知の方法によってアッセイすることができる。ある実施態様において、全カルシウムレベルを血清、血液、大動脈、又は尿中で測定する。

### 【0317】

#### (8.6.6 血管石灰化)

冠動脈石灰化(CAC)の程度のイメージング用の非造影コンピュータ断層撮影(CT)及び非侵襲的冠動脈造影(CTA)用の造影CTは、閉塞性冠動脈疾患を診断するために一般に使用される現像法(development)である。診断的及び予後予測的な心臓評価のための放射性核種ストレス試験、冠動脈カルシウムスキャニング、及び非侵襲的冠動脈造影を使用することもできる。Berman DS、Shaw LJ、Hachamovitch R、Friedman JD、Polk DM、Hayes SW、Thomson LE、Germano G、Wong ND、Kang X、Rozanski A.の文献、診断的及び予後予測的な心臓評価のための放射性核種ストレス試験、冠動脈カルシウムスキャニング、及び非侵襲的冠動脈造影の比較使用(Comparative use of radionuclide stress testing, coronary artery calcium scanning, and noninvasive coronary angiography for diagnostic and prognostic cardiac assessment)、Semin Nucl Med. 2007 Jan;37(1):2-16を参照されたい。10

### 【0318】

無症状対象の冠動脈カルシウムスクリーニング結果を比較として使用することができる。例えば、血管石灰化が腎疾患と関連する場合、腎疾患の発症前に得られたカルシウムスクリーニング結果を比較として使用することができる。20

### 【0319】

冠動脈石灰化(CAC)の考えられる検出及び定量方法としては、x線コンピュータ断層撮影及び心筋灌流単一光子放射型コンピュータ断層撮影(SPECT)が挙げられるが、これらに限定されない。Moser KW、O'Keefe JH Jr、Bateman TM、McGhie IA.の文献、リスク因子修飾及びストレス心筋灌流イメージングの指針としての無症状対象における冠動脈カルシウムスクリーニング(Coronary calcium screening in asymptomatic subjects as a guide to risk factor modification and stress myocardial perfusion imaging)、J Nucl Cardiol. 2003 Nov-Dec;10(6):590-8。多列検出器コンピュータ断層撮影(MDCT)を用いて、血管石灰化を検出することもできる(例えば、Burriellらの文献、2007, Postgrad. Med. J. 83(985):698-704を参照されたい)。30

### 【0320】

血管石灰化の別の診断方法は、陽電子放出断層撮影(PET)/コンピュータ断層撮影(CT)併用時の胸部大動脈壁へのフッ素18フルオロデオキシグルコース(FDG)取込みである。Tatsu mi M、Cohade C、Nakamoto Y、Wahl RL.の文献、PET/CT時の大動脈壁へのフルオロデオキシグルコース取込み:活動性アテローム性動脈硬化症の発見の可能性(Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis)、Radiology. 2003 Dec;229(3):831-7. Epub 2003 Oct 30を参照されたい。

### 【0321】

さらに別の実施態様において、超高速CTを用いて、アテローム性動脈硬化性冠動脈疾患の存在を検出することができる。例えば、Breen JF、Sheedy PF 2nd、Schwartz RS、Stan son AW、Kaufmann RB、Moll PP、Rumberger JAの文献、冠動脈疾患の兆候としての超高速CTで検出される冠動脈石灰化(Coronary artery calcification detected with ultrafast CT as an indication of coronary artery disease)、Radiology. 1992 Nov;185(2):435-9を参照されたい。40

### 【0322】

電子ビームコンピュータ断層撮影スキャニングを用いて、冠動脈疾患を診断することもできる。Schmermund A、Baumgart D、Sack S、Mohlenkamp S、Gronemeyer D、Seibel R、Erbel R.の文献、症状のある対象における正常、異常、又は多義運動負荷試験を用いた電子ビームコンピュータ断層撮影による冠動脈石灰化の評価(Assessment of coronary calcification by electron-beam computed tomography in symptomatic subjects with norm

10

20

30

40

50

al, abnormal or equivocal exercise stress test)、Eur Heart J. 2000 Oct;21(20):1674-82を参照されたい。

### 【0323】

血管石灰化の別の試験では、多因性及び血栓塞栓性肺高血圧症におけるplaques組成が考慮される。慢性血栓塞栓性肺高血圧症は、グリコフォリンに富んだ粥状コアを有するアテローム性動脈硬化plaquesと関連し、多因性肺高血圧症は線維性plaquesと関連する。血栓塞栓性物質は、赤血球膜由来グリコフォリンがその主要成分である粥状コアの形成において極めて重要な役割を果たしている。したがって、慢性血栓塞栓性及び多因性肺高血圧症(一次性及び二次性(アイゼンメルゲル症候群))が検討される。Arbustini E、Morbini P、D'Armini AM、Repetto A、Minzioni G、Piovella F、Vigano M、Tavazzi Lの文献、  
多因性及び血栓塞栓性肺高血圧症におけるplaques組成:粥状コアの形成における血栓塞栓性物質の極めて重要な役割(Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation)、Heart. 2002 Aug;88(2):177-82を参照されたい。  
10

### 【0324】

沈着したカルシウムplaquesの密度測定に基づくカルシウムスコアリングシステムであるアガットストンスコアリングを用いて、血管石灰化を定量することができる。このシステムでは、血管石灰化のレベルを多列検出器コンピュータ断層撮影(MDCT)によって測定することができ、アガットストンスコアにおける進行速度の減衰を評価することができる(例えば、Sharmaらの文献、2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:603-611を参照されたい)  
20

。

### 【0325】

さらに、血管石灰化は、Adragaoらの文献、2004, Nephrol. Dial. Transplant 19:1480-1488に記載の方法を用いて評価することができる。

### 【0326】

対象における血管石灰化を定量する際に使用される別のアッセイは、病変特異的カルシウムスコアであり、これは、冠動脈石灰化のCT検査の結果としてもたらされるカルシウム測定法を含む。この方法は、例えば、Akram及びVorosの文献、2008, Int. J. cardiovasc. Imaging 14:743-749に記載されている。

### 【0327】

(8.6.7 心臓のサイズ及び心肥大)

心臓のサイズ及び心肥大は、当業者に公知の任意の方法、例えば、磁気共鳴イメージング、心電図検査、心エコー検査、及び非造影増強心臓コンピュータ断層撮影法などによって決定することができる。

### 【0328】

(8.6.8 動脈壁硬化)

動脈壁硬化のレベルは、当業者に公知の任意の方法、例えば、超音波ドップラー検査、磁気共鳴動脈撮影法を含む磁気共鳴イメージング、CT血管造影法を含むコンピュータ断層撮影法(CT)、及び当技術分野で公知の他の形態の血管造影法などによって決定することができる。

### 【0329】

(8.6.9 腎疾患)

糸球体濾過量、イヌリンクリアランス、高リン血症、及びBUNレベルは、腎疾患を決定するための当業者に公知の任意の方法によって決定することができる。腎線維化及び/又は糸球体硬化は、当業者に公知の任意の方法、例えば、腎臓組織の生検及び瘢痕化についての組織の検査などによって診断及び/又はモニタリングすることができる。腎線維化及び/又は糸球体硬化は、例えば、糸球体濾過量を測定し、及び/又は腎臓の超音波測定を実施することにより診断及び/又はモニタリングすることもできる。米国腎臓財団のウェブサイトを参照されたい。

### 【0330】

10

20

30

40

50

#### (8.6.10 動物モデル)

アテローム性動脈硬化症の低密度リポタンパク質受容体欠損(*ldlr*-/-)雄(C57Bl/6Jバックグラウンド)をJackson Laboratoriesから購入し、高脂肪食(42%のカロリーが脂肪由来)(Teklad #)を12週齢から給餌することができる。マウスは、22週齢で肥満、インスリン耐性となり、28週齢で糖尿病となり、かつ高コレステロール血症となる。

##### 【0331】

2段階の処置を用いて、以前に記載されているように、慢性腎疾患を引き起こすことができる(Davies, M.R.らの文献、2003. *J Am Soc Nephrol* 14:1559-1567; Davies, M.R.らの文献、2005. *J Am Soc Nephrol* 16:917-928.)。出生後12週で、2cmの側腹切開を介して、電気焼灼を右腎臓に適用し、その後、14週齢で左腎全摘出を行うことができる。焼灼の強度を変化させて、中等度(CKD-3)の腎損傷を生じさせ、これを20週齢でのイヌリンクリアランスによって確認する。マウスの対照群である野生型C57Bl/6Jマウスに通常食を給餌する。この対照群は、標準的対照値に使用される正常腎機能及び食餌群である。第2の群は、高脂肪食を給餌され、模擬手術される*ldlr*-/-マウスであり、この群は、正常な腎機能を有し、かつ腎疾患の効果を決定するための対照群としての役割を果たす。第3の群は、ヒトCKDのステージ3(CKD-3)と同等の低下したGFRを有し、高脂肪食を給餌され、22週で安樂死させられる、ベースライン血管石灰化群の*ldlr*-/-マウス(CKD-3)である。第4の群は、22週から始めて28週で安樂死させられるまで、週2回、ビヒクリルの皮下注射を受けるCKD-3の*ldlr*-/-マウス(CKD-3 V)である。第5の群は、22週から始めて28週で安樂死させられるまで、週2回、10mg/kgのmActRIIA-Fc(Celgene, Summit, NJ)の皮下注射を受けるCKD-3の*ldlr*-/-マウス(CKD-3 mActRIIA-Fc)である。使用された用量は、骨形成の刺激のための有効用量であることがPK/PD研究で以前に示された(Lotinun, S.らの文献、2010. *Bone* 46:1082-1088.)。

10

20

30

##### 【0332】

使用されたCKDの第2のモデルは、IV型コラーゲンの5鎖の遺伝子、COL4A5の欠損症であるX連鎖アルポート症候群のマウスホモログである(Rheault, M.N.らの文献、2004. *Journal of the American Society of Nephrology* 15:1466-1474.)。これは、自然発症腎疾患のモデルである。交配ペアをJackson Laboratoriesから購入し、実験用に交配させることができる。ヘミ接合体の雄は、生後200日で、ヒトCKDのステージ3~4に相当する腎疾患を自然発症する。

30

##### 【0333】

CKDの第3のモデルは、細胞系譜追跡に使用されるトランスジェニックマウス系統のGNZマウスにおける、*ldlr*-/-プロトコルと同様の、腎切除である。GNZレポーター雌マウス(S toller, J.Z.らの文献、2008. *Genesis*(New York, N.Y. 2000) 46:200-204.)及びTek-Creトランスジェニック雄マウス(Koni, P.A.らの文献、2001. *The Journal of Experimental Medicine* 193:741-754.)をJackson Laboratoriesから購入し、交配させて、実験用のGNZ/Tek-Cre+マウスを生ませることができる。GNZ/Tek-Cre-同腹子は、陰性対照としての役割を果たす。製造元によって推奨されるGNZ及びTek-Creマウス系統用の特異的プライマーを用いることにより、マウスのジェノタイピングを行うことができる。

40

##### 【0334】

#### (8.6.11 転写応答アッセイ)

ある実施態様において、転写応答アッセイを用いて、ActRIIシグナル伝達インヒビター、又はSnai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、ActRIIA、Axin2、及び/もしくはSm22-の活性を試験することができる。ActRII、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Osterix、Alp、BSAP、CTX、Klotho、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-シグナル伝達によって、特定の遺伝子の転写が上方調節又は下方調節される。使用される細胞培養系と転写応答とを(例えば、RT-PCRによって)測定することができる。転写応答に対する薬剤の効果は、その応答性又は活性の尺度である。ある実施態様において、ActRII、Snai1、ホ

50

スホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Osterix、Alp、BSAP、CTX、Klotho、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22-シグナル伝達に応答することが知られているプロモーター領域をレポーター遺伝子の上流にクローニングすることができる。このように、レポーター遺伝子の活性だけがアッセイされる必要があるように、このアッセイを簡易化することができる。

#### 【0335】

##### (8.6.12 スクリーニングアッセイ)

様々なActRIIポリペプチド変異体、又は可溶性ActRIIポリペプチド変異体を、ActRIIを阻害するその能力について試験することができる。さらに、化合物を、ActRIIを阻害するその能力について試験することができる。ひとたびActRIIシグナル伝達活性のインヒビターが確認されれば、これらの化合物を本明細書に提供される方法とともに使用することができる。ActRIIは、ActRIIA又はActRIIBであることができる。下記のアッセイは、ActRIIAについて記載されているが、ActRIIBについても同様に実施することができる。

10

#### 【0336】

例えば、骨産生又は骨破壊に関する遺伝子の発現に対するActRIIAポリペプチド変異体の効果を評価することができる。これは、必要な場合、1以上の組換えActRIIAリガンドタンパク質(例えば、アクチビン)の存在下で実施することができ、細胞を、ActRIIAポリペプチド及び/又はその変異体、並びに任意にActRIIAリガンドを產生するようにトランスフェクトすることができる。同様に、ActRIIAポリペプチドをマウス又は他の動物に投与することができ、1以上の骨特性、例えば、密度又は容積を評価することができる。骨折の治癒速度を評価することもできる。二重エネルギーx線吸収法(DEXA)は、動物の骨密度を評価するための十分に確立された非侵襲的な定量技術である。ヒトにおいて、中枢DEXAシステムを用いて、脊椎及び骨盤の骨密度を評価することができる。これらは、全骨密度の最良の予測因子である。末梢DEXAシステムを用いて、例えば、手、手首、足首、及び足の骨を含む、末梢骨の骨密度を評価することができる。CATスキャンを含む、従来のx線イメージングシステムを用いて、骨成長及び骨折治癒を評価することができる。さらに、定量的コンピュータ断層撮影(qCT)を用いて、骨密度を測定することができる。骨の機械的強度を評価することもできる。

20

#### 【0337】

ある態様において、本明細書に提供されるのは、アクチビン-ActRIIAシグナル伝達経路のアゴニスト又はアンタゴニストとなる化合物(薬剤)を同定するためのActRIIAポリペプチド(例えば、可溶性ActRIIAポリペプチド)及びアクチビンポリペプチドの使用である。このスクリーニングを通じて同定された化合物を試験して、骨成長又は骨石灰化をインビトロで調節するその能力を評価することができる。任意に、これらの化合物を動物モデルでさらに試験して、インビボで組織成長を調節するその能力を評価することができる。

30

#### 【0338】

アクチビン及びActRIIAポリペプチドを標的とすることによって組織成長を調節する治療剤をスクリーニングする数多くの手法がある。ある実施態様において、化合物のハイスクループットスクリーニングを実施して、骨に対するアクチビン又はActRIIA媒介性効果を攪乱する薬剤を同定することができる。ある実施態様において、アッセイを実施して、アクチビンに対するActRIIAポリペプチドの結合を特異的に阻害し又は低下させる化合物をスクリーニング及び同定する。或いは、アッセイを用いて、アクチビンに対するActRIIAポリペプチドの結合を増強する化合物を同定することができる。さらなる実施態様において、化合物を、アクチビン又はActRIIAポリペプチドと相互作用するその能力によって同定することができる。

40

#### 【0339】

種々のアッセイ形式が十分であり、本開示を考慮すれば、本明細書に明示的に記載されていないものが、それにもかかわらず、当業者によって理解されるであろう。本明細書に記載されているように、本明細書で使用される試験化合物(薬剤)は、任意のコンビナトリアル化学法によって作出することができる。或いは、対象化合物は、インビトロ又はイン

50

ビオで合成された天然の生体分子であることができる。組織成長のモジュレーターとして作用するその能力について試験される化合物(薬剤)は、例えば、細菌、酵母、植物、もしくは他の生物によって產生されるか(例えば、天然物)、化学的に產生されるか(例えば、ペプチド模倣体を含む小分子)、又は組換えて產生されることができる。本明細書で企図される試験化合物としては、非ペプチド有機分子、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、糖、ホルモン、及び核酸分子が挙げられる。具体的な実施態様において、試験薬剤は、約2,000ダルトン未満の分子量を有する小有機分子である。

#### 【0340】

試験化合物は、単一の別個の実体として提供するか、又は例えば、コンピナトリアル化学によって、複雑性のより高いライブラリー中に提供することができる。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、及び他のクラスの有機化合物を含むことができる。試験系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工程において、単離された形態か、又は化合物の混合物としてかのいずれかであり得る。任意に、該化合物は、他の化合物で誘導体化され、該化合物の単離を容易にする誘導体化基を有することができる。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、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。

10

#### 【0341】

化合物及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。精製又は半精製されたタンパク質を用いて得ることができるように、無細胞系で実施されるアッセイは、試験化合物によって媒介される分子標的の変化の迅速な発生及び比較的容易な検出を可能にするように作製することができるという点で、多くの場合、「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又はバイオアベイラビリティの効果は、通常、インビトロ系では無視することができ、その代わりに、このアッセイは、主として、ActRIIAポリペプチドとアクチビンの間の結合親和性の変化として現われ得るような分子標的にに対する薬物の効果に焦点を当てている。

20

#### 【0342】

単に例証するために、例示的なスクリーニングアッセイにおいて、関心対象の化合物を、通常アクチビンに結合することができる単離及び精製されたActRIIAポリペプチドと接触させる。その後、化合物とActRIIAポリペプチドの混合物に、ActRIIAリガンドを含む組成物を添加する。ActRIIA/アクチビン複合体の検出及び定量は、ActRIIAポリペプチドとアクチビンの間の複合体形成の阻害(又は強化)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、様々な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作成することにより評価することができる。さらに、対照アッセイを実施して、比較用のベースラインを提供することもできる。例えば、対照アッセイでは、単離及び精製されたアクチビンを、ActRIIAポリペプチドを含む組成物に添加し、ActRIIA/アクチビン複合体の形成を試験化合物の非存在下で定量する。一般に、反応物を混合し得る順序を変えることができ、また、反応物を同時に混合することができますが理解されるであろう。さらに、精製タンパク質の代わりに、細胞の抽出物及び溶解物を用いて、好適な無細胞アッセイ系を提供することができる。

30

#### 【0343】

ActRIIAポリペプチドとアクチビンの間の複合体形成は、種々の技術によって検出することができる。例えば、複合体の形成の調節は、例えば、検出可能に標識されたタンパク質、例えば、放射性標識された(例えば、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、もしくは<sup>3</sup>H)、蛍光標識された(例えば、FITC)、又は酵素標識されたActRIIAポリペプチド又はアクチビンを用いて、免疫アッセイによるか、又はクロマトグラフィー検出によって定量することができる。

40

#### 【0344】

ある実施態様において、本明細書で企図されるのは、直接的に又は間接的に、ActRIIA

50

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際の蛍光偏光アッセイ及び蛍光共鳴エネルギー遷移(FRET)アッセイの使用である。さらに、他の検出様式、例えば、光導波路(PCT公開WO 96/26432号及び米国特許第5,677,196号)、表面プラズモン共鳴(SPR)、表面電荷センサー、並びに表面力センサーに基づく検出様式は、本発明に記載の多くの実施態様と適合する。

#### 【0345】

さらに、「ツーハイブリッドアッセイ」としても知られる相互作用トラップアッセイを、ActRIIA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攪乱又は強化する因子の同定のために使用することができる。例えば、米国特許第5,283,317号；Zervosらの文献(1993) Cell 72:223-232；Maduraらの文献(1993) J Biol Chem 268:12046-12054；Bartelらの文献(1993) Biotechniques 14:920-924；及びIwabuchiらの文献(1993) Oncogene 8:1693-1696)を参照されたい。具体的な実施態様において、本明細書で企図されるのは、ActRIIA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断ち切る化合物(例えば、小分子又はペプチド)を同定するためのリバースツーハイブリッドシステムの使用である。例えば、Vidal及びLe grainの文献(1999) Nucleic Acids Res 27:919-29；Vidal及びLe grainの文献(1999) Trends Biotechnol 17:374-81；並びに米国特許第5,525,490号；第5,955,280号；及び第5,965,368号を参照されたい。

#### 【0346】

ある実施態様において、対象化合物は、ActRIIA又はアクチビン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。該化合物とActRIIA又はアクチビン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、そのような相互作用は、光架橋、放射性標識リガンド結合、及び親和性クロマトグラフィーを含む、インピトロの生化学的方法を用いて、タンパク質レベルで同定することができる(Jakoby WBらの文献、1974, Methods in Enzymology 46: 1)。ある場合には、該化合物を、メカニズムに基づくアッセイ、例えば、アクチビン又はActRIIAポリペプチドに結合する化合物を検出するアッセイでスクリーニングすることができる。これは、固相又は流体相の結合事象を含み得る。或いは、アクチビン又はActRIIAポリペプチドをコードする遺伝子を、レポーターシステム(例えば、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、又は緑色蛍光タンパク質)とともに細胞内にトランスフェクトし、好ましくは、ハイスループットスクリーニングによるか又はライプラリーの個々のメンバーを用いて、ライプラリーに対してスクリーニングすることができる。メカニズムに基づく他の結合アッセイ、例えば、自由エネルギーの変化を検出する結合アッセイを使用することができる。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、又は固定された抗体によって捕捉されているか、又はキャピラリー電気泳動によって分解される標的を用いて実施することができる。結合した化合物は、通常、比色又は蛍光又は表面プラズモン共鳴を用いて検出することができる。

#### 【0347】

ある態様において、本明細書に提供されるのは、骨形成を調節(刺激又は阻害)し、及び骨量を増加させるための方法及び薬剤である。それゆえ、同定された任意の化合物を、全細胞又は組織中で、インピトロ又はインピボで試験して、骨の成長又は石化を調節するその能力を確認することができる。当技術分野で公知の様々な方法をこの目的のために使用することができる。特に、該化合物を骨代謝回転を増加させるその能力について試験することができる。

#### 【0348】

例えば、骨又は軟骨の成長に対するActRIIA又はアクチビンポリペプチド又は試験化合物の効果は、Msx2の誘導又は骨前駆細胞から骨芽細胞への分化を細胞ベースのアッセイで測定することにより決定することができる(例えば、Daluiskiらの文献、Nat Genet. 2001, 27(1):84-8；Hinoらの文献、Front Biosci. 2004, 9:1520-9を参照されたい)。細胞ベースのアッセイの別の例は、間葉前駆細胞及び骨芽細胞における対象ActRIIA又はアクチビンポリペプチド及び試験化合物の骨形成活性を解析することを含む。例証するために、

10

20

30

40

50

アクチビン又はActRIIAポリペプチドを発現する組換えアデノウイルスを構築して、多能性間質前駆細胞C3H10T1/2細胞、前骨芽C2C12細胞、及び骨芽TE-85細胞に感染させることができる。その後、骨形成活性は、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、及び基質石灰化の誘導を測定することにより決定される(例えば、Chengらの文献、J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52を参照されたい)。

#### 【0349】

また本明細書に提供されるのは、骨又は軟骨の成長を測定するためのインビトロアッセイである。例えば、Namkung-Matthaiらの文献、Bone, 28:80-86(2001)には、骨折後の初期における骨修復を研究するラット骨粗鬆症モデルが開示されている。また、Kuboらの文献、Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202(1999)には、骨折後の後期における骨修復を研究するラットの骨粗鬆症モデルが開示されている。Anderssonらの文献、J. Endocrinol. 170:529-537には、マウス骨粗鬆症モデルが記載されている。このモデルでは、マウスから卵巣が摘出され、それにより、マウスは相当な骨ミネラル含有量及び骨ミネラル密度を失い、骨梁は骨ミネラル密度の約50%を失う。骨密度は、副甲状腺ホルモンなどの因子の投与によって、卵巣摘出マウスで増加させることができる。ある態様において、当技術分野で公知の骨折治癒アッセイを使用することができる。これらのアッセイは、骨折法、組織学的解析、及び生体力学解析を含み、これらは、例えば、骨折を引き起こし、及びその程度を測定するための実験プロトコル、並びに修復過程のその開示について引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許第6,521,750号に記載されている。

10

20

#### 【0350】

(8.7 アクチビン受容体II型シグナル伝達インヒビターの用量)

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第8.5.1節に示されているようなActRIIAシグナル伝達のインヒビターである。他の実施態様において、ActRIIインヒビターは、第8.5.2節に示されているようなActRIIBシグナル伝達のインヒビターである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、ActRIIAシグナル伝達インヒビターとActRIIBシグナル伝達インヒビターの組合せである。

30

#### 【0351】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、0.2マイクログラム/kg以上の血清濃度を達成するのに十分な間隔及び量で投与され、1マイクログラム/kg又は2マイクログラム/kg又はそれを上回る血清レベルは、骨の密度及び強度に対する顕著な効果を達成するのに望ましい。投与レジメンは、0.2~15マイクログラム/kg、任意に、1~5マイクログラム/kgの血清濃度に達するように設計することができる。ヒトにおいて、0.2マイクログラム/kgの血清レベルは、0.1mg/kg以上の単一用量で達成することができ、1マイクログラム/kgの血清レベルは、0.3mg/kg以上の単一用量で達成することができる。分子の認められる血清半減期は、ほとんどのFc融合タンパク質よりも大幅に長い約20~30日であり、したがって、持続される有効血清レベルを、例えば、0.2~0.4mg/kgを週1回もしくは週2回の頻度で投与することにより達成することができるか、又はより高い用量をより長い投与間隔で使用することができる。例えば、1~3mg/kgの用量を月1回又は月2回の頻度で使用することができ、骨に対する効果は十分に持続的であり得るので、投与は、3、4、5、6、9、12カ月、又はそれよりも長い期間に1回しか必要でない。ActRIIシグナル伝達インヒビターの血清レベルは、当業者に公知の任意の手段によって測定することができる。例えば、ActRIIシグナル伝達インヒビターに対する抗体を用いて、例えば、ELISAを用いて、ActRIIシグナル伝達インヒビターの血清レベルを決定することができる。

40

#### 【0352】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、静脈内に0.01~3.0mg/kg又は皮下に0.03~0.1mg/kgの範囲である。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、約0.01mg/kg、約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.5mg/kg、約2.0mg/kg、約2.5mg/kg、約3.0mg/kg、約3.5m

50

g/kg、約4.0mg/kg、約4.5mg/kg、又は約5.0mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、約10.0mg/kg、約15.0mg/kg、約20.0mg/kg、約25.0mg/kg、又は約30.0mg/kgである。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、0.01mg/kg～0.1mg/kg、0.1mg/kg～0.3mg/kg、0.3mg/kg～0.5mg/kg、0.3mg/kg～0.8mg/kg、0.5mg/kg～1.0mg/kg、1.0mg/kg～2.0mg/kg、1.0mg/kg～3.0mg/kg、2.0mg/kg～3.0mg/kg、2.0mg/kg～4.0mg/kg、3.0mg/kg～5.0mg/kg、5.0mg/kg～10.0mg/kg、10.0mg/kg～15.0mg/kg、10.0mg/kg～20.0mg/kg、15.0mg/kg～20.0mg/kg、又は20.0mg/kg～30.0mg/kgである。ある実施態様において、該用量は、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、又は約1gである。ある実施態様において、該用量は、約0.1mg/kgである。ある実施態様において、該用量は、約0.3mg/kgである。ある実施態様において、該用量は、約0.5mg/kgである。ある実施態様において、該用量は、約0.7mg/kgである。

10

### 【0353】

ある実施態様において、該用量は、医薬有効用量である。ある実施態様において、医薬有効用量は、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、もしくは1g、又は約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、もしくは約1.5mg/kgである。ある実施態様において、医薬有効用量は、約0.1mg/kgである。ある実施態様において、医薬有効用量は、約0.3mg/kgである。ある実施態様において、医薬有効用量は、約0.5mg/kgである。ある実施態様において、医薬有効用量は、約0.7mg/kgである。

20

### 【0354】

ある実施態様において、該用量は、初回用量である。ある実施態様において、初回用量は、約15mg、約30mg、約45mg、約60mg、約75mg、約90mg、もしくは約1g、又は約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、もしくは約1.5mg/kgである。ある実施態様において、医薬有効用量は、約0.1mg/kgである。ある実施態様において、初回用量は、約0.3mg/kgである。ある実施態様において、初回用量は、約0.5mg/kgである。ある実施態様において、初回用量は、約0.7mg/kgである。ある実施態様において、初回用量は、(i)28日に1回;又は(ii)42日に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、14日に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、21日に1回投与される。

30

### 【0355】

ある実施態様において、初回用量は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28日に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、1、2、3、4、5、又は6週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、2週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.2mg/kg、約0.26mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgであり、1、2、3、4、5、又は6週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.3～約0.8mg/kgであり、2週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.1mg/kg、約0.13mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgであり、1、2、3、4、5、又は6週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgであり、2週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.3mg/kgであり、2週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.5mg/kgであり、2週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.7mg/kgであり、2週間に1回投与される。ある実施態様において、初回用量は、約0.8mg/kgであり、2週間に1回投与される。

40

50

投与される。

【0356】

ある実施態様において、該用量は、調整用量である。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも多い。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも約2.5mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、もしくは約35mg多いか、又は初回用量よりも約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、もしくは約0.5mg/kg多い。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも高い頻度で投与される。ある実施態様において、調整用量は、5、10、15、20、25、28、30、35、又は40日毎に投与される。

【0357】

ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも少ない。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも約2.5mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、もしくは約35mg少ないか、又は初回用量よりも約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、もしくは約0.5mg/kg少ない。ある実施態様において、調整用量は、初回用量よりも低い頻度で投与される。ある実施態様において、調整用量は、30、35、40、42、50、60、70、80、又は90日毎に投与される。

【0358】

ある実施態様において、用量は、注射によって投与される。ある実施態様において、用量は、28日に1回又は42日に1回投与される。ある実施態様において、用量は、連続的に及び/又は無制限に投与される。

【0359】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるアクチビンのレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるアクチビンのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、アクチビンは、遊離アクチビン、例えば、フォリスタチンとも、フォリスタチン様3とも、インヒビンとも関連していないアクチビンである。ある実施態様において、アクチビンは、アクチビンAである。ある実施態様において、アクチビンのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

【0360】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるSmad依存的シグナル伝達を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるSmad依存的シグナル伝達と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、Smad依存的シグナル伝達は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

【0361】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるRunx2のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるRunx2のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%

10

20

30

40

50

%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、Runx2のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0362】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるAlpのレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるAlpのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、Alpのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。10

#### 【0363】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるSnai1のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるSnai1のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、Snai1のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。20

#### 【0364】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるホスホsmad2のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるホスホsmad2のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、ホスホsmad2のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。30

#### 【0365】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるホスホsmad3のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるホスホsmad3のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、ホスホsmad3のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。40

#### 【0366】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における尿タンパク質のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における尿タンパク質のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、尿タンパク質のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0367】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるDkk1のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるDkk1のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、Dkk1のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。10

#### 【0368】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるcol1a1のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるcol1a1のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、col1a1のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。20

#### 【0369】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるBSAPのレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるBSAPのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、BSAPのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。30

#### 【0370】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるCTXのレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるCTXのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、CTXのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。40

#### 【0371】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるOsterixのレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるOsterixのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、50

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、Osterixのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0372】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるActRIIAのレベル及び/又は活性を、参考集団(例えば、第8.6節に記載されているような参考集団)におけるActRIIAのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、ActRIIAのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

10

#### 【0373】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるKlothoのレベル及び/又は活性を、参考集団(例えば、第8.6節に記載されているような参考集団)におけるKlothoのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、Klothoのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

20

#### 【0374】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における-SMAのレベル及び/又は活性を、参考集団(例えば、第8.6節に記載されているような参考集団)における-SMAのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、-SMAのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

30

#### 【0375】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるMYOCDのレベル及び/又は活性を、参考集団(例えば、第8.6節に記載されているような参考集団)におけるMYOCDのレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、MYOCDのレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

40

#### 【0376】

50

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるAxin2のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるAxin2のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、Axin2のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

10

## 【0377】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における、例えば、Sm22-などの血管平滑筋タンパク質のレベルを、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における血管平滑筋タンパク質レベルと比較して増大させるのに十分である。ある実施態様において、血管平滑筋タンパク質のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるSm22-のレベル及び/又は活性を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるSm22-のレベル及び/又は活性と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、Sm22-のレベル及び/又は活性は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

20

## 【0378】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨量を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨量と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%増大させるのに十分である。ある実施態様において、骨量は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

30

## 【0379】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における破骨細胞ピット面を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における破骨細胞ピット面と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、破骨細胞ピット面は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

40

## 【0380】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨形成速度を維持するか、又は該対象

50

における骨形成速度を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨形成速度と比較して、最小限、例えば、最大でも1%、2.5%、5%、10%、又は15%増大もしくは減少させるのに十分である。ある実施態様において、骨形成速度は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0381】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨芽細胞面を維持するか、又は該対象における骨芽細胞面を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨芽細胞面と比較して、最小限、例えば、最大でも1%、2.5%、5%、10%、又は15%増大もしくは減少させるのに十分である。ある実施態様において、骨芽細胞面は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。10

#### 【0382】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における大動脈骨芽細胞転換を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における大動脈骨芽細胞転換と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、大動脈骨芽細胞転換は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。20

#### 【0383】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨芽細胞数を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨芽細胞数と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、骨芽細胞数は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。30

#### 【0384】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨芽細胞面対骨面比を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨芽細胞面対骨面比と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、骨芽細胞面対骨面比は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。40

#### 【0385】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における破骨細胞数を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における破骨細胞数と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、破骨細胞数は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。50

#### 【0386】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における破骨細胞面対骨面比を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における破骨細胞面対骨面比と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、破骨細胞面対骨面比は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0387】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨梁量を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨梁量と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、骨梁量は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0388】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨梁幅を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨梁幅と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、骨梁幅は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0389】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における血管平滑筋機能を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における血管平滑筋機能と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも500%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、血管平滑筋機能は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0390】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における血管石灰化を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における血管石灰化と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様に

10

20

30

40

50

おいて、血管石灰化は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、血管カルシウムレベルを、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における血管カルシウムレベルと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、血管カルシウムレベルは、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

10

#### 【0391】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における大動脈カルシウムレベルを、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における大動脈カルシウムレベルと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、大動脈カルシウムレベルは、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象の大動脈アテロームにおけるカルシウム沈着を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)の大動脈アテロームにおけるカルシウム沈着と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、大動脈アテロームにおけるカルシウム沈着は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

20

#### 【0392】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるCKD誘導性内皮間葉転換(EnMT)を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるEnMTと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、EnMTは、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

30

#### 【0393】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における心臓のサイズ(例えば、心重量)を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における心臓のサイズ(例えば、心重量)と比較して、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、もしくは少なくとも10%、又は最大でも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、もしくは少なくとも10%減少させるのに十分である。ある実施態様において、心臓のサイズは、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

40

#### 【0394】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における分化した血管平滑筋細胞のレベルを、

50

参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における分化した血管平滑筋細胞のレベルと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは少なくとも50%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、もしくは最大でも500%増大させるのに十分である。ある実施態様において、分化した血管平滑筋細胞のレベルは、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0395】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における高いレベルの動脈壁硬化を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における動脈壁硬化と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、動脈壁硬化は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における高いレベルの動脈壁硬化を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における動脈壁硬化と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%減少させるのに十分である。ある実施態様において、動脈壁硬化は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

10

20

30

40

#### 【0396】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における骨石灰化速度を維持するか、又は該対象における骨石灰化速度を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における骨石灰化速度と比較して、最小限、例えば、最大でも1%、2.5%、5%、10%、又は15%増大もしくは減少させるのに十分である。ある実施態様において、骨石灰化速度は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0397】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における高リン血症を維持するか、又は該対象における高リン血症を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における高リン血症と比較して、最小限、例えば、最大でも1%、2.5%、5%、10%、又は15%増大もしくは減少させるのに十分である。ある実施態様において、高リン血症は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0398】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるFGF23のレベルを維持するか、又は該対象におけるFGF23のレベルを、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるFGF23レベルと比較して、最小限、例えば、最大でも1%、2.5%、5%、10%、又は15%増大もしくは減少させるのに十分である。ある実施態様において、FGFレベルは、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

#### 【0399】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシ

50

グナル伝達インヒビターの用量は、該対象における腎線維化を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における腎線維化と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは少なくとも100%、又は最大でも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%低下させるのに十分である。ある実施態様において、腎線維化は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における糸球体硬化症を、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)における糸球体硬化症と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは最大でも100%低下させるのに十分である。ある実施態様において、糸球体硬化症は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。

10

20

30

40

50

#### 【0400】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、本明細書に提供されるバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はActRIIA)のうちの1つ又は複数のレベルを正常化させるのに十分である。例えば、ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、本明細書に提供されるバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、Osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、尿タンパク質、及び/又はActRIIA)のうちの1つ又は複数のレベルを、参照集団(例えば、第8.6節に記載されているような参照集団)におけるそれぞれのバイオマーカーのレベルにまで増大又は減少させるのに十分である。

#### 【0401】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象における心肥大を治療及び/又は予防するのに十分である。ある実施態様において、心肥大は、第8.6節に記載されているようなアッセイによって決定される。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って対象に投与されるActRIIシグナル伝達インヒビターの用量は、該対象におけるLVHを治療及び/又は予防するのに十分である。

#### 【0402】

本明細書に提供される用量(例えば、ActRIIシグナル伝達インヒビターの用量又は第2の活性剤の用量)とともに使用されるとき、「約」という語は、言及された数字の1、5、又は10%以内の任意の数字を指す。

#### 【0403】

ある実施態様において、本明細書に記載のActRIIシグナル伝達インヒビターは、本明細書に提供される方法に従って、対象に、皮下又は静脈内投与される。

#### 【0404】

ある実施態様において、0.13mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、14日に1回の間隔で皮下投与される。ある実施態様において、0.26mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、14日に1回の間隔で皮下投与される。ある実施態様において、0.1mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、14日に1回の間隔で静脈内投与される。ある実施態様において、0.2mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、14日に1回の間隔で静脈内投与される。ある実施態様において、0.3mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、28日に1回

の間隔で皮下投与される。ある実施態様において、0.5mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、28日に1回の間隔で皮下投与される。ある実施態様において、0.7mg/kgのActRIIA-hFc(配列番号7)は、提供される方法に従って治療される対象に、28日に1回の間隔で皮下投与される。

#### 【0405】

##### (8.8 組合せ療法)

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、第2の医薬活性剤と組み合わせて実施される。そのような組合せ療法は、治療の個々の成分の同時的、連続的、又は個別的な投与によって達成することができる。さらに、そのような組合せ療法の成分として投与されるとき、ActRIIシグナル伝達インヒビター及び第2の医薬活性剤は相乗的であり得、その結果、該成分のいずれか又は両方の日用量を、通常は単剤療法として投与されるどちらかの成分の用量と比較して低下させることができる。或いは、そのような組合せ療法の成分として投与されるとき、本明細書に提供されるActRIIシグナル伝達インヒビター及び第2の医薬活性剤は相加的であり得、その結果、該成分の各々の日用量は、通常は単剤療法として投与されるどちらかの成分の用量と同様又は同一となる。

#### 【0406】

ある実施態様において、本明細書に提供されるActRIIシグナル伝達インヒビターは、第2の医薬活性剤と同じ日に投与される。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第2の医薬活性剤の1日前、2日前、3日前、又はそれより前に投与される。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第2の医薬活性剤の1日後、2日後、3日後、又はそれより後に投与される。ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、第2の医薬活性剤から1週間、2週間、3週間、又はそれより長い週数以内に投与される。

#### 【0407】

ある実施態様において、第2の医薬活性剤は、Snai1、ホスホsmad2、ホスホsmad3、尿タンパク質、Dkk1、col1a1、アクチビン(例えば、遊離アクチビン)、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及び/又はOsterixのアンタゴニスト、例えば、抗体又はその断片、小分子シグナル伝達インヒビター、アンチセンス核酸、低分子干渉核酸、ドミナントネガティブタンパク質又はその断片である。ある実施態様において、第2の医薬活性剤は、Klotho、-SMA、MYO CD、Axin2、及び/又はSm22- のアゴニスト、例えば、抗体もしくはその断片又は小分子である。

#### 【0408】

ある実施態様において、第2の医薬活性剤は、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患を治療するために使用される活性剤、例えば、アルドステロンシグナル伝達インヒビター、アンジオテンシンII受容体ブロッカー、-ブロッカー、カルシウムチャネルブロッカー、コレステロール降下薬、ジゴキシン、利尿薬、強心薬療法、カリウムもしくはマグネシウム、血管拡張薬、及び/又はワルファリンなどである。

#### 【0409】

ある実施態様において、第2の医薬活性剤は、慢性腎疾患を治療するために使用される活性剤、例えば、アンジオテンシンII受容体ブロッカー、-ブロッカー、カルシウムチャネルブロッカー、直接的レニンシグナル伝達インヒビター、利尿薬、血管拡張薬、エリスロポエチン療法、鉄補充療法、及び/又はビタミンDなどである。

#### 【0410】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、並びに/又は腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患、及び/又は慢性腎疾患を治療又は改善する方法と組み合わせて実施される。

#### 【0411】

10

20

30

40

50

#### (8.9 医薬組成物)

ある実施態様において、アクチビン-ActRIIアンタゴニスト(例えば、ActRIIポリペプチド)は、本明細書に記載の方法とともに使用される医薬として許容し得る担体とともに製剤化される。例えば、ActRIIポリペプチドは、単独で又は医薬製剤(治療的組成物)の成分として投与することができる。対象化合物は、ヒト又は動物用医薬品で使用される任意の好都合な方法での投与のために製剤化することができる。ActRIIは、ActRIIA又はActRIIBであることができる。

##### 【0412】

ある実施態様において、本明細書に提供される治療法は、(ActRIIシグナル伝達インヒビターを含む)組成物を全身に又はインプラントもしくは装置として局所に投与することを含む。投与されるとき、本明細書に提供される使用のための治療的組成物は、バイロジエンフリーの生理的に許容される形態にある。上記の組成物中に任意に含めることもできるActRIIアンタゴニスト以外の治療的に有用な薬剤は、対象化合物(例えば、ActRIIポリペプチド、例えば、ActRIIA及び/又はActRIIBポリペプチド(第8.5節参照))と同時に又は連続的に投与することができる。

10

##### 【0413】

通常、ActRIIアンタゴニストは非経口投与される。非経口投与に好適な医薬組成物は、1以上のActRIIポリペプチドを、1以上の医薬として許容し得る滅菌等張性水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液、もしくはエマルジョン、又は使用直前に滅菌注射溶液もしくは分散液へと再構成され得る滅菌粉末と組み合わせて含むことができ、これらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、又は懸濁化剤もしくは増粘剤を含有することができる。本明細書に記載の方法で使用するための医薬組成物中で利用され得る好適な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレンギリコール、ポリエチレングリコールなど)、及びこれらの好適な混合物、植物油、例えば、オリーブ油、並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、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合、必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。

20

##### 【0414】

さらに、該組成物は、標的組織部位(例えば、骨)に送達するための形態で封入又は注射することができる。ある実施態様において、本明細書に記載の方法で使用するための組成物は、1以上の治療的化合物(例えば、ActRIIAポリペプチド)を標的組織部位(例えば、骨)に送達し、成長する組織に構造を提供し、最適には体内に再吸収ができるマトリックスを含むことができる。例えば、該マトリックスは、ActRIIAポリペプチドの低速放出を提供することができる。そのようなマトリックスは、他のインプラント型医療用途に現在使用されている材料から形成されてもよい。

30

##### 【0415】

マトリックス材料の選択は、生体適合性、生体分解性、機械的特性、美容上の外観、及び界面特性に基づく。対象組成物の特定の用途によって、適切な製剤が規定される。該組成物用の潜在的マトリックスは、生体分解性でかつ化学的に規定されている硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ハイドロキシアパタイト、ポリ乳酸、及びポリ無水物であってもよい。他の潜在的材料は、骨又は皮膚コラーゲンなどの生体分解性でかつ生物学的に十分に規定されているものである。さらなるマトリックスは、純粋なタンパク質又は細胞外マトリックス成分から構成される。他の潜在的マトリックスは、焼成ハイドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミニン酸塩、又は他のセラミックなどの、非生体分解性でかつ化学的に規定されているものである。マトリックスは、上述のタイプの材料のいずれかの組合せ、例えば、ポリ乳酸とハイドロキシアパタイト又はコラーゲンとリン酸三カルシウムから構成されていてもよい。バイオセラミックは、例えば、カルシウム-アルミニート-ホスフェート中の組成を変化させ、並びに加工して、孔径、粒径、粒子形状、及び生体分解性を変化させることができる。

40

50

## 【0416】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法で使用するための(ActRIIシグナル伝達インヒビターを含む)組成物は、各々所定の量の薬剤を活性成分として含む、例えば、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ剤(フレーバー付きの主成分、通常、スクロース及びアラビアゴムもしくはトラガカントを使用)、散剤、顆粒剤の形態で、又は水性もしくは非水性液中の液剤もしくは懸濁剤として、又は水中油型もしくは油中水型液体エマルジョンとして、又はエリキシリル剤もしくはシロップ剤として、又はトローチ剤(不活性基剤、例えば、ゼラチン及びグリセリン、もしくはスクロース及びアラビアゴムを使用)として、並びに/或いは洗口液などとして、経口投与することができる。薬剤は、ボーラス剤、舐剤、又はペースト剤として投与することもできる。

10

## 【0417】

経口投与用の固体剤形(カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤など)中で、本明細書に記載の1以上の治療的化合物を、1以上の医薬として許容し得る担体、例えば、クエン酸ナトリウムもしくは第二リン酸カルシウム、並びに/又は以下のもの:(1)充填剤もしくは增量剤、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、及び/もしくはケイ酸;(2)結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネット、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、及び/もしくはアラビアゴムなど;(3)保湿剤、例えば、グリセロール;(4)崩壊剤、例えば、寒天-寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム;(5)溶解遅延剤、例えば、パラフィン;(6)吸収促進剤、例えば、四級アンモニウム化合物;(7)湿潤剤、例えば、セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロールなど;(8)吸収剤、例えば、カオリン及びベントナイト粘土;(9)滑沢剤、例えば、タルク、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、及びこれらの混合物;並びに(10)着色剤のうちのいずれかと混合することができる。カプセル剤、錠剤、及び丸剤の場合、医薬組成物は、緩衝化剤を含むこともできる。同様のタイプの固体組成物を、ラクトース又は乳糖、及び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る軟及び硬充填ゼラチンカプセル中の充填剤として利用することもできる。

20

## 【0418】

経口投与用の液体剤形としては、医薬として許容し得るエマルジョン、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤、及びエリキシリル剤が挙げられる。活性成分に加えて、該液体剤形は、当技術分野で一般に使用される不活性希釈剤、例えば、水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、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、胚種油、オリーブ油、ヒマシ油、及びゴマ油)、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、並びにソルビタンの脂肪酸エステル、並びにこれらの混合物を含むことができる。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、補助剤、例えば、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤、及び防腐剤を含むこともできる。

30

## 【0419】

懸濁剤は、活性化合物に加えて、懸濁化剤、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、及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-寒天、及びトラガカント、並びにこれらの混合物を含むことができる。

40

## 【0420】

本明細書に記載の組成物は、補助剤、例えば、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤を含むこともできる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることにより確保することができる。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを該組成物中に含めることが望ましい場合もある。さらに、注射用医薬形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モ

50

ノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによりもたらすことができる。

【0421】

投薬レジメンは、本明細書に記載の化合物(例えば、ActRIIポリペプチド、例えば、ActRIIA及び/又はActRIIBポリペプチド(第8.5節参照))の作用を修飾する様々な因子を考慮して、担当医により決定されるということが理解される。様々な因子としては、形成されることが望まれる骨重量の量、骨密度低下の程度、骨損傷の部位、損傷した骨の状態、対象の年齢、性別、及び食習慣、骨量減少に寄与し得る任意の疾患の重症度、投与の時間、並びに他の臨床的因子が挙げられるが、これらに限定されない。任意に、投薬量は、再構成で使用されるマトリックスのタイプ及び組成物中の化合物のタイプによって異なり得る。最終組成物への他の既知の成長因子の添加も、投薬量に影響を及ぼし得る。進捗は、例えば、X線(DEXAを含む)、組織形態計測的測定、及びテトラサイクリン標識による骨成長及び/又は修復の定期的評価によってモニタリングすることができる。

10

【0422】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、ActRIIポリペプチドのインビオ產生のための遺伝子療法を含む。そのような療法は、上記の障害を有する細胞又は組織へのActRIIポリヌクレオチド配列の導入によって、その治療効果を達成する。ActRIIポリヌクレオチド配列の送達は、キメラウイルスなどの組換え発現ベクター、又はコロイド分散系を用いて達成することができる。ActRIIポリヌクレオチド配列の治療的送達に好ましいのは、標的化リポソームの使用である。ActRIIポリペプチドは、ActRIIA及び/又はActRIIBポリペプチド(第8.5節参照))であることができる。

20

【0423】

本明細書に教示される遺伝子療法に利用することができる様々な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、又は好ましくは、レトロウイルスなどのRNAウイルスが挙げられる。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウス又はトリレトロウイルスの派生物である。単一の異種遺伝子を挿入することができるレトロウイルスベクターの例としては：モロニーマウス白血病ウイルス(MoMuLV)、ハーベイマウス肉腫ウイルス(HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス(MuMTV)、及びラウス肉腫ウイルス(RSV)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかのさらなるレトロウイルスベクターは、複数の遺伝子を組み込むことができる。これらのベクターは全て、遺伝子導入された細胞を同定及び作製することができるよう、選択可能マークターの遺伝子を転移し又は組み込むことができる。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質、又はタンパク質を付着させることによって標的特異的にすることができる。好ましい標的化は、抗体を用いて達成される。当業者は、特異的ポリヌクレオチド配列をレトロウイルスゲノムに挿入するか、又はウイルスエンベロープに付着させて、ActRII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特異的送達を可能にすることを認識しているであろう。好ましい実施態様において、該ベクターは、骨又は軟骨に標的化される。

30

【0424】

或いは、組織培養細胞を、従来のリン酸カルシウムトランスフェクションによって、レトロウイルス構造遺伝子gag、pol、及びenvをコードするプラスミドで直接トランスフェクトすることができる。その後、これらの細胞を、関心対象の遺伝子を含むベクタープラスミドでトランスフェクトする。得られた細胞は、レトロウイルスベクターを培養培地中に放出する。

40

【0425】

ActRIIポリヌクレオチドの別の標的化送達系は、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、並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。本明細書に記載の方法で使用するため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、インビトロ及びインビボでの送達ヒヒカルとして有用である人工膜小胞である。RNA、DNA、及び無傷のビリオンを水性内部に封入し、生物活性形態で細胞に送達することができる(例えば、Fraleyらの文献、Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981を参照された

50

い)。リポソームビヒクルを用いる効率的な遺伝子導入法は当技術分野で公知であり、例えば、Manninoらの文献、Biotechniques, 6:682, 1988を参照されたい。リポソームの組成物は、通常、リン脂質の組合せであり、これは、通常、ステロイド、特にコレステロールと組み合わされている。他のリン脂質又は他の脂質を使用することもできる。リポソームの物理学的特徴は、pH、イオン強度、及び二価カチオンの存在によって決まる。

#### 【0426】

リポソーム産生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、及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、ジパルミトイールホスファチジルコリン、及びジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。リポソームの標的化も、例えば、臓器特異性、細胞特異性、及びオルガネラ特異性に基づいて可能であり、当技術分野で公知である。

10

#### 【0427】

ある実施態様において、ActRIIシグナル伝達インヒビターは、医薬組成物中で実質的に純粋である。具体的には、医薬組成物中の化合物の高々20%、10%、5%、2.5%、1%、0.1%、又は高々0.05%が、ActRIIシグナル伝達インヒビター及び医薬として許容し得る担体以外の化合物である。

#### 【0428】

##### (8.10 キット)

20

本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の1以上のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質)のレベルを決定するための1以上の試薬が充填された1以上の容器を含むキットである。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の1つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のRunx2のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のAlpのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のSnai1のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のホスホsmad2のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のDkk1のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のcol1a1のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のアクチビンのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のBSAPのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のCTXのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のosterixのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のKlothoのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の-SMAのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のMYOCDのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のSm22-のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、

30

40

50

本明細書に記載の対象から得られる試料中のホスホsmad3のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の尿タンパク質のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のActRIIAのレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中のAxin2のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。

#### 【0429】

ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の2つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される2つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の3つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される3つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の4つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される4つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の5つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される5つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の6つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される6つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の7つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される7つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の8つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される8つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の9つのバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される9つのバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の10のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、-SMA、MYOCD、Sm22-、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される10のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の11のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho

10

20

30

40

50

、 -SMA、 MYOCD、 Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される11のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の12のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される12のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の13のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される13のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の14のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される14のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の15のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される15のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の16のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される16のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の17のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される17のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、キットは、本明細書に記載の対象から得られる試料中の本明細書に記載の18のバイオマーカー(例えば、Runx2、Alp、Snai1、ホスホsmad2、Dkk1、col1a1、アクチビン、BSAP、CTX、osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、Sm22- 、ホスホsmad3、ActRIIA、Axin2、及び尿タンパク質からなる群から選択される18のバイオマーカー)のレベルを決定するための1以上の試薬を含む。ある実施態様において、該バイオマーカーのレベルを決定するための1以上の試薬は、第8.6.1節に記載されている通りである。ある実施態様において、キットは、ActRIIA-hFc(配列番号7)をさらに含む。ある実施態様において、キットは、ActRIIA-hFc(配列番号7)を含む第2の容器をさらに含む。

#### 【実施例】

#### 【0430】

#### (9.実施例)

本明細書に提示される実施例は、慢性腎疾患の特定の形態において、Runx2、Alp、BSAP、CTX、及びOsterixのmRNAレベルが上昇し、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及びSm22- のmRNAレベルが減少し得ることを示す。これらの実施例は、アクチビンリガンドトラップによる治療が、Runx2、Alp、CTX、ActRIIA、及び/又はOsterixのmRNAレベルを減少させ、Klotho、 -SMA、MYOCD、Axin2、及び/又はSm22- のmRNAレベルを増大させ、これが血管石灰化の減少と関連することをさらに示す。したがって、本明細書に提供される実施例は、Runx2、Alp、CTX、Osterix、Klotho、 -SMA、MYOCD、ActRIIA、Axin2、及び/又はSm22- を、心血管疾患、血管石灰化、血管石灰化と関連し及び/もしくは血管石灰化に起因する心血管疾患、腎疾患と関連し及び/もしくは腎疾患に起因する心血管疾患、高いレベルの動脈壁硬化、高いレベルの動脈壁硬化と関連し及び/もしくは高いレベ

10

20

30

40

50

ルの動脈壁硬化に起因する心血管疾患、LVH、並びに/又はLVHと関連し及び/もしくはLVHに起因する心血管疾患を治療するためのバイオマーカーとして使用することができます。

#### 【0431】

(9.1 実施例1. アクチビン受容体2A型のリガンドトラップによるCKD-MBDの処置)

CKD-MBDは、その初めから、骨形成異常である血管石灰化と、骨格系骨細胞によるFGF23分泌の刺激とを含むことができ、高リン血症がその後期に発症して、血管石灰化をさらに刺激する。本実施例は、CKDによって誘導される、アクチビンIIA型受容体(ActRIIA)を介するTGF $\beta$ スーパーファミリーシグナル伝達のメンバーのActRIIAシグナル伝達の阻害が、血管石灰化を阻害し、心肥大を抑制することを示す。

10

#### 【0432】

(9.1.1 方法)

高リン血症とGFRの60%低下とを有するCKD(CKD-3)を、血管石灰化の高脂肪食給餌モデルである2型糖尿病 $ldlr^{-/-}$ マウスにおいて、14週齢で誘導した。一部のCKDマウスを、22週齢から週1回IP注射されるアクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcで処置し、28週で調べた。大動脈Ca $^{2+}$ レベル、骨芽細胞及び血管平滑筋タンパク質の発現、骨格組織形態測定及びマイクロCTイメージング、血清化学検査、並びにFGF23及びPTHレベルを測定した。アクチビン、フォリスタチン、及びインヒビンのレベルを、ELISA、RT-PCR、及びウェスタンプロットによって測定した。

20

#### 【0433】

(9.1.2 結果)

循環アクチビンレベルは、2つの異なる腎疾患モデル:間質線維症及びX連鎖アルポートで増大した(図1A及び図1B)。さらに、アクチビンAのmRNAレベルは、CKDモデルの大動脈及び腎臓で増大した(図2)。アクチビンレベルは、血管系及び循環中で増大したが、フォリスタチンは変化しなかった(図2A、図2B、及び図2C)。CKDは、血管石灰化を刺激し、これは、アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップ(mActRIIA-Fc; 例えば、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許第8,173,601号を参照)による処置によって22週のレベル未満に低下し(図3A、図3B、図3C、図3D、図5A、及び図5B)、心肥大が抑制された。CKDは、大動脈Runx2、osterix、及びAlpのメッセージ及びタンパク質の発現を誘導し、これらは、アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcによる処置によって無効化された(Runx2及びAlp mRNAについては、それぞれ、図4A及び図4B; Runx2タンパク質については、図4F)。CKDは、Klotho及びSm22 $^{-/-}$ のメッセージ及びタンパク質を低下させ、アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcによる処置は、Klotho及びSm22 $^{-/-}$ の発現を正常化させた(Klotho及びSm22 $^{-/-}$ のmRNAについては、それぞれ、図4C及び団4E; タンパク質については、団4F)。さらに、CKDは、MYOCDのメッセージを低下させた(図4D)。さらに、CKDは、-平滑筋アクチン(アクチン-平滑筋)タンパク質を低下させた(図4F)。さらに、CKDは、カルシウムのレベルの増大を刺激し、これは、mActRIIA-Fcによる処置によって低下した(図6A)。骨量は、アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcによる処置によって増大し、破骨細胞ピット面は減少したが、骨形成速度及び骨芽細胞面は影響を受けなかった(図6B、図6C、及び図6D)。高リン血症及びFGF23レベルは、アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcによる処置によって変化しなかった。

30

#### 【0434】

アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcによる処置は骨吸収を阻害し、骨量を増大させた。アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップmActRIIA-Fcによる処置は、Smad依存的シグナル伝達を阻害し、大動脈骨芽細胞転換を遮断し、血管平滑筋タンパク質レベルを増大させ、CKD刺激性の血管石灰化及び心肥大を減少させた。

40

#### 【0435】

(9.2 実施例2. 慢性腎疾患(CKD)は、血管石灰化を引き起こし、かつアクチビンリガンド

50

トラップによって阻害される、大動脈内皮間葉転換(EnMT)を刺激する)

慢性腎疾患における血管石灰化の根底にある分子メカニズムは、完全には理解されていない。しかしながら、アクチビンレベルは、CKD刺激性血管石灰化で増大している。CKD刺激性血管石灰化におけるアクチビンの役割を評価するために、いくつかのTGF- $\beta$ スーパーファミリーリガンドに結合する組換え融合タンパク質を、アテローム性動脈硬化症及び2型糖尿病のモデルの慢性腎疾患のマウスモデルで使用した。ActRIIA-Fc融合タンパク質は、アクチビン受容体IIA(ActRIIA)の細胞外ドメインが免疫グロブリン1(IgG1)Fcドメインに連結したものからなり、このタンパク質は、アクチビンA、アクチビンB、成長分化因子-11(GDF11)、及び骨形成タンパク質-10(BMP-10)のようなTGF- $\beta$ ファミリーメンバーに対するリガンドトラップとして作用する。

10

#### 【0436】

腎疾患が、腎修復期に全身性のWnt阻害を生じさせることによって、血管石灰化を引き起こすことが以前に示されている。本実施例は、CKD刺激性Wnt阻害の血管効果が血管アクチビンの刺激及びSmad依存的EnMTの誘導であること、並びにアクチビン受容体リガンドトラップがEnMT及び血管石灰化を阻害することを示す。

#### 【0437】

##### (9.2.1 方法)

Wntインヒビターが上昇したCKDを、系譜追跡及び血管石灰化のマウスモデルで誘導した。アクチビン、フォリスタチン、及びインヒビンのレベルを、ELISA、RT PCR、及びウェスタンプロットによって測定した。細胞系譜追跡を、内皮特異的Tie2-Creマウスと交配させたGNZマウス(Stollerらの文献、Genesis, 2008)で行った。GNZのノックインを有するマウスは、Cre媒介性組換えの後、核GFP及びlacZを発現する。

20

#### 【0438】

##### (9.2.2 結果)

アクチビンレベルは、腎疾患及びCKD刺激性血管石灰化のマウスモデルにおいて、血管系及び循環中で増大したが、フォリスタチンレベルは変化しなかった。CKDは、正常な腎機能を有するGNZ;Tie2-Creマウスと比較して、GNZ;Tie2-Cre CKDマウスの外膜及び中膜の細胞でGFP及びlacZの発現を誘導し、その場合、GFP及びlacZは、大動脈内皮に限定されていた。Tie2は内皮系統特異的受容体であり、これは、CKDが大動脈EnMTを誘導することを示している(図7A、図7B、図7C、及び図7D)。CKDは、大動脈EnMTを刺激し、血管平滑筋機能の減少、骨芽細胞転換、及び石灰化をもたらした。アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップ(mActRIIA-Fc; 例えは、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許第8,173,601号を参照)による処置は、Smad依存的シグナル伝達を阻害し、大動脈骨芽細胞転換を遮断し、血管平滑筋機能を増大させ、CKD刺激性血管石灰化を減少させた。このように、CKDは、血管アクチビン及びEnMTを誘導し、アクチビン受容体2A型(mActRIIA)リガンドトラップによる処置は、アクチビンシグナル伝達を減少させ、血管脱分化、骨芽細胞転換、及び血管石灰化を阻害した。

30

#### 【0439】

##### (9.3 実施例3.漸増用量で治療した血液透析対象における骨量及び血管石灰化についての初期シグナル探索型定量的コンピュータ断層撮影の結果)

40

高代謝回転性骨ジストロフィー(ROD)は、皮質骨多孔性の増大、骨梁量の増加、及び骨折リスクの増大を特徴とする。血液透析(HD)対象における貧血の改善用に研究中であるアクチビンA RIIA-IgG1融合タンパク質リガンドトラップのActRIIA-Fcは、アクチビンAシグナル伝達を遮断し、破骨細胞生成を低下させ、骨内での骨芽細胞成熟を促進し得る。HD対象における現在の解析では、定量的コンピュータ断層撮影(QCT)を用いて、骨ミネラル密度(BMD)及び血管石灰化に対するActRIIA-Fcの効果を評価した。

#### 【0440】

##### (9.3.1 方法)

ActRIIAシグナル伝達インヒビターで治療したエリスロポエチン刺激剤(ESA)応答性の血液透析対象を、ヘモグロビン(Hb)が<10g/dLになるまで、ESA効果からウォッシュアウト

50

し、その後、最大8回の投与サイクルの、28日毎の、皮下への、以下の用量：0.3mg/kg(n=9)、0.5mg/kg(n=8)、0.7mg/kg(n=6)のActRIIAシグナル伝達インヒビター、又はプラセボ(PBO; n=7)による治療に無作為に割り付けた。対象を、Hb、骨ミネラル密度(BMD)、及び骨代謝回転のバイオマーカーに対する効果について評価した。治療失敗(Hb < 9g/dL)は、ESA及び/又は赤血球輸血で救済した。股関節(hip)及び腰椎の定量的コンピュータ断層撮影(QCT)をベースライン時と225日の治療期の後に取得した。バイオマーカー、BSAP、及びCTXをベースライン時と投与サイクル3、5、及び7の後に測定する。

#### 【0441】

股関節、腰椎、及び腹部大動脈のQCTをベースライン時と225日の治療期の後に取得した。対象をMindways校正用ファントム(モデル3; Mindways Software社、Austin, TX)に対して背臥位に位置付けた。2.5mmのスライス幅及び $512 \times 512$ 行列を標準的な軟組織カーネルを用いて再構築する。Mindways解析ソフトウェア(バージョン5.0.3)を用いて、容積BMD(vBMD)を評価した。骨梁vBMD(mg/cm<sup>3</sup>)をL1～4(通常、L1～2)の2本の椎骨について決定した。左近位大腿骨を、全股関節、大腿骨頸部、及び転子領域の皮質骨、骨梁、及び統合骨コンパートメントのvBMDについて解析した。

10

#### 【0442】

腹部大動脈の血管石灰化を、L1の上部からL4の下部にかけて隣接する領域内の石灰化の面積及び容積を半自動的に分割するソフトウェアを用いて評価した。スライスの数及び位置を対象1人当たりの通院を通して維持した。アガットストンスコア及び平方根変換容積スコアを、Agatstonらの文献、J Am Coll Cardiol. 1990; 15:827-832及びHokansonらの文献、AJR AM J Roentgenol. 2004; 182:1327-1332に記載されている通りに決定した。より低い合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコア(mm<sup>3</sup>)は、より低い血管石灰化(VC)のレベルを示している。

20

#### 【0443】

画像品質管理及び盲検解析は全て、PAREXELイメージング(PAREXEL International Corp. Waltham, MA)により一元的に行われる。

#### 【0444】

骨特異的アルカリホスファターゼ(BSAP)、プロ-コラーゲン1型N末端プロペプチド(P1NP)、及びC末端1型コラーゲンテロペプチド(CTX)を含むバイオマーカーを、ベースライン時と投与サイクル1、3、5、及び7の後に測定した。

30

#### 【0445】

##### (9.3.2 結果)

計31人の対象が無作為に割り付けられ、複数回の治験薬の投与を受けた。

#### 【0446】

表2. 無作為に割り付けられた対象及びQCT解析サブセット

#### 【表2】

対象、n	ActRIIA-Fc			
	プラセボ	0.3 mg/kg	0.5 mg/kg	0.7 mg/kg
無作為に割り付けられ、1回以上の 治験薬の投与を受けた	8	9	8	6
ベースライン時と225日目のQCT測定	3	6	5	2

40

#### 【0447】

ベースライン時と225日目のペアのQCT測定を行った対象を含む、対象の内訳が図8に記載されている。

#### 【0448】

ほとんどの対象は、救済を必要とする治療失敗(通常、Hb < 9g/dLが理由)の後に治験を中止した;有害事象(AE)のために治療を中止した対象はない。

#### 【0449】

ペアのQCT測定を行った16人の対象のうち、9人が治療期に救援治療を必要とし、そのう

50

ちの8人は、最初の3回の投与サイクルのうちに救済を必要とした。

【0450】

ペアのQCT測定を行った対象の間で、ベースライン時の人口統計学的及び臨床的特徴は、治療群全体で概ね類似していたが(表3)；プラセボ群では、透析を受けた時間がかなり長く、この群は、最も若い群でもあった。群間で、ベースラインバイオマーカー及びアガットストンスコアにも違いがあった(表4)。

【0451】

表3. ペアのQCT測定を行った対象のベースラインの人口統計学的及び臨床的特徴

【表3】

	ActRIIA-Fc			10	
	プラセボ n=3	0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2	20
年齢、平均、歳	54.0	57.3	60.8	69.0	30
女性、n(%)	0 (0.0)	4 (66.7)	0 (0.0)	1 (50.0)	40
人種、n(%)					
白人	1 (33.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	1 (50.0)	
黒人	1 (33.0)	3 (50.0)	2 (40.0)	1 (50.0)	
アジア人	1 (33.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
民族、n(%)					
ヒスパニック	0 (0.0)	2 (33.0)	3 (60.0)	1 (50.0)	
非ヒスパニック	3 (100.0)	4 (66.7)	2 (40.0)	1 (50.0)	
透析後の体重、平均、kg	70.4	80.3	79.4	84.4	
ボディマス指数、平均、kg/m <sup>2</sup>	25.4	27.7	26.9	29.2	
糖尿病、n(%)	2 (66.7)	5 (83.3)	5 (100.0)	2 (100.0)	
副甲状腺摘出、n(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
透析を受けた時間、平均、月	101.2	43.3	22.4	11.3	
非カルシウムリシン酸バインダー、n(%)*	3 (100.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	
カルシウム系リシン酸バインダー、n(%)*	1 (33.3)	4 (66.7)	4 (80.0)	2 (100.0)	
カルシウム模倣薬、n(%)*	1 (33.3)	2 (33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	
1,25-OHビタミンD類似体、n(%)	2 (66.7)	5 (83.3)	2 (40.0)	2 (100.0)	

【0452】

表4. ペアのQCT測定を行った対象の平均のベースラインバイオマーカー、領域BMD、及びアガットストンスコア

【表4】

	プラセボ n=3	ActRIIA-Fc		
		0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2
ベースライン時の合計PTH、pg/mL	261.4	104.8	135.5	100.4
BSAP、 $\mu\text{g}/\text{L}$	28.3	18.0	13.2	7.5
P1NP、ng/mL	623.7	376.2	468.4	308.0
CTX、pg/mL	3,417.7	2,062.5	2,266.8	1,377.0
全股関節統合体BMD、 $\text{mg}/\text{cm}^3$	279.4	306.2	268.9	285.4
大腿骨頸部皮質BMD、 $\text{mg}/\text{cm}^3$	653.1	666.9	593.1	566.5
平均脊椎(L1、L2) BMD、 $\text{mg}/\text{cm}^3$	123.1	125.6	149.1	150.6
VC合計アガットストンスコア*	8,665.0	9,472.7	3,618.5	823.2

PTH=副甲状腺ホルモン

\*より低いアガットストンスコアは、より低い血管石灰化のレベルを示す。

10

20

30

40

【0453】

表5は、股関節統合体(hip integral)、大腿骨頸部皮質、股関節皮質、及び腰椎の領域BMD測定値のベースラインからの変化率を提供する。

【0454】

表5.股関節統合体、大腿骨頸部皮質、及び腰椎の領域BMDのベースライン及びベースラインからの変化率

【表5】

	プラセボ n=3	ActRIIA-Fc		
		0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2
<b>全股関節統合体</b>				
ベースラインBMD、 $\text{mg}/\text{cm}^3$	279.4	306.2	268.9	285.4
ベースラインBMDからの%変化(n)	-0.2 (3)	2.5 (5)	4.0 (5)	-1.8 (1)
<b>大腿骨頸部皮質</b>				
ベースラインBMD( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	653.1	666.9	593.1	565.5
ベースラインBMDからの%変化(n)	-0.9 (3)	-1.4 (5)	1.6 (5)	3.0 (1)
<b>全股関節皮質</b>				
ベースラインBMD( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	708.6	668.4	647.3	635.6
ベースラインBMDからの%変化(n)	-0.1 (3)	-1.1 (5)	0.5 (5)	2.7 (1)
<b>平均腰椎(L1、L2)</b>				
ベースラインBMD( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	123.1	125.6	149.1	150.6
ベースラインBMDからの%変化(n)	12.6 (3)	8.0 (6)	0.5 (5)	-2.7 (2)

【0455】

皮質骨の2%増加は、骨折のリスクを低下させ得る。ACTRIIAシグナル伝達インヒビター治療は、大腿骨頸部皮質骨が2%以上増加した対象の割合の用量依存的増加を伴った(表5

50

及び図9A)。

【0456】

高代謝回転RODでは、骨梁量増加(すなわち、より質の悪い骨)が腰椎BMDによって測定されたが、ESKDでは、一般集団と比較して脊椎骨折率が低下しなかった。ACTRIIAによる治療は、腰椎における骨梁量の増加を抑制した(表5及び図9B)。

【0457】

ベースラインからの腹部大動脈合計アガットストンスコアの変化を表6に提供する。合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアの変化のカテゴリーを図9及び表7に示す。

【0458】

表6. 腹部大動脈合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアのベースライン及びベースラインからの変化

【表6】

	n=3	ActRIIA-Fc		
		0.3 mg/kg n=6	0.5 mg/kg n=5	0.7 mg/kg n=2
<b>腹部大動脈合計アガットストンスコア</b>				
ベースライン合計アガットストンスコア	8,665	9,473	3,619	823
ベースライン合計アガットストンスコアからの変化	1,050.4	8,578.9	225.7	43.4
ベースライン合計アガットストンスコアからの %変化	58.4	24.9	17.3	3.4
<b>平方根変換合計容積スコア</b>				
ベースライン合計容積平方根、mm <sup>3</sup>	52.0	46.2	33.1	16.9
ベースライン合計容積平方根からの変化、 mm <sup>3</sup>	4.5	11.1	1.2	0.4

\*より低い合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアは、より低い血管石灰化のレベルを示す。

【0459】

11人の対象は、10から10,000の間で分布するベースラインアガットストンスコアを有していた。5人の対象は、ベースライン時に外れ値とみなすことができる(低外れ値: 0.0、1.1、及び1.4のアガットストンスコア;高外れ値: 21,033及び44,356のアガットストンスコア)。したがって、アガットストンスコアを外れ値を除いて解析した(表7及び図10)。

【0460】

表7. 5つの外れ値を除いた合計アガットストンスコアのベースライン及び変化

【表7】

	n=1	ActRIIA-Fc		
		0.3 mg/kg n=4	0.5 mg/kg n=4	0.7 mg/kg n=2
<b>5つの外れ値を除く、再ベースライン合計 アガットストンスコア</b>				
5つの外れ値を除く、ベースライン合計 アガットストンスコアからの変化	2,711.3	287.7	282.0	43.4
5つの外れ値を除く、ベースラインからの %変化	54.7	9.0	5.0	3.4

\*より低い合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアは、より低い血管石

10

20

30

40

50

灰化のレベルを示す。

【0461】

対象をActRIIAシグナル伝達インヒビターへの曝露期間別に解析した。対象を曝露状態別に解析した:用量レベルに関わらず、最大3回の投与を受けたActRIIA-Fc対象(n=6)、及び用量レベルに関わらず、3回よりも多い投与を受けたActRIIA-Fc対象(n=7)。プラセボ群(n=3)は不变であった。性別とアガットストンスコア以外、重要なベースライン特徴は、3回以下のActRIIA-Fc投与を受けた者と3回よりも多い投与を受けた者で概ね類似していた(表8)。VCに対する曝露効果は、全てのActRIIA-Fc対象で(表9)、及び外れ値を除いた場合(表10)、もとのままであった。

【0462】

表8.ActRIIA-Fc曝露別の、対象のベースラインの人口統計学的及び臨床的特徴

【表8】

	ActRIIA-Fc	
	3回以下の投与 n=6	3回を超える投与 n=7
年齢、平均、歳	59.0	61.7
女性、n(%)	4 (66.7)	1 (14.3)
人種、n(%)		
白人	3 (50.0)	4 (57.1)
黒人	3 (50.0)	3 (42.9)
アジア人	0 (0.0)	0 (0.0)
ボディマス指数、平均、kg/m <sup>2</sup>	25.7	29.3
糖尿病、n(%)	5 (83.3)	7 (100.0)
透析を受けた時間、月	31.3	24.0
カルシウム系リン酸バインダー、n(%)	4 (66.7)	6 (85.7)
カルシウム模倣薬、n(%)	1 (16.7)	1 (14.3)
1,25-OHビタミンD類似体、n(%)	4 (66.7)	5 (71.4)
ベースラインの全PTH、平均、pg/mL	104.5	125.7
BSAP、平均、μg/L	19.8	10.0
P1NP、平均、ng/mL	432.2	374.6
CTX、平均、pg/mL	2,410.3	1,714.4
VC合計アガットストンスコア、平均	8,350	3,782
容積平方根、mm <sup>3</sup>	38.2	35.3

【0463】

表9.ActRIIA-Fc曝露別の、合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアのベースライン及びベースラインからの変化\*

【表9】

	ActRIIA-Fc	
	3回以下の投与 n=6	3回を超える投与 n=7
ベースライン合計アガットストンスコア	8,350	3,782
ベースライン合計アガットストンスコアからの変化	8,461.4	274.3
ベースライン合計アガットストンスコアからの%変化	33.7	5.8
ベースライン合計容積平方根、mm <sup>3</sup>	38.2	35.3
ベースライン合計容積平方根からの変化、mm <sup>3</sup>	10.6	1.4

10

\*より低い合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアは、より低い血管石灰化のレベルを示す。

## 【0464】

表10.ActRIIA-Fc曝露別の、5つの外れ値を除く、合計アガットストンスコアのベースライン及びベースラインからの変化\*

【表10】

	ActRIIA-Fc	
	3回以下の投与 n=3	3回を超える投与 n=7
5つの外れ値を除く、再ベースライン合計アガットストンスコア	1,914	3,782
5つの外れ値を除く、ベースライン合計アガットストンスコアからの変化	148.4	274.3
5つの外れ値を除く、ベースラインからの%変化	7.5	5.8

20

\*より低い合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアは、より低い血管石灰化のレベルを示す。

30

## 【0465】

骨代謝回転バイオマーカーを評価した。プラセボ群は、ベースライン時に最も高いPTH、BSAP、P1NP、及びCTXレベルを有していた(表4)。プラセボ群では、PTHが全ての時点でのベースライン時よりも少なかった(-15.2~-100.7ng/L)ことを除き、リン、PTH、FGF-23、又はスクレロスチンレベルのベースラインからの一貫した変化は認められなかった。骨バイオマーカーについては、形成マーカーのBSAP及びP1NPの変化率に明確な変化は見られなかつた; 吸収マーカーのCTXの変化率を図11に示す。

0.5mg/kgのACTRIIAシグナル伝達インヒビターを受けたより多くの対象では、吸収マーカー-CTXの大きな持続的減少が見られた。

40

## 【0466】

## (9.3.3 結論)

無作為に割り付けられた30人の対象のうち、13人がペアのQCT評価を行った(PBO、0.3mg/kg、及び0.5mg/kgについて、それぞれ、n = 3、6、及び4)。PBO、0.3mg/kg、及び0.5mg/kgについてのベースラインからの相対的BMD変化は、それぞれ、大腿骨頸部皮質の-0.9%、-1.4%、及び+1.9%、並びに腰椎の+12.6%、+8.0%、及び-1.9%であった。0.5mg/kgのバイオマーカー変化は、有益な抗吸収効果を示唆している。

## 【0467】

これらのデータは、0.5mg/kgのActRIIA-Fcによる新しい用量効果を示しており、皮質骨及び海綿骨に対する高代謝回転RODの効果を無効化するように見える。PBOの結果は予想通りである。

50

## 【0468】

(9.4 実施例4. 腎疾患によって產生される循環腎修復因子は心血管疾患を引き起す)

腎疾患は、極端に高い死亡率と関連があり、これは、その心血管疾患の生成に関連している(Sarnak, M.J. らの文献、2003. *Circulation* 108:2154-2169.)。現在進行中のREGARDSプロジェクトの補助的研究によって、冠動脈イベント(心虚血又は非致死性心筋梗塞)を持続している患者では、中央値の4年という追跡調査にわたる第2的心血管イベントの発生率が、高リスク群(喫煙者、糖尿病、高コレステロール血症)の19%と比較して、腎疾患の患者で35%であること、及び高リスク群における全死因死亡の発生が慢性腎疾患(CKD)群における全死因死亡の発生の半分であることが示された(Baber, U. らの文献、2013. *Am Heart J* 166:373-380.)。腎疾患と関連する心血管リスクの増大の原因は、2006年に命名された症候群 - 慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)にある(Moe, S. らの文献、2006. *Kidney Int* 69:1945-1953.)。CKD-MBDでは、3つの新規の心血管リスク因子が発見されており(Block, G.A. らの文献、1998. *Am J Kidney Dis* 31:607-617; Blacher, J. らの文献、2001. *Hypertension* 38:938-942; Gutierrez, O.M. らの文献、2008. *New Engl J Med* 359:584-592.)、それらのリスク因子状態が一般集団で確認された(Dhingra, R. らの文献、2007. *Arch Intern Med* 167:879-885; Matsushita, K. らの文献、2014. *Journal of the American Society of Nephrology*; Dalal, M. らの文献、2011. *European Journal of Endocrinology* 165:797-803.)。これらは、高リン血症、血管石灰化、及び線維芽細胞成長因子23(FGF23)レベルの上昇である。CKD-MBDは、血管脱分化/石灰化、骨形成異常、Klothoの消失、及びFGF23分泌の増大(Fang, Y. らの文献、2014. *Kidney Int* 85:142-150.)からなるCKDの初期段階(ステージ2)で始まるが(Fang, Y. らの文献、2014. *Kidney Int* 85:142-150; Pereira, R.C. らの文献、2009. *Bone* 45:1161-1168; Fang, Y. らの文献、2009. *J Am Soc Nephrol* 20:36A; Hu, M.C. らの文献、2011. *J Am Soc Nephrol* 22:124-136.)、初期腎不全におけるCKD-MBDの原因に関する進展があるものの(Hu, M.C. らの文献、2011. *J Am Soc Nephrol* 22:124-136; Fang, Y. らの文献、2014. *J Am Soc Nephrol* 25:1760-1763; de Oliveira, R.B. らの文献、2013. *Nephrology Dialysis Transplantation* 28:2510-2517; Sabbagh, Y. 2012. *J. Bone Miner. Res.* 27:1757-1772.)、それらは、ほとんど分かっていない。

## 【0469】

疾患によって刺激される腎修復の間、腎疾患が腎形成に関与する発生プログラムを再活性化することが示されている(Surendran, K. らの文献、2002. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F431-F441; Surendran, K. らの文献、2005. *J Am Soc Nephrol* 16:2373-2384; MASHIMA, A. らの文献、2001. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12:289-298; Terada, Y. らの文献、2003. *Journal of the American Society of Nephrology* 14:1223-1233; Kawakami, T. らの文献、2013. *J Pathol* 229:221-231.)。腎修復において再活性化される腎形成性因子の中で、Wnt(WinglessとIntegratedの混成語)ファミリーは、尿細管上皮再構築に極めて重要である(Terada, Y. らの文献、2003. *Journal of the American Society of Nephrology* 14:1223-1233; Kawakami, T. らの文献、2013. *J Pathol* 229:221-231; Rinkevich, Y. らの文献、2014. *Cell Reports* 7:1270-1283.)。Wnt機能の制御下で、標準的シグナル伝達は、Wnt阻害タンパク質のファミリーの発現を転写誘導し、このWnt阻害タンパク質は、Wnt刺激から自己分泌又は傍分泌因子までの距離を制限する役割を果たす分泌タンパク質である(Niida, A. らの文献、2004. *Oncogene* 23:8520-8526; Niehrs, C. の文献、2006. *Oncogene* 25:7469-7481; Reya, T. らの文献、2003. *Nature* 423:409-414; Chamorro, M.N. らの文献、2004. *The EMBO Journal* 24:73-84; Gonzalez-Sancho, J.M. の文献、2004. *Oncogene* 24:1098-1103.)。Wntインヒビターは循環因子であり、Wntインヒビターファミリーには、Dickkopfs(Dkk)、分泌型frizzled関連タンパク質(Sfrps)、スクレロスチン、sostDoc 1、crescent、Wntインヒビター因子1(Wif1)、及びIcatが含まれる(Niehrs, C. の文献、2006. *Oncogene* 25:7469-7481)。様々な形態の腎疾患がWntインヒビターの腎発現を増大させ、循環中のそのレベルを増大させる(Fang, Y. らの文献、2014. *J Am Soc Nephrol* 25:1760-1763; Surendran, K. らの文献、2005. *J Am Soc Nephrol* 16:237

3-2384.)。

#### 【 0 4 7 0 】

CKDの循環中で上昇する重要なWntインヒビターであるDkk1の中和は、CKD誘導性の血管脱分化、血管石灰化、及び腎性骨ジストロフィーを阻害する(Fang, Y. らの文献、2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763.)。この効果は、驚くべきことである。なぜなら、血管平滑筋におけるWntシグナル伝達は、骨芽細胞転換及び血管石灰化を刺激するのに関係があるとされているからである(AI-Aly, Z. らの文献、2007. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:2589-2596; Shao, J.S. らの文献、2005. Journal of Clinical Investigation 115:1210-1220.)。しかしながら、最近の研究によって、Dkk1媒介性の大動脈Wnt7bの阻害がsmad媒介性の大動脈内皮間葉転換(EnMT)及び血管石灰化を刺激することが示されている(Cheng, S.-L. らの文献、2013. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 33:1679-1689.)。EnMTは、心臓弁、心中隔、及び大動脈基部の発生に関与する発生生理学的プロセスであり(Eisenberg, L.M. 及びMarkwald, R.R. の文献、1995. Circulation Research 77:1-6; Camenisch, T.D. らの文献、2002. Developmental Biology 248:170-181.)、これが、様々な成人疾患状態における心筋線維化の一因となる場合もあるし(Zeisberg, E.M. らの文献、2007. Nat Med 13:952-961.)、その一因とならない場合もある(Moore-Morris, T. らの文献、2014. The Journal of Clinical Investigation 124:2921-2934.)。こうした要因のため、腎疾患期の腎修復の試みに関する他の因子がTGF- $\beta$ スーパーファミリーに由来し、CKD期の循環中で増大しているかどうかを調べることにする。

10

20

20

30

40

50

#### 【 0 4 7 1 】

(9.4.1 方法)

(9.4.1.1 動物モデルの作成)

アテローム性動脈硬化症の低密度リポタンパク質受容体欠損(*ldlr*-/-)雄(C57Bl/6Jバックグラウンド)をJackson Laboratoriesから購入し、12週齢から高脂肪食(42%のカロリーが脂肪由来)(Teklad #)を給餌した。このマウスは、22週齢で肥満、インスリン抵抗性となり、28週齢で糖尿病となり、高コレステロール血症となる。

#### 【 0 4 7 2 】

2段階の処置を用いて、以前に記載されているように、慢性腎疾患を引き起こした(Davies, M.R. らの文献、2003. J Am Soc Nephrol 14:1559-1567; Davies, M.R. らの文献、2005. J Am Soc Nephrol 16:917-928.)。出生後12週で、2cmの側腹切開を介して、電気焼灼を右腎臓に適用し、その後、14週齢で左腎全摘出を行った。焼灼の強度を変化させて、中等度(CKD-3)の腎損傷を生じさせ、これを20週齢でのイヌリンクリアランスによって確認した(図12A)。対照動物は模擬手術を受けた。この手術では、適当な腎臓を露出させて移動させたが、他には何も処置しなかった。5つのマウスの群をこの研究に使用した(図15B)。第1の群は、通常食を給餌される野生型C57Bl/6Jマウス(WT)であった。これは、標準的対照値に使用される正常腎機能及び食餌群であった。第2の群は、高脂肪食を給餌され、模擬手術される*ldlr*-/-マウス(模擬)であった。この群は、正常な腎機能を有し、これは、腎疾患の効果を決定するための対照群としての役割を果たした。第3の群は、ヒトCKDのステージ3(CKD-3)と同等の低下したGFRを有し、高脂肪食を給餌され、22週で安楽死せられる、ベースライン血管石灰化群の*ldlr*-/-マウス(CKD-3)であった。第4の群は、22週から始めて28週で安楽死させられるまで、週2回、ビヒクルの皮下注射を受けるCKD-3の*ldlr*-/-マウス(CKD-3 V)であった。第5の群は、22週から始めて28週で安楽死させられるまで、週2回、10mg/kgのmActRIIA-Fc(Celgene, Summit, NJ)の皮下注射を受けるCKD-3の*ldlr*-/-マウス(CKD-3 mActRIIA-Fc)であった。

#### 【 0 4 7 3 】

使用されたCKDの第2のモデルは、IV型コラーゲンの5鎖の遺伝子、COL4A5の欠損症であるX連鎖アルポート症候群のマウスホモログであった(Rheault, M.N. らの文献、2004. Journal of the American Society of Nephrology 15:1466-1474.)。これは、自然発症腎疾患のモデルである。これを、腎切除誘導性CKDの効果を確認するために、本結果の全体

を通して使用した。交配ペアをJackson Laboratoriesから購入し、実験用に交配させた。ヘミ接合体の雄は、生後200日で、ヒトCKDのステージ3~4に相当する腎疾患を自然発症した。

#### 【0474】

CKDの第3のモデルは、細胞系譜追跡に使用されるトランスジェニックマウス系統のGNZマウスにおける、*Idlr-/-*プロトコルと同様の、腎切除であった(図14)。GNZレポーター雌マウス(Stoller, J.Z.らの文献、2008. *Genesis*(New York, N.Y. 2000) 46:200-204.)及びTek-Creトランスジェニック雄マウス(Koni, P.A.らの文献、2001. *The Journal of Experimental Medicine* 193:741-754.)をJackson Laboratoriesから購入し、交配させて、実験用のGNZ/Tek-Cre+マウスを生ませた。GNZ/Tek-Cre-同腹子は、陰性対照としての役割を果たした。製造元によって推奨されるGNZ及びTek-Creマウス系統用の特異的プライマーを用いることにより、マウスのジェノタイピングを行った。いずれの場合も、安樂死を麻酔下で行った。腹腔内麻酔(キシラジン13mg/kg及びケタミン87mg/kg)を全ての処置に使用した。伏在静脈血試料を2回目の手術の1週間後に採取して、ベースラインの手術後腎機能を評価した。屠殺時に、血液を心内穿刺で採取し、心臓及び大動脈をひとまとめにして解剖した。

10

#### 【0475】

##### (9.4.1.2 イヌリンクリアランス)

安樂死が28週で行われる場合、20週又は26週でのイヌリンクリアランスを製造元の指示(BioPal社、Worcester, MA)に従って行った。

20

#### 【0476】

##### (9.4.1.3 化学的石灰化定量)

大動脈及び心臓を屠殺時に解剖し、全ての無関係な組織を解剖顕微鏡下での鈍的切開によって除去した。組織を60℃で20~24時間乾燥させ、計量し、すり鉢とすりこぎで砕いて粉末にした。カルシウムを、1N HCl中、4℃で24時間溶出させた。溶出液のカルシウム含有量を、製造元の指示に従って、クレゾールフタレンコンプレキソン法(Sigma, St Louis)を用いてアッセイし、結果を乾燥組織重量に対して補正した。

30

#### 【0477】

##### (9.4.1.4 血液検査)

血清を、採血日に、血液尿素窒素(BUN)、カルシウム、及びリン酸塩について、標準的な自動解析実験室法によって解析した。血漿アクチビン(Fitzgerald Industries, Acton, MA)、フォリスタチン(MYBIOSOURCE社、San Diego, CA)、及びフォリスタチン様3(MYBIOSOURCE社)のレベルをELISAアッセイで決定した。血清Dkk1レベルをELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN)で解析した。ELISAアッセイのために、血液を、安樂死時に、伏在静脈穿刺又は心穿刺によって採取した。血液試料は全て、回収時に氷上に置いた。血小板の少ないEDTA血漿試料を、6000rpmで5分間及び14000rpmで2分間、いずれも4℃での、2段階の遠心分離によって作製した。試料を使用するまで-20℃以下で凍結保存した。

40

#### 【0478】

##### (9.4.1.5 組織学及び免疫組織化学)

大動脈、腎臓、及び心臓の組織を10%中性緩衝化ホルマリン中で一晩固定し、その後、4℃の70%エタノールに移し、パラフィン中に包埋し、5ミクロン切片を調製した。スライドをキシレン中で脱パラフィン処理し、段階的エタノール系列中で脱水し、その後、再水和した。Masonの三重染色を用いて、腎臓及び心臓の線維化を検出し、Alizarin red染色を用いて、標準的なプロトコル(Gregory, C.A.らの文献、2004. *Analytical Biochemistry* 329:77-84.)に従って、石灰化を検出した。免疫組織化学染色のために、内在性ペルオキシダーゼを、メタノール中、15分間、3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>でブロッキングした。非特異的結合をアビジン及びビオチンブロッキング剤(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)で30分間ブロッキングし、その後、3%正常ロバ血清で20分間ブロッキングした。PBSで洗浄した後、スライドを一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートし、その後、ビオチン化二次抗体(Vector laboratories)とともに室温で1時間インキュベートし、その後、DABキット(SK

50

-4100, Vector laboratories)を用いて、ストレプトアビジンコンジュゲートペリオキシダーゼ(peroxidase)染色を行った。二重免疫蛍光染色のために、切片を20%ヤギ血清中でブロッキングし、製造元の指示に従って、ヤギ抗ウサギAlexa 488及びAlexa 568二次抗体1:400(Life Technologies, A11008及びA11011)又はシグナル増幅用のTSAキット(Life Technologies, T 20932)を用いて、第1の一次抗体及び二次抗体並びに第2の一次抗体及び二次抗体で連続的に染色した。同じ種由来の一次抗体を二重染色に使用する場合は、2回目の染色の前に、スライドを、マイクロ波にて、クエン酸バッファー中で5分間加熱した(Toth及びMezeyの文献、2007)。本研究では、一次抗体を免疫染色用に使用した:ウサギポリクローナル抗ActRIIA抗体1:250(Abcam, ab 135634)、ウサギポリクローナル抗インヒビンA抗体1:100(Santa Cruz, sc-50288)、ウサギポリクローナル抗CD31抗体1:50(Abcam, ab28364)、及びウサギポリクローナル抗GFP抗体1:1000(Abcam, ab6556)。

10

## 【0479】

## (9.4.1.6 RT-PCR)

RNeasyミニキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて、RNAを大動脈及び細胞培養物から抽出した。1 μgの全RNAをDNアーゼ処理し、製造元の指示に従って、Bio-Rad(Hercules, CA)製のiScript cDNA合成キットを用いて逆転写した。Vector NTI(Invitrogen, Grand Island, NY)又はPrimer Expressソフトウェアを用いて、プライマーを設計した。Perkin-Elmer DNAサーマルサイクラーを用いて、反応を行った。上記のように逆転写を行った後、StepOne PlusリアルタイムPCR装置(AB)、Sigma製のSYBR Green(St. Louis)、及びInvitrogen製のPCRキットを用いて、リアルタイムを行った。各反応を、3連で、95℃で45秒、60℃で30秒、及び72℃で60秒で、40サイクル行った。この後、60℃から95℃までの段階的な温度上昇からなる融解サイクルを行った。単一の顕著なピークが各遺伝子の解離曲線中に認められ、PCR産物の特異性を裏付けた。Ct数(閾値)をPCRの指數関数期内に設定し、これを用いて、対象となる遺伝子の発現レベルを計算した。B2mを内部標準として使用し、これを用いて値を正規化した。Ctと対数cDNA希釈(対数コピー数に対応する)からなる標準曲線を、未知量のアンプリコンに対応するcDNAの連続希釈物を増幅することにより作成した。ゲノムDNAが増幅されないことを保証するために、RT-PCRの前に5分間煮沸して逆転写酵素を不活化することにより、陰性対照実験を行った。

20

## 【0480】

## (9.4.1.7 免疫プロッティング(ウェスタン解析))

30

全細胞溶解物タンパク質を、プロテアーゼインヒビター カクテル(Santa Cruz)を含むRIPA溶解バッファー(Thermo Scientific)によって、マウスの腎臓及び大動脈から調製した。溶解物(20 μg)を8-12%SDS-PAGEゲルに充填し、インヒビン-A(Santa Cruz)、-チューブリン(Santa Cruz)、snai 1(Cell Signaling)、-SMA(Sigma)、Runx2(Cell Signaling)、MYOCD(Santa Cruz)、ACVRL1(Origene)、ACVR1(Cell Signaling)、Erk1/2(Cell Signaling)、ホスホErk1/2(Cell Signaling)、ACVR1B(Origene)、Col1a1(Santa Cruz)、Smad2/3(Cell Signaling)、又はホスホSmad2/3(Cell Signaling)に対する抗体で免疫プロッティングした。免疫沈降(IP)アッセイでは、同じ全細胞溶解物タンパク質を使用した。非特異的結合を減らすために、試料を、予め洗浄しておいたプロテインAアガロースビーズ(Cell Signaling)を用いて、プレクリアーハンドルした。プレクリアーハンドルした試料をホスホセリン抗体(Abcam)とともに一晩インキュベートした。その後、IP-抗体複合体をプロテインAアガロースビーズ上で捕捉し、タンパク質を免疫プロッティング解析によって検出した。

40

## 【0481】

## (9.4.1.8 ヒト試験)

ヘルシンキ宣言(Declaration of Helsinki)からのガイドラインに従って書面による同意を得た後、対象を登録した。対象が18歳より上で、ステージ3のCKDを有していた場合、適格とした(腎疾患における食事の改良試験(Modification of Diet in Renal Disease study)の式を用いて、推定GFR 30~59ml/分/1.73m<sup>2</sup>(Levey, A.S.らの文献、1999. Ann Intern Med 130:461-470.)。除外基準には、妊娠、骨疾患、心筋梗塞、鬱血性心不全、拡張機能障害、又は重度高血圧が含まれた。研究チームのメンバーは、選択基準を満しつつ試験

50

に関心を持った臨床患者を特定した。医療記録を再検討し、登録前に最終的な適格性を決定した。血液試料を、ベースライン診察時と治療12カ月後に、各対象から取得した。血液試料を取得する日の時間には対象間変動があった。血漿のアリコートを各試料から作製し、すぐに生化学検査に使用するか又は80℃で凍結させた。アクチビンの血漿レベルを、製造元の指示(R&D Systems, Minneapolis, MN)に従って、市販のELISAキットを用いて、2連で測定した。

#### 【0482】

##### (9.4.1.9 統計)

ANOVAを用いて統計解析を行った。別途、図の脚注で指定されない限り、データは全て、平均±SDとして表されている。Fisher LSD法を用いて、群間差を事後評価し、 $p < 0.05$ で有意とみなした。Sigma Stat統計ソフトウェア(Point Richmond, CA)を用いて、解析を行った。全ての群のデータは、7~15の「n」を表す。リアルタイムPCR解析のために、最低3つの試料を各実験群で使用した。対応のないt-検定を用いて、mActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウスとビヒクリル処置したCKD-3Vマウス又は模擬手術したマウス(模擬)を比較した。図6において、四角は、中央値及び四分位数範囲(25~75パーセンタイル)を表し、エラーバーは、25パーセンタイル未満及び75パーセンタイル超の四分位数範囲の1.5倍を示す。平均は、多重比較用のANOVA Holm-Sidak法を用いて比較し、 $p < 0.05$ を有意差の臨界値とした。

#### 【0483】

##### (9.4.2 結果)

###### (9.4.2.1 CKDのモデルにおける腎機能)

ヒトのステージ3のCKD(CKD-3)に類似したCKDを3つの実験モデルで誘導した。第1のモデルは、CKD刺激性アテローム性動脈硬化性血管石灰化のモデル: *ldlr*-/-高脂肪食給餌マウスであった(Fang, Y. らの文献、2014. *Kidney Int* 85:142-150; Fang, Y. らの文献、2014. *J Am Soc Nephrol* 25:1760-1763; Davies, M.R. らの文献、2003. *J Am Soc Nephrol* 14:1559-1567; Davies, M.R. らの文献、2005. *J Am Soc Nephrol* 16:917-928; Lund, R.J. らの文献、2004. *J Am Soc Nephrol* 15:359-369; Mathew, S. らの文献、2008. *J Am Soc Nephrol* 19:1092-1105. PMCID:PMC2396927; Mathew, S. らの文献、2007. *J Am Soc Nephrol* 18:122-130; Mathew, S. らの文献、2008. *J Am Soc Nephrol* 19:1509-1519. PMCID:PM C2488263.)。イヌリンクリアランスとBUNレベルとによって測定される腎機能は、第9.4.1節に記載されているように、*ldlr*-/-高脂肪食給餌マウスでヒトのステージ3のCKDのレベルにまで低下した。以後、これらのマウスをCKD-3と呼ぶ(図12A及び図12B)。さらに、CKD-3マウスは高リン血症であった(表11)。これは、ヒトのステージ3b~4のCKDと一致している。CKDの第2のモデルは、IV型コラーゲンの5鎖(CoI4-5)に欠損のあるマウス及びヒトで発症する自然発症CKD(アルポート症候群)であった(Rheault, M.N. らの文献、2004. *Journal of the American Society of Nephrology* 15:1466-1474.)。200日齢のCoI4-5欠損マウスは、ヒトのステージ3~4のCKDと同等のイヌリンクリアランスの低下及びBUN上昇を有する(図12C及び図12D)。第3のモデルであるGNZマウスにおけるCKD-3は、第9.4.1.1節及び以下に記載されている。

#### 【0484】

##### 表11. 様々な群の動物における血清生化学パラメータ

10

20

30

40

【表11】

パラメータ	第1群 野生型	第2群 模擬	第3群 CKD-3	第4群 CKD-3	第5群 CKD-3
系統	C57/BJ6	<i>Ldlr</i> -/-	<i>Ldlr</i> -/-	<i>Ldlr</i> -/-	<i>Ldlr</i> -/-
食餌	通常食	高脂肪食	高脂肪食	高脂肪食	高脂肪食
手術	なし	模擬	CKD	CKD	CKD
出生後 の週数	28	28	28	28	28
処置	なし	なし	ビヒクル	mActRIIA-Fc	LaC03
N	12	15	14	15	12
BUN (mg/dL)	24.0 ± 4.6	20.6 ± 3.7	37.7 ± 7.6	36.5 ± 5.8	35.6 ± 9.1
Ca(mg/dl)	8.3 ± 1.8	8.9 ± 0.9	9.4 ± 0.8	8.8 ± 0.3	8.8 ± 1.4
リン (mg/dl)	8.9 ± 0.2	7.9 ± 2.3	11.0 ± 1.6	11.8 ± 1.2	10.5 ± 2.1

## 【0485】

(9.4.2.2 アクチビンレベル及び大動脈アクチビン受容体IIA型(ActRIIA))

CKDにおける腎修復がTGF-βスーパーファミリーメンバーの循環レベルを刺激する能力を調べた。循環アクチビンレベルは、CKDのモデルで増大していた(図13A及び図13B)。腎臓及び大動脈の組織をアクチビンA(インヒビンA(Ihba)のホモ二量体)のmRNAについて解析した。Ihba mRNAは、CKDによって腎臓及び大動脈で誘導され(図13C)、タンパク質レベルは、腎臓で増大していた(図13D)。CKD-3を有するマウス由来の大動脈をTGF-βスーパーファミリーII型受容体の誘導について解析した。このTGF-βスーパーファミリーII型受容体は、II型及びI型(ALK)受容体から構成されるスーパーファミリー受容体ヘテロ多量体のリガンド結合成分である。*Ldlr* -/- 高脂肪食給餌マウスでもたらされたCKD-3は、大動脈血管平滑筋におけるアクチビンII型受容体A(ActRIIA)の上方調節を誘導した(図13E)。アクチビンは、調節性阻害因子のフォリスタチン及びフォリスタチン様3(fstL3)(Welt, C.らの文献、2002. *Experimental Biology and Medicine* 227:724-752.)と会合する。これらの循環レベル(図13F及び図13G)並びに組織レベルは、CKD-3による影響を受けなかった。循環中のアクチビンAレベル(>5000pg/ml)に対するフォリスタチン、fstL3、及びインヒビン(620pg/ml + 400pg/mlの未測定のインヒビンの合計(Sharpe, R.M.らの文献、1999. *Journal of Andrology* 20:94-101.))の化学量論的組成は、CKDが、アクチビンAをCKDにおける循環因子に対する病理学的事象である顕著な遊離アクチビンレベルを生じさせることを示唆している。

## 【0486】

(9.4.2.3 CKDにおける大動脈内皮間葉転換)

CKDの第3の実験モデルをこれらの試験で利用した。GNZマウスは、細胞系譜追跡に使用され(Stoller, J.Z.らの文献、2008. *Genesis*(New York, N.Y.: 2000) 46:200-204.)、GNZマウスは、LoxPに隣接する上流の終止(STOP)配列が除去されると、核局在化緑色蛍光タンパク質及びガラクトシダーゼ(GFP/LacZ)を発現する(図14A)。GNZマウスのLoxP部位を除去するために、このマウスを、チロシンキナーゼTek(Tie2)プロモーター/エンハンサーの指示下でCreリコンビナーゼを発現するTek-Creマウスと交配させた。Tie2は、内皮系統特異的アンジオポエチン受容体であるので、GNZ/Tek-Cre+マウスは、内皮系統細胞で核及び細胞質GFPを発現する(図14A)(Moore-Morris, T.らの文献、2014. *The Journal of Clinical Investigation* 124:2921-2934.)。GNZ/Tek-Cre+マウスでは、核DAPI染色と共に局在する大動脈GFPは、CD31バイオマーカーによって特徴付けられる内皮細胞に限定されている(図14B、矢印参照)。CKD-3をGNZ/Tek-Cre+マウスで生じさせると、内皮細胞に加えて、大動脈中膜及び外膜の細胞がGFP染色を示し、これらの細胞が内皮間葉転換(EnMT)によって内皮系統から誘導されることを示した(図14C、14D、矢印参照)。CKDがEnMTを刺激するかどうかをさらに解析するために、EnMTに関与する転写因子Snai 1の発現を、自然発症CKD

10

20

30

40

50

のモデルであるアルポート症候群マウスで調べた。Snai 1は、CKDの経過の初期(75doa)に上方調節され(図14E)、最大アクチビンレベルのタイミングと一致した(下記参照)。

#### 【0487】

##### (9.4.2.4 CKDにおけるActRIIAシグナル伝達を阻害することの血管効果)

ActRIIAの細胞外ドメインがIgG1のFcドメインに融合したものから構成されるリガンドトラップ(図23A)(本明細書では、mActRIIA-Fcと呼ばれる)を利用した。図23Bは、CKD-3によって刺激される血管石灰化を8週間発症させた後、mActRIIA-Fcを開始する処置プロトコルを用いる血管石灰化モデルでmActRIIA-Fcを利用するための実験設計を示している。このプロトコルを用いて、ActRIIAリガンドトラップによるCKD-3マウスの処置は、Idlr-/-高脂肪食給餌CKD-3マウスにおけるCKD-3刺激性の大動脈Runx2発現及び大動脈アルカリホスファターゼ(ALP)発現を減少させた(図25A)。Runx2発現とALP発現はどちらも、ActRIIAシグナル伝達の潜在的な下流効果及びmActRIIA-Fc処置によって無効化される大動脈における骨芽細胞転換のバイオマーカーを表す。分化した血管平滑筋細胞のバイオマーカーである大動脈平滑筋22(Sm22-)は、CKD-3によって減少し、mActRIIA-Fcによって刺激された。CKD-3は、血管平滑筋細胞特異的転写因子である大動脈ミオカルディン(MYOCD)発現の減少を引き起こしたが、ミオカルディンはmActRIIA-Fc処置による影響を受けなかった。大動脈Klotho発現は血管石灰化と関連付けられているが(Lim, K.らの文献、2012. *Circulation* 125:2243-2255.)、これは、腎臓と比較して非常に低かった(データは示さない)。図25AのmRNAの大動脈タンパク質レベルに対するCKD-3及びmActRIIA-Fc処置の効果に関して、CKDは大動脈Runx2レベルを増大させ、mActRIIA-Fcは大動脈Runx2レベルを正常化させた(図25B)。CKDは、分化した血管平滑筋細胞の別のバイオマーカーである大動脈の平滑筋アクチン(SMA)のレベルを減少させ、mActRIIA-Fc処置は、大動脈のSMAのレベルを増大させた(図25B)。ミオカルディンレベルは、CKDによっても、mActRIIA-Fc処置によっても変化しなかった。

10

20

30

40

#### 【0488】

##### (9.4.2.5 血管石灰化に対するActRIIAシグナル伝達の減少の効果)

血管石灰化のCKD刺激を、上記のように、切除性CKDを有するIdlr-/-高脂肪食給餌マウスであるアテローム性動脈硬化症及び2型糖尿病のモデルで調べた(AI-Aly, Z.らの文献、2007. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27:2589-2596; Towler, D.A.らの文献、1998. *Journal of Biological Chemistry* 273:30427-30434.)。CKD-3は、CKD-3ビヒクリ処置マウス(CKD-3 V)の大動脈アテロームでカルシウム沈着の蓄積を引き起こし(図15A)、これは、mActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 R)では存在せず、大動脈組織カルシウム含有量は、野生型マウスで認められるレベルにまで低下し、mActRIIA-Fc処置の開始時点のCKD-3で存在するカルシウム含有量を有意に下回った(図15B)。

#### 【0489】

##### (9.4.2.6 CKD刺激性心疾患に対するActRIIAシグナル伝達の減少の効果)

心疾患のCKD刺激を血管石灰化モデルで検討した。CKD-3 Vマウスは、増大した心重量を有しており、これは、mActRIIA-Fc処置によって無効化されたが(図16A)、炭酸ランタン処置(CKD-3 L(Fang, Y.らの文献、2014. *J Am Soc Nephrol* 25:1760-1763.))によっては無効化されず、CKD-3 Vは、軽度の心肥大を誘導した(図16B)。しかしながら、心筋線維化の兆候がなかった一方(図16C)、筋細胞肥大の兆候があり、これは、mActRIIA-Fc処置によって無効化された。

#### 【0490】

CKDにおける血管石灰化と心肥大の関連の1つのメカニズムは、大きな動脈壁硬化によるものであるので、以前に報告された方法(Wagenseil, J.E.らの文献、2009. *Circulation Research* 104:1217-1224; Wagenseil, J.E.らの文献、2005. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* 289:H1209-H1217.)を用いて、血管硬化及び血圧を測定した。Idlr-/-高脂肪食給餌アテローム性動脈硬化症マウスにおけるCKD-3は、頸動脈又は大動脈の血管硬化(図19A及び19B)も、血圧上昇(表12)ももたらさなかった。さらに、Dkk1に対する中和抗体で処置したCKD-3マウスにおけるDkk1中和(Fang, Y.らの文献、2014. *J Am Soc Nephrol* 25:

50

1760-1763.)は、硬化の増大がないとき、大動脈硬化に対する効果を有しなかった。

【0491】

表12. 28週齢マウスの生理的心血管パラメータ

【表12】

	WT	模擬	CKD-3 V	CKD-3 Dkk1 mAb
SBP	108.9±1.1	111.9±4.7	100.4±4.6	110.7±4.8
DBP	77.27±1.0	78.56±2.2	69.14±3.1	77.55±3.6
脈圧	31.63±0.3	33.32±2.5	31.27±2.1	33.1±1.9
心拍数	547.1±4.7	501.2±17.4	505.6±14.3	558.6±11.2

10

SBP = 収縮期血圧、DBP = 拡張期血圧。値は、平均 ± 平均の標準誤差として表されている。  
群当たりN = 4 ~ 6匹のマウス。

【0492】

(9.4.2.7 大動脈及び腎臓及び腎線維症におけるActRIIAシグナル伝達)

TGF スーパーファミリーによる標準的なシグナル伝達は、そのセリン/トレオニンキナーゼ活性を活性化し、かつI型受容体であるAlkキナーゼの会合及びリン酸化を刺激する、II型受容体へのリガンド結合を伴う(図20の図表示を参照)。TGF スーパーファミリーによって利用される7つのAlkキナーゼがあり、Alk4(ActRIB)は、ほとんどの場合、アクチビン/ActRIIAシグナル伝達と関連するI型受容体である(Abe Yらの文献、2004. Growth Factors(Chur, Switzerland) 22:105-110.)。CKD-3マウスモデル由来の腎臓ホモジネートでは、以前の研究(ANTSIFEROVA, M. 及び WERNER, S. の文献、2012. Journal of Cell Science 125:3929-3937.)と一致して、Alk4リン酸化が増大しなかった(図18A)。対照的に、ホスホsmad 2はCKD-3によって増大し、mActRIIA-Fcによって減少し(図18A)、CKDの腎臓アクチビンシグナル伝達における別のAlk受容体の役割を示した。間質性腎炎を有する罹患したCKD-3の腎臓では、Col1A1が上方調節され、mActRIIA-FcがCol1a1レベルを減少させ(図18A)、mActRIIA-Fcによって誘導されるホスホsmad 2の減少と一致した。さらに、mActRIIA-Fcによって改善されるCKD-3 Vマウスで誘導される腎臓Klotho発現は大きく減少した(図18B)。結果として、アクチビンがCKD-3 Vで発現される腎コンパートメントを解析し、尿細管周囲筋線維芽細胞における大量発現が確認されたが、上皮では確認されなかった。

20

30

【0493】

大動脈平滑筋では、Alk4及びAlk1は検出されたが(図18A)、Alk5もAlk2も検出されなかった。Alk4及びAlk1のレベルは、CKD-3による影響を受けなかった。しかしながら、CKD-3が大動脈ホスホsmad 2/3レベルを増大させることも、mActRIIA-Fcがそれらを減少させることもなかった(図18A)。しかしながら、非標準的ActRIIAシグナル伝達の解析(図20)によって、mapキナーゼ(ホスホErk1/2)が、CKDによって活性化されることも、mActRIIA-Fcによって阻害されることもないこと、並びにp38及びJNKの血管平滑筋レベルが非常に低いことが示された。大動脈Actin2レベルも非常に低く、かつCKD-3によって刺激されなかった。Axin2レベルは、標準的Wntシグナル伝達の標準的バイオマーカーである。しかしながら、Dkk1が標準的Wntシグナル伝達の転写標的であるので、腎臓及び大動脈におけるDkk1レベルをWnt活性のバイオマーカーとして解析し、mActRIIA-Fc処置がCKD-3マウスにおける腎臓Dkk1レベルを減少させ(図18C)、血漿Dkk1レベルの有意な低下をもたらすことを示した(図18C)。さらに、大動脈Dkk1レベルはCKD-3によって増大し、mActRIIA-Fcによって阻害された(図18C)。これは、腎臓及び血管平滑筋Wntシグナル伝達並びにDkk1の全身放出がアクチビン抑制によって阻害されることを示した。したがって、CKDにおける循環アクチビンの上昇は、血管ActRIIAの増大を通じてシグナルを送り、Wntシグナル伝達を活性化し、アテローム性動脈硬化性石灰化を刺激する。

40

【0494】

(9.4.2.8 前臨床研究からヒト病理生物学及び臨床への変換)

図19に示すように、血清アクチビンレベルは、健常対照と比較して、CKDステージ3の患

50

者のコホートで増大していた。

#### 【0495】

##### (9.4.3 結論)

本実施例は、アクチビンが、CKD期の循環中で増大する腎修復に関与する第2の因子であることを示している。理論に束縛されるものではないが、この結果は、アクチビン発現が罹患腎臓で増大し、循環中に放出され、内皮間葉転換が一因となる大動脈血管平滑筋脱分化及び骨芽細胞転換を刺激し、これらの効果が最後にはCKD刺激性のアテローム性動脈硬化性石灰化及び心肥大に至ることを示している。CKDは、筋線維芽細胞における腎臓アクチビン発現を上方調節し、腎線維化の増大を通じて腎疾患の進行を刺激する。ActRIIAシグナル伝達の阻害は、大動脈における骨芽細胞転換及びアテローム性動脈硬化性石灰化を阻害する。ActRIIAシグナル伝達の阻害は、心肥大及び腎線維化を阻害する。初期CKD-MBD症候群に対するActRIIAリガンドトラップのmActRIIA-Fcの効果は、CKD刺激性血管石灰化におけるDkk1に対するモノクローナル抗体の効果に似ている(Fang, Y.らの文献、2014. J Am Soc Nephrol 25:1760-1763.)。これらのデータは、罹患腎臓におけるActRIIAシグナル伝達の阻害がWnt活性化及び循環Wntインヒビターを減少させたことを示している。さらに、血管平滑筋において、アクチビンはWnt活性化を刺激し、これは、mActRIIA-Fcによって阻害される。このように、2つの腎臓発生因子であるWntとアクチビンの再活性化は、CKDにおいて循環Wntインヒビター及びアクチビンを産生し、血管疾患及び心疾患を引き起こす。これは、腎疾患が心血管疾患を直接引き起こすという証明であり、腎疾患過程の検討を腎修復及びその結果として生じる心血管疾患の刺激から切り離すことができないという証明である。

#### 【0496】

さらに、本実施例は、腎臓アクチビン発現が慢性腎疾患の3つのモデルで増大し、循環中のアクチビンインヒビターのレベルを上回る循環アクチビンの増大をもたらすことを示している。循環アクチビンは、ActRIIA受容体を介したシグナル伝達を刺激し、大動脈血管平滑筋脱分化、骨芽細胞転換、及びアテローム性動脈硬化性plaquesの石灰化をもたらした。これらの効果は、CKDによって大動脈アクチビンmRNAの増大が誘導されたにもかかわらず、大動脈でアクチビンタンパク質レベルの増大がなかったことから裏付けられるように、循環アクチビンによるものであった(図13B)。理論に束縛されるものではないが、これらのデータは、血管アクチビンシグナル伝達が腎臓による内分泌アクチビンの産生を通じてCKDによって刺激されることを示している。

#### 【0497】

EnMTは、TGF $\beta$ 、骨形成タンパク質(BMP)、アクチビン/インヒビン、並びに成長及び分化因子(GDF)を含むTGF $\beta$ スーパーファミリーのメンバーによって活性化される(Piek, E.らの文献、1999. The FASEB Journal 13:2105-2124.)、Smad媒介性プロセスであるので(Cooley, B.C.らの文献、2014. Science Translational Medicine 6:227ra234.)、CKD-3を有する血管石灰化モデルの大動脈を、受容体のリガンド結合成分であるTGF $\beta$ スーパーファミリーのII型受容体のレベルの変化について解析した。アクチビン受容体II型A(ActRIIA)は、大動脈血管平滑筋で上方調節された。リガンドトラップ(mActRIIA-Fc)としてのIgG1のFcドメインとの融合タンパク質中のActRIIAの細胞外ドメインの投与は、ActRIIAシグナル伝達の阻害が、大動脈平滑筋細胞における骨芽細胞転換の阻害、血管平滑筋細胞遺伝子発現の刺激、及びCKD刺激性アテローム性動脈硬化症モデルにおける大動脈石灰化の無効化をもたらすことを示した。さらに、CKDは、系譜追跡マウスモデルでEnMTを刺激した。しかしながら、アクチビン機能の主要な部位は、ActRIIA発現が増大している血管平滑筋にあるように思われた。

#### 【0498】

とりわけ、左心室の心肥大は、CKDで非常によく見られる(Moran, A.らの文献、2008. American Journal of Kidney Diseases 52:839-848; Park, M.らの文献、2012. Journal of the American Society of Nephrology 23:1725-1734.)。さらに、アテローム性動脈硬化性血管石灰化モデルは、心肥大を特徴としていた(図16)。しかしながら、アテローム性

10

20

30

40

50

動脈硬化症CKD-3マウス(*Idlr-/-*高脂肪食給餌糖尿病マウス)が血管硬化も高血圧も示さなかつたので、このモデルにおける心肥大の発生は、CKD刺激性血管硬化(Townsend, R.R.の文献、2015. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 24:47-53 10.1097/MNH.0000000000000086; Merx, M.W.らの文献、2005. *Journal of the American Society of Nephrology* 16:3357-3364.)、高血圧、及び心臓リモデリングの一般的なパラダイムとは機構的に異なっている。mActRIIA-Fcは、FGF23レベルの変化がないときに心肥大を改善したので(図19)、CKD-3マウスにおける心肥大がFGF23によるものであった可能性は低い(Faul, C.らの文献、2011. *J Clin Invest* 121:4393-4408.)。

#### 【0499】

結論として、理論に束縛されるものではないが、本実施例は、CKD期の循環中で増大し、かつ心血管疾患を引き起こす、腎修復に関する第2の因子を示している。理論に束縛されるものではないが、本実施例は、アクチビン発現が罹患腎臓で増大し、循環中に放出され、内皮間葉転換が一因となる大動脈血管平滑筋脱分化及び骨芽細胞転換を刺激し、これらの効果が最後にはCKD刺激性のアテローム性動脈硬化性石灰化及び心肥大に至ることを示している。CKDは、筋線維芽細胞における腎臓アクチビン発現を上方調節し、腎線維化の増大を通じて腎疾患の進行を刺激する。ActRIIAシグナル伝達の阻害は、大動脈における骨芽細胞転換及びアテローム性動脈硬化性石灰化を阻害する。ActRIIAシグナル伝達の阻害は、心肥大及び腎線維化を阻害する。初期CKD-MBD症候群に対するActRIIAリガンドトラップのmActRIIA-Fcの効果は、罹患腎臓におけるActRIIAシグナル伝達の阻害がWnt活性化及び循環Wntインヒビターを減少させたことを示している。したがって、理論に束縛されるものではないが、2つの腎臓発生因子であるWntとアクチビンの再活性化は、CKDにおいて循環Wntインヒビター及びアクチビンを産生し、血管疾患及び心疾患を引き起こし；したがって、腎疾患は心血管疾患を引き起こす。

10

20

20

#### 【0500】

(9.5 実施例5:腎損傷/修復は全身性Wnt阻害及びアクチビンを通じて血管疾患を刺激する)  
)

##### (9.5.1 背景)

本実施例に提示される結果は、実施例4(第9.4節)に提示された結果に関する。

#### 【0501】

腎疾患は、腎修復期に全身性Wnt阻害及びアクチビン分泌を生じさせることによって、アテローム性動脈硬化性血管石灰化を引き起こす。慢性腎疾患(CKD)の血管作用は、Wnt阻害とアクチビン受容体機能のアクチビン誘導性調節の相互作用である。

30

#### 【0502】

##### (9.5.2 方法)

Wntインヒビター、とりわけ、Dkk1、及びアクチビンが上昇しているCKDを系譜追跡及び血管石灰化のマウスマルクで誘導し、アルポートのマウスで自然発症させた。アクチビン、Dkk1、アクチビン受容体2A型(ActRIIA)、ホスホsmad 2/3、及びコラーゲンのレベルを、ELISA、RT-PCR、及びウェスタンプロットによって測定した。血管平滑筋機能を圧力誘導性動脈拡張によって測定した。細胞系譜追跡を内皮特異的Tie2-Creマウスに交配させたRosa-tdTマウスで実施した。Rosa-tdTを有するマウスは、Creリコンビナーゼを有する細胞でtomato redを発現する。mActRIIA-Fcは、アクチビンAリガンドトラップを表す(例えば、米国特許第8,173,601号及びCarrancioらの文献、2014, *British Journal of Haematology*, 165:870-882を参照されたい)。

40

#### 【0503】

##### (9.5.3 結果)

CKDは、循環Dkk1及びアクチビンレベルを増大させた。罹患腎臓では、アクチビンが筋線維芽細胞で発現し、ホスホsmad 3を介するActRIIAシグナル伝達が増大した。罹患腎臓では、ActRIIAリガンドトラップのmActRIIA-Fcが、腎臓psmad 3、Col1A1発現、尿タンパク質レベル、及びDkk1レベルを阻害し、Klothoレベルを増大させた。血管系では、ActRIIAレベル及びシグナル伝達が、血管平滑筋の分化及び機能の減少を伴って、CKDによって障

50

害された。CKDマウス血管系では、mActRIIA-Fcが、血管平滑筋細胞分化を増大させ、骨芽細胞転換及び血管石灰化を阻害した。循環では、mActRIIA-FcがDkk1レベルを減少させた。CKDは、正常な腎臓機能を有するTek-Cre/Rosa-tdTマウスと比べて、Tek-Cre/Rosa-tdT CKDマウスの損傷大腿動脈の外膜の細胞でtomato redの発現を誘導し、その場合、tomato redは大腿動脈内皮に限定されており、CKDが血管損傷期にTie2陽性細胞を誘導することを示した。

#### 【0504】

##### (9.5.4 結論)

CKDは、血管平滑筋機能を減少させ、骨芽細胞転換及び血管石灰化を刺激した。mActRIIA-Fcを用いてCKDにおけるアクチビン上昇の効果を減少させると、Smad依存的腎線維化が阻害され、大動脈骨芽細胞転換が遮断され、血管平滑筋分化が増大し、血管石灰化が減少した。

10

#### 【0505】

##### (9.6 実施例6: CKD-MBDの腎性骨ジストロフィーの発病におけるアクチビンシグナル伝達の役割)

###### (9.6.1.1 序論)

慢性腎疾患に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)には、血管石灰化及び骨形成異常が含まれる。CKDは、循環アクチビン(TGF- $\beta$ スーパーファミリーのリガンド)及びアクチビンシグナル伝達を増大させる(図21A)。アクチビンIIA型受容体(ActRIIA)リガンドトラップ(mActRIIA-Fc)によるActRIIAシグナル伝達の阻害は、血管石灰化を阻害し、心肥大を抑制する。本実施例は、腎性骨ジストロフィーの発病におけるアクチビンシグナル伝達の役割を示す。

20

#### 【0506】

###### (9.6.1.2 方法)

高脂肪食を給餌した模擬手術したIdlr<sup>-/-</sup>マウス(模擬; n = 12)は、糖尿病及び高コレステロール血症を発症する。高リン血症、FGF-23の上昇、及び糸球体濾過量の60%低下を伴うCKD(CKD-3)を、14週齢での5/6腎摘出術によって、Idlr<sup>-/-</sup>高脂肪食給餌マウスで誘導した。これは、アテローム性動脈硬化性血管石灰化のモデルである。CKD-3マウスをmActRIIA-Fc 10mg/kg(mActRIIA-Fc; n = 15)又はビヒクリ(VEH; n = 13)で処置し、22週齢から、週1回、腹腔内注射し、28週で、骨格組織形態測定及びマイクロコンピュータ断層撮影法によって調べた。CKD-3の結果を野生型(WT; n = 5)マウス及び模擬と比較した。

30

#### 【0507】

###### (9.6.2 結果)

WT(海綿骨量/組織量(BV/TV): 12.90%)と比べて、模擬マウスは、無形成骨疾患と関連する低下したBV/TV(10.92%)を示した。CKD-3の誘導は、VEHマウスにおける高代謝回転骨疾患とより低いBV/TV(11.22%)とをもたらし;これは、6週間のmActRIIA-Fc処置によって無効化された(13.28%)。CKD-3の誘導は、骨梁幅の低下をもたらし、これは、6週間のmActRIIA-Fc処置によって無効化された。CKD-3 VEH処置マウスは、模擬(1.05%及び33.40/100mm)と比較して、より大きい浸食面/骨面及びより大きい破骨細胞数/100mm骨長(それぞれ、1.83%及び62.32/100mm)を示し、これは、mActRIIA-Fcによって軽減された(1.23%及び38.37/100mm)。CKD-3 VEH処置マウスはまた、WT又は模擬と比較したとき、より大きい骨芽細胞面/骨面及びより大きい骨芽細胞数/100mm骨長(それぞれ、1.58%及び110.63/100mm; P < 0.05)を示した(それぞれ、図21B及び図21C)。mActRIIA-Fcは、VEHと比較して、骨芽細胞面/骨面と骨芽細胞数/100mm骨長の両方を有意に低下させた(0.68%及び43.18/100mm; P < 0.05)。VEHと比べた骨芽細胞数の有意な低下にもかかわらず、mActRIIA-Fc処置での骨石灰速度は維持され(それぞれ、0.42及び0.40 μm<sup>3</sup>/日)、有意に高い骨形成速度/骨芽細胞を有し(それぞれ、0.17対0.48 μm<sup>3</sup>/100細胞/年; VEHと比べて、P < 0.05)、これは、WT(0.42 μm<sup>3</sup>/100細胞/年)と類似していた(図21D)。

40

#### 【0508】

表13.組織形態計測の結果(平均 + SEM)

50

【表13】

	模擬	CKD-3 + ピヒクル	CKD-3 + mActRIIA-Fc
BV、%	10.9±1.3	11.2±0.8	13.3±1.2
骨梁幅(プレート)、 μm	30.9±2.1	31.8±1.7	33.2±1.9
骨梁間隙(プレート) μm	269.4±17.3	261.9±16.6	238.1±24.9
類骨量/BV、%	0.3±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1
類骨面/骨面、 %	2.5±0.6	2.9±0.7	1.7±0.4
類骨幅、μm	2.1±0.4	1.9±0.3	1.9±0.2
浸食面/骨面、 %	1.1±0.2	1.8±0.5	1.2±0.5
破骨細胞数/骨周囲長、 #/100mm	33.4±5.1	62.3±19.5	38.4±15.4
破骨細胞面/骨面、 %	1.0±0.2	1.7±0.5	1.1±0.5
骨石灰化速度/日、 μm/日	0.4±0.0	0.4±0.1	0.4±0.0
二重標識/骨面、 %	3.0±0.9	3.7±1.0	1.6±0.3
一重標識/骨面、 %	8.0±0.9	10.1±1.1	10.3±1.9
骨石灰化面/骨面、 %	7.0±0.9	8.8±1.1	6.8±1.1
骨形成速度/骨面、 mm <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> /年	10.8±2.3	13.9±2.5	9.5±1.2
骨石灰化遅延時間、 日	1.9±0.4	1.9±0.5	1.3±0.3
類骨成熟時間、 日	6.3±1.4	5.4±0.9	4.9±0.5

SEM = 平均の標準誤差

## 【0509】

mActRIIA-Fcは、高リン血症及びFGF-23レベルに影響を及ぼさなかった。

## 【0510】

## (9.6.3 結論)

循環アクチビンの増大は、CKD-3と関連する高代謝回転骨形成異常の一因である。ActRIIAリガンドトラップのmActRIIA-Fcによるアクチビンシグナル伝達阻害は、骨吸収を阻害し、骨石灰化速度及び骨形成速度/骨芽細胞を正常化させることにより、CKD-3における骨量を増大させ、CKDの負の効果を和らげた。

## 【0511】

## (9.7 実施例7: 漸増用量レベルのhActRIIA-Fcで治療した血液透析対象における骨量及び腹部大動脈血管石灰化の定量的コンピュータ断層撮影の結果)

## (9.7.1 序論)

高代謝回転腎性骨ジストロフィーは、皮質骨量が減少し、骨梁量が増加し、結果として骨折リスクの増大をもたらすことを特徴とする。インビトロのデータに基づくと、アクチビンII型受容体-IgG1融合タンパク質のhActRIIA-Fcは、アクチビンAシグナル伝達を遮断し、破骨細胞生成を低下させ、骨内での骨芽細胞成熟を促進し得る。血液透析(HD)を受けている対象における現在の解析では、定量的コンピュータ断層撮影(QCT)を用いて、骨ミネラル密度(BMD)及び腹部大動脈血管石灰化におけるhActRIIA-Fcの効果を評価した。

10

20

30

40

50

## 【0512】

## (9.7.2 方法)

貧血の改善のためのHDを受けていた対象におけるhActRIIA-Fcの研究では、エリスロポエチン刺激剤(ESA)応答性の対象を、ヘモグロビン(Hb)が<10g/dLになるまで、そのESA効果からウォッシュアウトし、その後、最大8回の投与サイクルの間、28日毎に皮下に投与される0.3mg/kg(n=9)、0.5mg/kg(n=8)、0.7mg/kg(n=9；7件は終了、2件は実行中)のhActRIIA-Fc、又はプラセボ(PBO；n=9)に無作為に割り付けた。14日の投与サイクルを利用する用量群は、現在登録中である。対象を、Hb、安全性パラメータ、BMD、血管石灰化、及び骨代謝回転のバイオマーカーに対する効果について評価した。治療失敗(Hb<9g/dL)は、ESA/輸血で救済した。股関節、腰椎、及び腹部大動脈のQCTスキャンをベースライン時と225日の治療期の後に取得した。

10

## 【0513】

## (9.7.3 結果)

本研究で無作為に割り付けられた35人の対象のうち、20人がペアのQCT評価を行った(PB0: n=3；0.3mg/kg: n=6；0.5mg/kg: n=5；及び0.7mg/kg: n=6)。ペアのQCTを有する何人かの対象は、治療失敗のために、hActRIIA-Fcへの曝露が制限された。表14は、PBO及び各hActRIIA-Fc用量群のBMD及び血管石灰化の結果を示している。hActRIIA-Fcは、PBOと比較して、皮質及び骨梁BMDに対する高代謝回転腎性骨ジストロフィーの効果を軽減し、血管石灰化の進行を減速させるように思われた。

20

## 【0514】

表14

## 【表14】

	PBO	n	hActRIIA-Fc					
			0.3 mg/kg	n	0.5 mg/kg	n	0.7 mg/kg	n
治験薬を服用した日数	107.3	3	107.2	6	152.6	5	151.8	6
大腿骨頸部皮質BMD、 平均%CFB	-0.91%	3	-1.38	5	1.56%	5	0.90%	4
大腿骨頸部皮質BMDの2% を超える増加を有する 対象、%	0.00%	3	20.00%	5	40.00%	5	75.00%	4
腰椎BMD(骨梁)、 平均%CFB	12.59%	3	7.95%	6	0.54%	5	1.93%	6
合計アガットストンスコア、 平均%CFB	58.42%	3	24.89%	6	17.26%	5	7.42%	5
アガットストンスコアの 15%未満の増加を有する 対象、%	33.33%	3	83.33%	6	80.00%	5	100.00%	5
容積スコア(mm <sup>3</sup> )の平方根、 平均CFB	4.54	3	11.07	6	1.23	5	1.26	5

30

40

CFB = ベースラインからの変化

## 【0515】

## (9.7.4 結論)

これらのデータは、hActRIIA-Fcが、用量依存的な様式で、皮質骨及び骨梁に対する高代謝回転腎性骨ジストロフィーの効果を無効化し、血管石灰化の進行を減速させることを示す。

## 【0516】

(9.8 実施例8.漸増用量レベルのActRIIA-hFc(配列番号7;「ソタテルセプト」)で治療した血液透析対象における骨量及び腹部大動脈血管石灰化の定量的コンピュータ断層撮影の結果:)

50

(9.8.1 序論)

実施例6(第9.7節)の序論(第9.7.1節)及び方法(第9.7.2節)を参照されたい。本実施例は、後日、本研究で得られた、実施例6(第9.7節)で行われた研究からの追加データを示している。

【0517】

(9.8.2 結果)

計35人の対象が無作為に割り付けられ、表15に示されるような、少なくとも1回のプラセボ又はActRIIA-hFc(配列番号7;「ソタテルセプト」)の投与を受けた。

【0518】

表15.無作為に割り付けられた対象及びQCT解析サブセット

10

【表15】

対象	プラセボ	ソタテルセプト 0.3mg/kg	ソタテルセプト 0.5mg/kg	ソタテルセプト 0.7mg/kg
無作為に割り付けられ、1回以上のプラセボ又はソタテルセプトの投与を受けた	9	9	8	9
ベースライン時と 225日目のQCT測定	4	6	5	6

20

【0519】

ベースライン時と225日目のペアのQCT測定を行った対象を含む、対象の内訳を図22Aに示す。治験を中止したほとんどの対象は、通常、ヘモグロビン濃度が9g/dL未満であるという理由で、治療に失敗し、救済を必要とした。治験を中止したほとんどの対象は、プラセボ又は0.3mg/kgのソタテルセプトを受けた。有害事象が理由で治療を中止した対象はいなかった。さらに、ペアのQCT測定を行った21人の対象のうち、12人は、治療期にヘモグロビン治療失敗による救援治療を必要とし、そのうちの9人は、最初の3回の投与サイクルのうちに救済を必要とした。

【0520】

ペアのQCT測定を行った対象の間で、ベースライン時の人口統計学的及び臨床的特徴は、治療群全体で概ね類似していた(表16)。しかしながら、プラセボ群では、透析を受けた時間がかなり長く、この群は、最も若い群でもあった。群間で、ベースラインバイオマーカー及びアガットストンスコアにも違いがあった(表17)。

30

表16.ペアのQCT測定を行った対象のベースライン時の人口統計学的及び臨床的特徴

【表16】

	プラセボ (n=4)	ソタテルセプト 0.3 mg/kg (n=6)	ソタテルセプト 0.5 mg/kg (n=5)	ソタテルセプト 0.7 mg/kg (n=6)
年齢、平均、歳	51.3	57.3	60.8	63.0
女性、n(%)	1 (25.0)	6 (66.7)	0 (0.0)	4 (66.7)
人種、n(%)				
白人	1 (25.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	5 (83.3)
黒人	2 (50.0)	3 (50.0)	2 (40.0)	1 (16.7)
アジア人	1 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
民族、n(%)				
ヒスパニック	0 (0.0)	2 (33.3)	3 (60.0)	2 (33.3)
非ヒスパニック	4 (100.0)	4 (66.7)	2 (40.0)	4 (66.7)
透析後の体重、 平均、kg	65.5	80.3	79.4	84.5
ボディマス指数、 平均、kg/m <sup>2</sup>	24.2	27.7	26.9	29.9
糖尿病、n(%)	2 (50.0)	5 (83.3)	5 (100.0)	5 (83.3)
副甲状腺摘出、 n(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
透析を受けた時間、 平均、月	165.8	43.3	22.4	68.1
非カルシウムリシン酸 バインダー、 n(%)*	4 (100.0)	3 (50.0)	3 (60.0)	3 (50.0)
カルシウム系リシン酸 バインダー、 n(%)*	1 (25.0)	4 (66.7)	4 (80.0)	4 (66.7)
カルシウム模倣薬、 n(%)*	1 (25.0)	2 (33.3)	0 (0.0)	2 (33.3)
1,25-OHビタミンD 類似体、n(%)	3 (75.0)	5 (83.3)	2 (40.0)	4 (66.7)

\* 対象は複数のタイプのバインダーを受けている可能性がある

【0522】

表17. ペアのQCT測定を行った対象の平均ベースラインバイオマーカー、容積BMD、及びアガットストンスコア

10

20

30

【表17】

	プラセボ (n=4)	ソタテルセプト 0.3 mg/kg (n=6)	ソタテルセプト 0.5 mg/kg (n=5)	ソタテルセプト 0.7 mg/kg (n=6)
ベースラインの全 PTH, pg/mL	209.2	104.8	135.5	100.4
BSAP <sup>a</sup> , µg/L	24.0	18.0	13.2	15.5
P1NP <sup>b</sup> , ng/mL	548.3	376.2	468.4	437.5
CTX <sup>c</sup> , pg/mL	3,152.3	2,062.5	2,266.8	2,246.5
全股関節統合体 BMD, mg/cm <sup>3</sup>	276.8	286.6	280.0	281.0
大腿骨頸部皮質 BMD, mg/cm <sup>3</sup>	640.5	667.0	593.1	594.8
平均腰椎 (L1, L2) BMD, mg/cm <sup>3</sup>	140.1	125.6	149.1	118.7
VC 合計アガット ストンスコア <sup>d</sup>	6,498.8	9,472.7	3,618.5	1,862.1

注: nは、ペアのQCT評価を有する無作為に割り付けられた対象の数を表し;各パラメータに利用可能な対象の実際の数は異なり得る。PTH = 副甲状腺ホルモン。

10

20

<sup>a</sup>骨特異的アルカリホスファターゼ(BSAP)参照範囲:男性、6~30;女性(閉経前)、3~19;女性(閉経後)、6~26。

<sup>b</sup>プロコラーゲン1型N-プロペプチド(P1NP)参照範囲:男性、30~110;女性20~108

<sup>c</sup>C末端テロペプチド(CTX)参照範囲:男性、0~854;女性(閉経前)、26~573;女性(閉経後)  
、104~1,008

<sup>d</sup>より低いアガットストンスコアは、より低いレベルの血管石灰化を示す。

30

## 【0523】

重篤な有害事象は、通常は、ソタテルセプトと無関係であるとみなされ、中止をもたらすことではなく、治療の継続で解消した。ソタテルセプト治療群で死亡は報告されなかった。有害事象は、重症度が主に軽度又は中等度であり、治験薬とは無関係で、治療群間で比較的よく似ており、対象の医療歴と概ね一致していた。最初の28日の投与サイクル及び225日の治療期に、家庭血圧測定は、どの治療群の対象の間でもベースラインからの一貫した又は用量依存的な変化を示さなかった。

## 【0524】

ベースラインからの腹部大動脈合計アガットストンスコアの変化を表18に提供する。<15%の腹部大動脈合計アガットストンスコアの進行を有する対象の比率を図22Bに示す。

## 【0525】

表18.腹部大動脈合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアのベースライン及びベースラインからの変化\*

【表18】

	プラセボ (n=4)	ソタテルセプト 0.3 mg/kg (n=6)	ソタテルセプト 0.5 mg/kg (n=5)	ソタテルセプト 0.7 mg/kg (n=6)
腹部大動脈合計 アガットストンスコア				
ベースライン合計 アガットストンスコア	6,498.8	9,472.7	3,618.5	1,862.1
ベースライン合計 アガットストンスコア からの変化	787.8	8,578.9	225.7	171.0
ベースライン合計 アガットストンスコア からの%変化	58.4	29.9	17.3	7.4
平方根変換合計 容積スコア				
ベースライン合計 容積平方根、mm <sup>3</sup>	39.0	46.2	33.1	27.4
ベースライン合計 容積平方根からの 変化、mm <sup>3</sup>	3.4	11.1	1.2	1.3

注: nは、ペアのQCT評価を有する無作為に割り付けられた対象の数を表し;各パラメータに利用可能な対象の実際の数は異なり得る。

\*低い合計アガットストンスコア及び平方根変換合計容積スコアは、低いレベルの血管石灰化を示す。

## 【0526】

さらに、表19は、大腿骨頸部皮質及び平均腰椎骨梁の容積BMD測定値のベースラインからの変化率を提供している。大腿骨頸部皮質BMDの>2%上昇を有する対象の比率を解析し、ソタテルセプトによる治療が大腿骨頸部皮質骨の2%増大を有する対象の比率の増加と関連することが明らかになった(表19及び図22Cを参照されたい)。Mallucheらの文献、2014, Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 9:1254-1262も参照されたい。さらに、高代謝回転RDでは、腰椎骨梁BMDによって測定したとき、一般集団と比較してESKDにおける脊椎骨折率の低下を伴わずに、骨梁量が増大する(Leonard MBの文献、2009, Semin. Nephrol., 29:133-143、及びDuanらの文献、1999, J. Clin. Endocrinol. Metab. 84:718-722を参照されたい)。この状況では、増大した骨梁量は質が悪い(Mallucheらの文献、2012, J. Am. Soc. Nephrol. 23:525-532を参照されたい)。ソタテルセプトによる治療は、腰椎における骨梁量の増大を減速させる(表19)。

## 【0527】

表19. 大腿骨頸部皮質及び平均腰椎(L1、L2)骨梁BMDのベースライン及びベースラインからの変化率

10

20

30

40

【表19】

	プラセボ (n=4)	ソタテルセプト 0.3 mg/kg (n=6)	ソタテルセプト 0.5 mg/kg (n=5)	ソタテルセプト 0.7 mg/kg (n=6)
大腿骨頸部皮質				
ベースライン BMD, mg/cm <sup>3</sup>	640.5	667.0	593.1	594.8
ベースラインBMD からの% 変化(n)	-1.4 (4)	-1.4 (5)	1.6 (5)	-0.1 (4)
平均腰椎(L1、L2) 骨梁				
ベースライン BMD, mg/cm <sup>3</sup>	140.1	125.6	149.1	118.7
ベースラインBMD からの% 変化(n)	10.9 (4)	8.0 (6)	0.5 (5)	4.5 (6)

注: nは、ペアのQCT評価を有する無作為に割り付けられた対象の数を表し;各パラメータに利用可能な対象の実際の数は異なり得る。

10

20

30

## 【0528】

## (9.8.3 結論)

ベースラインバイオマーカーデータに基づくと、本実施例の対象は、高代謝回転RODを有する傾向にあった。高代謝回転RODについて予想されていた通り、プラセボ群は、他の大規模なESKD研究と同様の割合で起こる減少した皮質骨量、増大した骨梁量、及び増大した血管石灰化を有していた(Raggiらの文献、2011, Nephrol. Dial. Transplant. 26:1327-1339)。

## 【0529】

ベースライン時及び225日目(これは、最大8回の28日投与サイクルの後である)に測定されたQCTデータは、ソタテルセプトによる高代謝回転RODの治療が、血管石灰化の進行の減速、大腿骨頸部皮質骨量の増大、及び腰椎骨量の増大の減速を含む、CKD-MBDの多数のパラメータに対する効果をもたらすことを示した。血管石灰化の減少及び骨量の増大は、Id1<sup>-/-</sup>高脂肪食給餌、5/6腎摘出という血管石灰化のマウスモデルにおける組織学的研究結果と一致している(Fangらの文献、2014, Abstract, ASN Kidney Week 2014, November 11-16, 2014, Philadelphia, PA)。

## 【0530】

(9.9 実施例9: ActRIIA-hFc(配列番号7、「ソタテルセプト」)は末期腎疾患の多くの症状に影響を及ぼす)

## (9.9.1 背景)

本実施例は、臨床試験からのデータを示している。実施例7及び8(第9.7節及び第9.8節)は、本研究からのデータも示している。

40

## 【0531】

この現在進行中の無作為化単盲検プラセボ対照試験では、血液透析対象の貧血を改善するためのActRIIA-IgG1融合タンパク質リガンドトラップであるActRIIA-hFc(配列番号7;「ソタテルセプト」)の薬物動態、安全性、及びヘモグロビン効果を評価し、血管石灰化及び骨ミネラル密度に対するその効果を、定量的コンピュータ断層撮影を用いて検討した。本実施例は、0.3、0.5、及び0.7mg/kg用量群についての中間結果を提供する。

## 【0532】

## (9.9.2 方法)

エリスロポエチン刺激剤(ESA)応答性の対象を、ヘモグロビンが<10g/dLになるまで、E

50

SA効果からウォッシュアウトし、8回以下の投与サイクルの間、28日毎に皮下に投与されるプラセボ又はソタテルセプトに無作為に割り付けた。治療失敗(ヘモグロビン < 9g/dL)は、ESA又は輸血で救済し; 対象内用量漸増は認めなかった。股関節、腰椎、及び腹部大動脈の定量的コンピュータ断層撮影スキャンをベースライン時と225日の治療期の後に取得した。報告されているのは、薬物動態、安全性、家庭血圧、ヘモグロビン、血管石灰化、及び骨ミネラル密度効果についての中間結果である。

#### 【 0 5 3 3 】

##### (9.9.3 結果)

プラセボ(n = 9)又は0.3mg/kg(n = 9)、0.5mg/kg(n = 8)、及び0.7mg/kg(n = 9)のソタテルセプトで治療された対象の間で、有害事象は、主に軽度/中等度であり、治験薬とは無関係であり、群間でタイプ/重症度が比較的よく似ており、対象の医療歴と概ね一致していた。2件の死亡がプラセボ群で発生した。家庭血圧の用量依存的な変化はなかった。225日の治療期において、ヘモグロビンは、それぞれ、プラセボ又は0.3、0.5、もしくは0.7mg/kgのソタテルセプトで治療した対象の33%、33%、63%、及び78%において > 10g/dLであった。それぞれ、プラセボ又は0.3、0.5、もしくは0.7mg/kgのソタテルセプトで治療された4人、6人、5人、及び6人の対象で得られたペアの定量的コンピュータ断層撮影は、それぞれ、33%、80%、80%、及び100%における血管石灰化の < 15% 進行、並びに0%、20%、40%、及び75%における大腿骨頸部皮質骨ミネラル密度の > 2% 増大を示した。

10

#### 【 0 5 3 4 】

##### (9.9.4 結論)

20

ソタテルセプトは、家庭血圧が上昇することなく、血液透析における許容できる安全性プロファイルを伴って忍容された。ソタテルセプトに対する用量依存的応答が、ヘモグロビン、血管石灰化、及び骨ミネラル密度において見られた。

#### 【 0 5 3 5 】

##### (9.10 実施例10: CKDにおけるActRIIAシグナル伝達の障害はアテローム性動脈硬化性石灰化及び腎線維化の一因である)

本実施例は、実施例4を含む、本明細書に記載の他の実施例において記載され、かつ実施された実験に関する。

#### 【 0 5 3 6 】

##### (9.10.1 方法)

30

##### (9.10.1.1 動物モデルの作成)

アテローム性動脈硬化症の低密度リポタンパク質受容体欠損(Idlr-/-)雄(C57Bl/6Jバックグラウンド)をJackson Laboratoriesから購入し、高脂肪食(42%のカロリーが脂肪由来)を12週齢から給餌した。マウスは、22週齢で肥満、インスリン耐性となり、28週齢で糖尿病となり、高コレステロール血症となる。

40

#### 【 0 5 3 7 】

2段階の処置を用いて、以前に記載されているように、慢性腎疾患を引き起こした(Davies MRらの文献、J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1559-1567; Davies MRらの文献、J Am Soc Nephrol 2005; 16: 917-928)。出生後12週で、2cmの側腹切開を介して、電気焼灼を右腎臓に適用し、その後、14週齢で左腎全摘出を行った。焼灼の強度を変化させて、中等度(CKD-3)の腎損傷を生じさせ、これを20週齢でのイヌリンクリアランスによって確認した(図33A、B)。対照動物は模擬手術を受けさせた。この手術では、適当な腎臓を露出させて移動させたが、他には何も処置しなかった。5つのマウスの群をこの研究に使用した(図23B)。第1の群は、通常食を給餌される野生型C57Bl/6Jマウス(WT)であった。これは、標準的対照値に使用される正常腎機能及び食餌群であった。第2の群は、高脂肪食を給餌され、模擬手術されるIdlr-/-マウス(模擬)であった。この群は、腎疾患の効果を決定するための対照群としての役割を果たした。第3の群は、ヒトCKDのステージ3(CKD-3)と同等の低下したGFRを有し、高脂肪食を給餌され、22週で安樂死させられる、図25A、B、Cで使用されるベースライン血管石灰化群のIdlr-/-マウス(CKD-3)であった。第4の群は、22週から始めて28週で安樂死させられるまで、週2回、ビヒクル(リン酸緩衝生理食塩水)の皮下注射

50

を受けるCKD-3の $ldlr^{-/-}$ マウス(CKD-3 V)であった。第5の群は、22週から始めて28週で安楽死させられるまで、週2回、10mg/kgのmActRIIA-Fc(Celgene, Summit, NJ)の皮下注射を受けるCKD-3の $ldlr^{-/-}$ マウス(CKD-3 R)であった。使用された用量は、骨形成の刺激のために有効な用量であることがPK/PD研究で以前に示された。

#### 【0538】

使用されたCKDの第2のモデルは、IV型コラーゲンの5鎖の遺伝子、COL4A5の欠損症であるX連鎖アルポート症候群のマウスホモログであった(Rheault MNらの文献、J. Am. Soc. Neph. 2004; 15: 1466-1474)。これは、自然発症腎疾患のモデルである。これを、腎切除誘導性CKDの効果を確認するために、本結果の全体を通じて使用した。交配ペアをJackson Laboratoriesから購入し、実験用に交配させた。ヘミ接合体の雄は、生後150日で、ヒトCKDのステージ3~4に相当する腎疾患を自然発症し、75日齢までに血尿を発症した。

10

#### 【0539】

いずれの場合も、安楽死を麻酔下で行った。腹腔内麻酔(キシラジン13mg/kg及びケタミン87mg/kg)を全ての処置に使用した。伏在静脈血試料を2回目の手術の1週間後に採取して、ベースラインの手術後腎機能を評価した。屠殺時に、血液を心内穿刺で採取し、心臓及び大動脈をひとまとめにして解剖した。

#### 【0540】

##### (9.10.1.2 イヌリンクリアランス)

安楽死が28週で行われる場合、20週又は26週でのイヌリンクリアランスを製造元の指示(BioPal社、Worcester, MA)に従って行った。

20

#### 【0541】

##### (9.10.1.3 化学的石灰化定量)

大動脈を屠殺時に解剖し、全ての無関係な組織を解剖顕微鏡下での鈍的切開によって除去した。組織を60℃で20~24時間乾燥させ、計量し、すり鉢とすりこぎで碎いて粉末にした。カルシウムを、1N HCl中、4℃で24時間溶出させた。溶出液のカルシウム含有量を、製造元の指示に従って、クレゾールフタレンコンプレキソン法(Sigma, St Louis, MO)を用いてアッセイし、結果を乾燥組織重量に対して補正した。

#### 【0542】

##### (9.10.1.4 血液検査)

30

血清を、採血日に、血液尿素窒素(BUN)、カルシウム、及びリン酸塩について、動物施設で実施される標準的な自動解析実験室法によって解析した。血漿アクチビン(Fitzgerald Industries, Acton, MA)、フォリスタチン(MYBIO SOURCE社、San Diego, CA)、及びフォリスタチン様3(MYBIO SOURCE社)のレベルをELISAアッセイで決定した。血清Dkk1レベルをELISA(R&D Systems, Minn., MN)で解析した。Elisaアッセイのために、血液を、安楽死時に、伏在静脈穿刺又は心穿刺によって採取した。血液試料は全て、回収時に氷上に置いた。血小板の少ないEDTA血漿試料を、6000rpmで5分間及び14000rpmで2分間、いずれも4℃での、2段階の遠心分離によって作製した。試料を使用するまで-20℃以下で凍結保存した。

#### 【0543】

##### (9.10.1.5 組織学及び免疫組織化学)

40

大動脈及び腎臓の組織を10%中性緩衝化ホルマリン中で一晩固定し、その後、4℃の70%エタノールに移し、パラフィン中に包埋し、5ミクロン切片を調製した。スライドをキシレン中で脱パラフィン処理し、段階的エタノール系列中で脱水し、その後、再水和した。Masonの三重染色を用いて、腎臓及び心臓の線維化を検出し、Alizarin red染色を用いて、標準的なプロトコルに従って、石灰化を検出した(Gregory CAらの文献、Analytical Biochem. 2004; 329: 77-84)。免疫染色のために、スライドを20%正常ヤギ血清中で20分間ブロッキングし、一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。スライドをPBS中で洗浄し、20%正常ヤギ血清中で20分間ブロッキングした後、ヤギ抗ウサギAlexa 488二次抗体1:400(Life Technologies, A11008)とともに室温で30分間インキュベートするか、又は製造元の指示に従って、シグナル增幅用のTSAキット(Life Technologies, T 20932)を

50

使用した。二重免疫蛍光染色のために、切片を20%ヤギ血清中でプロッキングし、製造元の指示に従って、ヤギ抗ウサギAlexa 488及びAlexa 568二次抗体1:400(Life Technologies, A11008及びA11011)又はシグナル增幅用のTSAキット(Life Technologies, T20932及びT20934)を用いて、第1の一次抗体及び二次抗体並びに第2の一次抗体及び二次抗体で連続的に染色した。同じ種由来の一次抗体を二重染色に使用する場合は、2回目の染色の前に、スライドを、マイクロ波にて、クエン酸バッファー中で5分間加熱した(Toth ZEの文献、J. HistoChem. & CytoChem. 2007; 55: 545-554)。本研究で免疫染色に使用した一次抗体：ウサギポリクローナル抗ActRIIA抗体1:250(Abcam, ab 135634)、ウサギポリクローナル抗インヒビン A抗体1:100(Santa Cruz, sc-50288)、ウサギポリクローナル抗CD31抗体1:50(Abcam, ab28364)、及びウサギポリクローナル抗 -カテニン抗体1:500(Abcam, ab32572)。

10

## 【0544】

## (9.10.1.6 RT-PCR)

RNeasyミニキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて、RNAを大動脈及び腎臓から抽出した。1 μgの全RNAをDNアーゼ処理し、製造元の指示に従って、Bio-Rad(Hercules, Ca)製のiScript cDNA合成キットを用いて、Veriti Termal Cycler(Applied Biosystems)で逆転写した。Vector NTI(Invitrogen, Grand Island, NY)又はPrimer Express(Life Technologies, Grand Island, NY)ソフトウェアを用いて、プライマーを設計した。逆転写の後、StepOne PlusリアルタイムPCR装置(Applied Biosystems)、Sigma製のSYBR Green(St. Louis)、及びInvitrogen製のPCRキットを用いて、リアルタイムを行った。各反応を、3連で、95

20

で45秒及び60 で30秒及び72 で60秒で、40サイクル行った。この後、60 から95 までの段階的な温度上昇からなる融解サイクルを行った。単一の顕著なピークが各遺伝子の解離曲線中に認められ、PCR産物の特異性を裏付けた。Ct数(閾値)をPCRの指數関数期内に設定し、これを用いて、対象となる遺伝子の発現レベルを計算した。B2mを内部標準として使用し、値を正規化した。C<sub>T</sub>と対数cDNA希釈(対数コピー数に対応する)からなる標準曲線を、未知量のアンブリコンに対応するcDNAの連続希釈物を増幅することにより作成した。ゲノムDNAが増幅されないことを保証するために、RT-PCRの前に5分間煮沸して逆転写酵素を不活化することにより、陰性対照実験を行った。

## 【0545】

## (9.10.1.7 免疫プロッティング(ウェスタン解析))

30

全細胞溶解物タンパク質を、プロテアーゼインヒビター-カクテル(Santa Cruz)を含むRIPA溶解バッファー(Thermo Scientific)によって、マウスの腎臓及び大動脈から調製した。溶解物(20 μg)を8-12%SDS-PAGEゲルに充填し、インヒビン -A(Santa Cruz)、 -チューブリン(Santa Cruz)、アクチン- 平滑筋(Sigma)、Runx2(Cell Signaling)、Myocd(Santa Cruz)、ACVRL1(Origene)、ACVR1(Cell Signaling)、Erk1/2(Cell Signaling)、ホスホErk1/2(Cell Signaling)、ACVR1B(Origene)、Col1a1(Santa Cruz)、Smad2/3(Cell Signaling)、又はホスホSmad2/3(Cell Signaling)に対する抗体で免疫プロッティングした。免疫沈降(IP)アッセイでは、同じ全細胞溶解物タンパク質を使用した。非特異的結合を減らすために、試料を、予め洗浄しておいたプロテインAアガロースビーズ(Cell Signaling)を用いて、プレクリーン処理した。プレクリーン処理した試料をホスホセリン抗体(Abcam)とともに一晩インキュベートした。その後、IP-抗体複合体をプロテインAアガロースビーズ上で捕捉し、タンパク質を免疫プロッティング解析によって検出した。

40

## 【0546】

ANOVAを用いて統計解析を行った。別途、図の脚注で指定されない限り、データは全て、平均 ± SDとして表されている。Fisher LSD法を用いて、群間差を事後評価し、p < 0.05で有意とみなした。全ての群のデータは、7~15の「n」を表す。リアルタイムPCR解析のために、最低3つの試料を各実験群で使用した。図26Cの血管石灰化データについて、四角は、中央値及び四分位数範囲(25~75パーセンタイル)を表し、エラーバーは、25パーセンタイル未満及び75パーセンタイル超の四分位数範囲の1.5倍を示す。中央値は、多重比較用のANOVA Holm-Sidak法を用いて比較し、p < 0.05を有意差の臨界値とした。

50

## 【0547】

(9.10.2 結果)

## (9.10.2.1 実験設計及びCKDのモデルにおける腎機能)

高脂肪食給餌 $ldlr/-$ -マウスは、アテローム性動脈硬化性血管石灰化を生じさせるために食餌と遺伝子型の両方を必要とするアテローム性動脈硬化性血管石灰化のモデルである(Davies MRらの文献、J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1559-1567; Towler DAらの文献、J. Biological Chem. 1998; 273: 30427-30434)。腎機能は、腎皮質損傷及び対側性腎摘出によって、ヒトのステージ3のCKD(CKD-3)と同様、 $ldlr/-$ -高脂肪食給餌マウスで低下していた(図33A、B)。CKD-3マウスは高リン血症であり(表20)、ヒトのステージ3b～4のCKDでの高リン血症の発症と一致していた(Isakova Tらの文献、Kidney Int 2011; 79: 1370-1378)。

10

## 【0548】

表20:試験した動物における血清生化学パラメータ

## 【表20】

パラメータ	第1群 野生型	第2群 模擬	第3群 CKD-3 V	第4群 CKD-3 R
マウス系統	C57/BK6	$ldlr/-$	$ldlr/-$	$ldlr/-$
食餌	通常食	高脂肪食	高脂肪食	高脂肪食
手術	なし	模擬	CKD	CKD
出生後の週数	28	28	28	28
処置	なし	なし	ビヒクル	mActRIIA-Fc
N	12	15	14	15
BUN(mg/dl)	24.0 ± 4.6	20.6 ± 3.7	37.7 ± 7.6*	36.5 ± 5.8*
Ca(mg/dl)	8.3 ± 1.8	8.9 ± 0.9	9.4 ± 0.8	8.8 ± 0.3
リン(mg/dl)	8.9 ± 0.2	7.9 ± 2.3	11.0 ± 1.6*	11.8 ± 1.2*

\*: &lt;0.05、第3群及び第4群を第2群と比較した。

20

## 【0549】

## (9.10.2.2 CKDにおけるアクチビン受容体IIA型(ActRIIA)レベル)

CKD-3を有する高脂肪食給餌 $ldlr/-$ -マウス由来の大動脈をTGF スーパーファミリー-II型受容体について解析した。このTGF スーパーファミリー-II型受容体は、II型及びI型(A-LK)受容体から構成されるスーパーファミリー受容体ヘテロ多量体のリガンド結合成分である。アクチビンII型受容体A(ActRIIA)は、大動脈血管平滑筋細胞(VSMC)で発現していた(図24A、B)。 $ldlr/-$ -高脂肪食給餌マウスでもたらされたCKD-3は、大動脈におけるActRIIAの下方調節を誘導した(図24A)。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、これは他の組織で報告された高い循環リガンドレベルによってもたらされたActRIIAの内在化及び分解と一致する(Simone NDらの文献、Endocrinology 1998; 139: 1147-1155; Liu ZHらの文献、J. Endocrinology 2006; 189: 409-421)。内皮細胞ActRIIAは、免疫化学的検出及び免疫蛍光検出によって検出されなかった(図24B)。

30

## 【0550】

## (9.10.2.3 CKDにおけるActRIIAリガンドトラップの血管効果)

40

CKD誘導性のActRIIAレベルの抑制の効果を、ビヒクル又はActRIIAリガンドトラップ(mActRIIA-Fc)で処置したCKD-3マウス由来の大動脈ホモジネートで解析した(図25A、B)。CKD-3刺激性の骨芽細胞転換を、 $ldlr/-$ -高脂肪食給餌マウスの大動脈におけるRunx2及びアルカリホスファターゼ(Alpl)のmRNAの発現によって評価した。CKD-3は、それらの発現を刺激し、mActRIIA-Fc処置は、CKDの効果を無効化した(図25A)。Runx2発現とAlpl発現はどちらも、mActRIIA-Fc処置によって無効化される大動脈における骨芽細胞転換のバイオマーカーを表す。分化した血管平滑筋細胞のバイオマーカーである平滑筋22 又はトランスゲリン(Tagln)(Li L, Mianoらの文献、Circulation Res. 1996; 78: 188-195)の大動脈mRNAは、CKD-3によって減少し、mActRIIA-Fcによって刺激された。CKD-3は、血管平滑筋細胞特異的転写因子である、大動脈ミオカルディン(Myocd) mRNA発現の減少も引き起こしたが

50

、ミオカルディンは、mActRIIA-Fc処置による影響を受けなかった。図25Aで検討されているそれぞれのmRNAの大動脈タンパク質レベルに対するCKD-3及びmActRIIA-Fc処置の効果について、CKDは、大動脈Runx2及びAlp1レベルを増大させ、mActRIIA-Fcはそれらを正常化させた(図25B、Alp1のデータは示さない)。CKDは、Tagln及び分化した血管平滑筋細胞の別のバイオマーカーである 平滑筋アクチン(SMA)の大動脈レベルを減少させ、mActRIIA-Fc処置はそれらを増大させた(図25B、Taglnのデータは示さない)。ミオカルディンレベルは、CKDによっても、mActRIIA-Fc処置によっても変化しなかった。

#### 【 0 5 5 1 】

Idlr-/-高脂肪食給餌マウスは、アテローム性動脈硬化症、アテローム性動脈硬化性石灰化、及び2型糖尿病のモデルである(AI-Aly Zらの文献、Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol. 2007; 27: 2589-2596; Towler DAらの文献、J. Biological Chem. 1998; 273: 30427-30434)。確認されたのは、特に、CKD-3が、CKD-3ビヒクリ処置マウス(CKD-3 V)の大動脈アテロームにおけるカルシウム沈着の蓄積を引き起こし(図26A)、全体の組織カルシウムレベルを増大させた(図26B)ことである。目に見えるカルシウム沈着は、mActRIIA-Fcで処置したCKD-3マウス(CKD-3 mActRIIA-Fc)で存在しなかった。さらに、mActRIIA-Fcは、大動脈組織カルシウム含有量を、野生型及び模擬マウスで認められるレベルと同様のレベル、並びにCKD-3群におけるmActRIIA-Fc処置の開始時点で存在するレベルを顕著に下回るレベルにまで減少させた(図26B)。

#### 【 0 5 5 2 】

##### (9.10.2.4 大動脈におけるActRIIAシグナル伝達)

TGF スーパーファミリーによる標準的なシグナル伝達は、そのセリン/トレオニンキナーゼ活性を活性化し、かつI型受容体であるAIkキナーゼの会合及びリン酸化を刺激する、II型受容体へのリガンド結合を伴う(図34の図表示を参照)。TGF スーパーファミリーによって利用される7つのAIkキナーゼがあり、AIk4(ActRIB)は、ほとんどの場合、ActRIIAシグナル伝達と関連するI型受容体である(Abe Y MTらの文献、2004. Growth Factors(Chur, Switzerland) 2004; 22: 105-110)。ActRIIAレベルは、図24で明らかのように、CKD-3マウスから単離された大動脈ホモジネートでは減少せず、AIk4及びAIk1の組織レベルの減少と関連しなかった(図27A)。ActRIIAシグナル伝達と関連する他のI型受容体であるAIk5及びAIk2は検出できなかった。ActRIIA活性を、受容体ヘテロ多量体化の効果(例えば、調節性Smadのリン酸化)を測定することにより評価した。CKD-3は大動脈ホスホsmad 2/3レベル(活性化smad 2/3)を減少させ、mActRIIA-Fcは、CKD-3Vと比較して、それらを増大させた(図27A、B)。非標準的ActRIIAシグナル伝達(図34)も解析した:(1)mapキナーゼ(ホスホErk1/2)は、CKDによって減少するが、mActRIIA-Fcによってさらに影響を受けることはなく(図27A)、(2)p38及びJNKの血管平滑筋レベルは非常に低かった。また、mActRIIA-Fc p-AK Tレベルは影響を受けないままであり、大動脈AKT/PI3キナーゼがActRIIAシグナル伝達による影響を受けなかったことを示している。大動脈ActRIIAシグナル伝達(ホスホsmad 3)はCKDによって減少し、ActRIIAリガンドトラップによるアテローム性動脈硬化性大動脈での骨芽細胞転換の抑制と関連するActRIIAリガンドトラップによって刺激された(図25A、B、C)。

#### 【 0 5 5 3 】

別の非標準的ActRIIAシグナル伝達経路であるWnt経路を調べた(図34)。Wntシグナル伝達は、大動脈内皮とVSMCで示差的に調節されるようであった。主要な標準的Wnt誘導性転写因子である、大動脈 - カテニンは、免疫蛍光によって内皮細胞に局在化し、VSMCでは検出できなかった(図28A、B)。Dkk1レベルを、Wnt活性のバイオマーカーとして、VSMCで解析した。CKDはVSMC Dkk1レベルを増大させ、mActRIIA-Fc処置は、CKD-3マウスでDkk1レベルを減少させた(図28D)。mActRIIA-Fcによる大動脈Dkk1レベルの減少は、血管平滑筋Wntシグナル伝達がActRIIAリガンドトラップによって阻害されたことを示している。さらに、以下に示されるような腎臓Wnt活性を減少させるActRIIAリガンドトラップの効果は、循環Dkk1レベルの大きな減少をもたらす(図28E)。全身性Dkk1の減少は、内皮に影響を及ぼす可能性が高かった。これは、内皮におけるWntシグナル伝達の増大をもたらした。内皮

10

20

30

40

50

では、 $\beta$ -カテニンが、示されているように、大動脈Axin2レベルの増大によって発現される(図28C)。Axin2は、 $\beta$ -カテニンによって刺激され、Wntシグナル伝達の評価に使用されることが多い最初期遺伝子である(Mao J、Wang J、Liu Bらの文献、Mol. Cell 2001; 7: 801-809)。

#### 【0554】

(9.10.2.5 klotho及び腎臓ActRIIAシグナル伝達に対するActRIIAリガンドトラップの効果)

腎臓 klothoレベル並びにCKD-3及びmActRIIA-Fc処置の効果を調べた。図29Aに示すように、腎臓 klothoレベルの有意な増大がmActRIIA-Fc処置によって誘導された。腎臓ActRIIAレベル及びActRIIAシグナル伝達を調べた。腎臓ActRIIAレベルは、CKD-3による影響を受けなかった(図29B)。主なActRIIAリガンドであるアクチビンAは、CKD-3マウスで強く誘導され、mActRIIA-Fc処置によって抑制された(図31A～D)。利用可能なホスホAIk抗体がないために、I型受容体活性化の検出が妨げられ、代わりに、ホスホセリン抗体が免疫沈降のために必要になった。沈降物の免疫プロットを抗AIk抗体を用いて行った。AIk4リン酸化は、CKD-3モデルの罹患腎臓でも、mActRIIA-Fc処置によっても、顕著には変化しなかった(図29B)。しかしながら、腎臓ホスホsmad 2/3はCKD-3によって増大し、mActRIIA-Fcによって減少し、ActRIIAによって媒介されるCKDにおける腎臓Smad 2/3活性化の成分には、AIk4とは異なるAIkが関与することを示した(図29C)。

10

#### 【0555】

ActRIIAリガンドトラップの効果を腎線維化に対して調べた。図30A～Dは、CKD-3V処置マウス(図30A及び図30B)と比較したときの、CKD-3 mActRIIA-Fc処置マウス(図30C及び図30D)由来の三重染色された腎臓皮質切片における腎線維化の減少を示している。図35A～Dは、図30A～Dの高倍率切片を取得した場所を特定する矢印及び瘢痕反応を電気焼灼腎臓損傷から線引きする矢尻とともに低倍率の冠状腎臓切片を示している。mActRIIA-Fcは、創傷治癒におけるアクチビンの役割と一致して、瘢痕反応を減少させた。さらに、mActRIIA-Fcは、mActRIIA-Fc処置によって誘導される腎臓ホスホsmad 2/3及び線維化の減少と一致して、CKD-3によって刺激されるタンパク尿を減少させた(図30E)。

20

#### 【0556】

(9.10.2.6 CKDにおける潜在的ActRIIAリガンド)

多数の潜在的ActRIIAリガンドが存在し、これには、アクチビンA及びB、成長及び分化因子11(GDF11)、骨形成タンパク質9及び10(BMP9及び10)、並びに該受容体に対するより低い親和性を有する他のBMP、例えば、BMP7が含まれる。しかし、主なActRIIAリガンドは、アクチビンである。CKDの2つのモデルを用いて、全身循環アクチビンAレベルがIdlr-/−切除性CKDモデルで10倍上昇し、Col4A5アルポート症候群マウスモデルで5倍上昇することが確認された(図31A、B)。アクチビンB、GDF11、及びBMP9レベルは、これらのモデルでCKDによる影響を受けなかった。生理学的には、循環中の遊離アクチビンは少量であると考えられている。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、これは、インヒビターのレベルがアクチビンレベルと化学量論的に等しいためであり得る。アクチビンは、循環阻害因子であるフォリスタチン及びフォリスタチン様3(fstL3)(Welt Cらの文献、Experimental Biol. and Med. 2002; 227: 724-752)並びにインヒビンと会合するが、これらの循環レベル(図36A、B)及び組織レベルは、CKD-3によって影響を受けることも、減少することもなかった。循環中のアクチビンAレベル(> 5000pg/ml)に対するフォリスタチン、fstL3、及びインヒビン(620pg/ml + 400pg/ml)の未測定のインヒビンの合計(Sharpe RMらの文献、J. Andrology 1999; 20: 94-101))の化学量論的組成は、CKDが、アクチビンAをCKDにおける活性循環因子にする病理学的事象である顕著な遊離アクチビンレベルを生じさせることを示唆している。このデータは、腎疾患が血管ActRIIAを下方調節し得る1以上の循環ActRIIAリガンドを生じさせることを示している。

30

40

#### 【0557】

増大した循環アクチビンの起源を特定するために、アクチビンA(インヒビン A(Inhba)のホモ二量体)のIdlr-/−アテローム性動脈硬化性石灰化モデル由来の腎臓組織を解析した

50

。Inhba mRNAがCKDによって腎臓で増大しており(図31C)、アクチビン(インヒビン-A)タンパク質レベルが増大していた(図31D)。腎臓アクチビン発現がCKD-3マウスの尿細管周囲筋線維芽細胞に局在化していた(図32A、B)。

#### 【0558】

##### (9.10.3 結論)

本実施例は、mActRIIA-Fcがリン酸化Smad2/3のレベルによって評価される大動脈ActRIIAシグナル伝達を増大させたことを示している。さらに、mActRIIA-Rc処置は、CKD誘導性の血管平滑筋脱分化、骨芽細胞転換、及び新生内膜プラーク石灰化を無効化した。罹患腎において、mActRIIA-Fcは、ActRIIAシグナル伝達を刺激するのではなく、阻害し、腎線維化及びタンパク尿を減少させた。mActRIIA-Fc処置は、腎臓及び循環Dkk1レベルを減少させ、Wnt活性化がActRIIAの下流であることを示した。本実施例は、CKDにおけるActRIIAシグナル伝達の障害がCKD-MBD及び腎線維化の一因であり、ActRIIAシグナル伝達をCKDにおける治療標的として特定することを示し、かつアクチビンリガンドトラップ(例えば、mActRIIA-Fc)をCKDの治療に利用することができるることを示している。10

#### 【0559】

##### (10.配列の説明)

表21:配列情報

【表21】

配列番号	説明	配列
1	ヒトActRIIA前駆 ポリペプチド	MGAAAKLAFAVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNA NWEKDRTNQTGVEPCYGDKDCKRRHCFATWKNIS GSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYF CCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPY YNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAAYPP VLVPQTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVVKARGRG VWKAQOLLNEYVAVKIFPIQDKQSQNEYEVYSLP GMKHENILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKG SLSDFLKANVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG LALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPV DEYMLPFEEEIQQHPSLEDMQEVVVHKKRPVLR DYWQKHAGMAML CETIEECWDHDAEARLSAGC VGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPK ESSL
2	ヒトActRIIAの可溶性(細胞外) のプロセシングされた ポリペプチド配列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPP
3	C末端の15アミノ酸が欠失した 、ヒトActRIIAの可溶性(細胞 外)のプロセシングされた ポリペプチド配列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM
4	ヒトActRIIA前駆タンパク質を コードする核酸配列	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTGCCGTC TTTCTTATCTCCTGTTCTCAGGTGCTATACTTG GTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTCTTA ATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAA ACTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGAT AAACGGCGGCATTGTTTGCTACCTGGAAGAAT ATTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGT TGTGCGCTGGATGATCAACTGCTATGACAGG ACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGA AGTATATTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTG TAATGAAAAGTTTCTTATTTCCAGAGATGGA

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>AGTCACACAGCCCACCTCAAATCCAGITACACC  TAAGCCACCCATTACAACATCCTGCTCTATTCC  TTGGTGCACCTATGTTAATTGCGGGGATTGTC  ATTGTGCATTGGGTGTACAGGCATCACAAG  ATGGCCTACCCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAA  GACCCAGGACCACCCCCCACCTCTCCATTACTA  GGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAA  GCAAGGGGAAGATTGGTTGTGTCTGGAAAGCC  CAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATA  TTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAAT  GAATACGAAGTCTACAGTTGCCTGGAAATGAAG  CATGAGAACATATTACAGTTGCATTGGTGCAGAA  AAACGAGGCACCACTGTTGATGTGGATCTTGG  CTGATCACAGCATTGATGAAAAGGGTTCACTA  TCAGACTTCTTAAGGCTAATGTGGCTCTTGG  AATGAACTGTGTCAATTGCAGAAACCATGGCT  AGAGGATTGGCATATTACATGAGGATATAACCT  GGCCTAAAAGATGCCACAAACCTGCCATATCT  CACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTT  AAAAAAACAACCTGACAGCTGCTGACTT  TGGGTTGGCCTTAAAATTGAGGCTGGCAAGTC  TGCAGGCGATAACCCATGGACAGGTTGGTACCCG  GAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTG  CTATAAAACTTCGAAAGGGATGCATTGGAGGA  TAGATATGTATGCCATGGATTAGTCTATGGG  AACTGGCTTCGCTGACTGCTGCAGATGGAC  CTGTAGATGAATACATGTTGCCATTGAGGAGG  AAATTGGCCAGCATCCATCTTGAAGACATGC  AGGAAGTTGGTGTGCATAAAAAAAAGAGGCCT  GTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGA  ATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGT  TGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT  GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCA  GAGACTAACAAATATTATTACCCACAGAGGACAT  TGTAAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGA  CTTICCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA</p>
5	ヒトActRIIA可溶性(細胞外)ポリペプチドをコードする核酸配列	<p>ATACTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTT  TTCTTTAATGCTAATTGGAAAAAGACAGAAC  AATCAAACGGTGTGAACCGTGTATGGTGAC  AAAGATAAACGGCGGCATTGTTTGCTACCTGG  AAGAATATTCTGGTCCATTGAAATAGTGAAA  CAAGGGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTAT  GACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAGACAG  CCCTGAAGTATATTTGTTGCTGTGAGGGCAA</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		TATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTCCAGAG ATGGAAGTCACACAGCCCACCTCAAATCCAGTT ACACCTAACGCCACCC
6	Feドメインに融合したActRIIAの可溶性細胞外ドメインを含む融合タンパク質	THTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDX1VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK X2VSNKALPVPIEKTISSAKGQPREPQVTLPSSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGVFS CSVMHEALHNX3HYTQKSLSSLSPGK* (wherein X1 is D or A; X2 is K or A and X3 is N or A)
7	ヒトFeドメインに融合した ヒトActRIIAの細胞外ドメイン	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPKPTGGTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISSAKGQ PREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGVFSCSVMEALHNHYTQKSLSSL PGK
8	ミツバチメリチン(HBML)の リーダー配列	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
9	組織プラスミノーゲン活性化 因子(TPA)のリーダー配列	MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSP
10	天然ActRIIAリーダー	MGAAAKLAFAVFLISCSSGA
11	ActRIIA-hFc及び mActRIIA-FcのN末端配列	ILGRSETQE
12	ActRIIAの細胞外ドメインC 末端15アミノ酸の欠失を 有するActRIIA-Fcタンパク質	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTG GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPVPIEKTISSAKGQPREPQVTLPSSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
13	TPAリーダー配列を有する プロセシングされていない ActRIIA-hFc	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQE CLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRCFA TWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKD SPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPV TPKPPTGGGTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPVPIKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	TPAリーダー配列を有する プロセシングされていない ActRIIA-hFcをコードする 核酸配列	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGGAGCAGTCTCGTTGCC GGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAG GAGTGTCTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG ACAGAACCAATCAAACGGTGTGAACCGTGT ATGGTGACAAGATAAACGGCGCATGGTTTG CTACCTGGAAGAATATTCTGGTCCATTGAAT AGTAAAACAAGGTTGGCTGGATGATATCAA CTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAA AGACAGCCCTGAAGTATATTCTGGCTGTGA GGGCAATATGTGAATGAAAAGTTCTTATT TCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACITCAA TCCAGTTACACCTAACGCCACCCACCAGGTGG AACTCACACATGCCACCGTCCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCC CCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGG CAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCC CCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATG GGCAAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCT CCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCT ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGAAACGTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAA

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGAATT
15	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の4アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~130)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFN CYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP
16	ヒトActRIIB前駆タンパク質配列(A64)	MTAPWVALALLW GSLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP APT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFW MYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV WKAQLMNDVAVKIFPLQDKQS WQS EEIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKS KNVLLKSDLTAVLA GLAVRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLW ELVS RCKAADGPV DEYMLPFEEEIGQHPSLEELQE VVVVHKKMRPTIKD HWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGC VE ERVSLIRR SVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPP KES SI
17	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号16のアミノ酸19~134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLH CYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGP EVTYEPPP TAPT
18	C末端の15アミノ酸が欠失した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号16のアミノ酸19~119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLH CYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
19	ヒトActRIIB(A64)前駆タンパク質をコードする核酸配列	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTGCCCTC TGGGGATCGCTGTGGCCGGCTGGCGTG GAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>CGCCAACCTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGA      GCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGAC      AAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTCTGGCCAAC      AGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAAGGG      CTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAG      GCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCC      AGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCT      GCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTG      GGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCC      ACAGCCCCCACCCCTGCTCACGGTGCTGGCCTAC      TCACTGCTGCCATCGGGGGCCTTCCCTCATC      GTCCTGCTGGCTTTGGATGTACCGGCATCGC      AAGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAG      GACCCCTGGGCTCCACCACCATCCCCCTGGTG      GGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAA      GGCTGGGGGGCGTTGGCTGTGTCTGGAAGGC      CCAGCTCATGAATGACTTGTAGCTGTCAAGAT      CTTCCCACCTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG      TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAA      GCACGAGAACCTGCTACAGTTCAATTGCTGCCGA      GAAGCGAGGCTCCAACCTCGAACAGTAGAGCTGT      GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCC      TCACGGATTACCTCAAGGGAACATCATCACAT      GGAACGAACTGTGTATGTAGCAGAGACGATG      TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTG      CCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCACAAGCCGTCT      ATTGCCACAGGGACTTAAAAGTAAGAATGTA      TTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCT      GACTTGGCTGGCTTTCGATTGAGCCAGGG      AACCTCCAGGGACACCCACGGACAGGTAGG      CACGAGACGGTACATGGCTCTGAGGTGCTCGA      GGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCTTCT      GCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGTGT      GTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGA      CGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTGA      GGAAGAGATTGCCAGCACCCTTCGTTGGAGG      AGCTGCAGGAGGTGGTGGTGACAAGAAGATG      AGGCCACCATTAAGATCACTGGTTGAAACAC      CCGGGCCTGGCCCAGCTTGTGTGACCACATCGAG      GAGTGCTGGACCACATGATGCAGAGGCTCGCTG      TCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTG      ATTCCGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCGGAC      TGTCTCGTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATG      TGGACCTGCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
20	Feドメインに融合した、ActRIIB(A64;配列番号17)の可溶性細胞外ドメインを含む融合タンパク質	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
21	Feドメインに融合した、C末端の15アミノ酸が欠失したActRIIB(A64)の可溶性細胞外ドメイン(配列番号18)を含む融合タンパク質	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN A KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の5アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~129)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPP
23	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPT

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
24	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25～131)、L79D突然変異を有し、TPAリーダー配列を有する、プロセシングされていないActRIIB-Fc融合タンパク質	MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
25	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25～131)、L79D突然変異を有する、プロセシングされたActRIIB-Fc融合タンパク質	ETRECIIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20～134)	GRGEAETRECIIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTVYEPPPTAPT
27	C末端の15アミノ酸が欠失した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20～119)	GRGEAETRECIIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA A
28	ヒトActRIIB前駆タンパク質配列(R64)	MTAPWVALALLW GSLWPGSGRGEAETRECIIYYN ANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHKPPYGH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV WKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADEF GLAVRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		DEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVERVSLIRRNVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESI
29	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号28のアミノ酸19~134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT
30	C末端の15アミノ酸が欠失した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号28のアミノ酸19~119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT
31	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号28のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT
32	C末端の15アミノ酸が欠失した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号28のアミノ酸20~119)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTA
33	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号16のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGWCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT
34	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号16のアミノ酸25~131)、	MDAMKRGCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGWCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGGTHTCPPCPAPEELLGGPSVLFPPPKDTLMISRTPE

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	L79D突然変異を有し、TPAリーダー配列を有する、プロセシングされていないActRIIB-Fc融合タンパク質	VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
35	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号16のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、プロセシングされたActRIIB-Fc融合タンパク質	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPTGGGTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
36	L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列(配列番号28のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPPTAPT
37	L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPPTAPT
38	L79D突然変異を有し、GGGリンカーを有するFcドメインに融合した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列(配列番号28のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPEELLGGPSV FLFPPPKDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
39	L79D突然変異を有し、Fcドメインに融合した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列(配列番号16	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPEELLGGPSV FLFPPPKDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	のアミノ酸20~134)	NWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
40	L79D突然変異を有し、 Fcドメインに融合し、 TPAリーダー配列を有する、 ヒトActRIIBの可溶性(細胞外) のプロセシングされた ポリペプチド配列(配列番号28 のアミノ酸20~134)	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
41	L79D突然変異を有し、 Fcドメインに融合し、 TPAリーダー配列を有する、 ヒトActRIIBの可溶性(細胞外) のプロセシングされた ポリペプチド配列(配列番号16 のアミノ酸20~134)	MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
42	変異体C末端配列(WO2007/ 053775号に開示されている)を 有する、ヒトActRIIBの可溶性 (細胞外)のプロセシングされた ポリペプチド配列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAGDQGSGALWLCL EGPAHE
43	変異体C末端配列(WO2007/ 053775号に開示されている)を 有し、L79D突然変異を有する、 ヒトActRIIBの可溶性(細胞外) のプロセシングされた ポリペプチド配列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAGDQGSGALWLCL EGPAHE
44	変異体C末端配列(WO2007/ 053775号に開示されている)を 有し、L79D突然変異を有し、	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	TGGG リンカーを有する Fc ドメインに融合した、 ヒト ActRIIB の可溶性(細胞外) のプロセシングされた ポリペプチド配列	GPEGPWASTTIPS GGPEATAAAGDQGSGALWLCL EGPAHETGGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
45	配列番号24をコードする 核酸配列	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTCGCCC GGCCGCCGCCAAACCCCGAATGTATTATTAC AATGCTAATTGGGAACTCGAACGGACGAACCA ATCCGGGCTCGAACCGGTGTGAGGGGGAACAGG ATAAACGCCTCCATTGCTATGCGTCGTGGAGGA ACTCCTCCGGGACGATTGAAC TGGTCAAGAAAG GGTGCTGGGACGACGATTCAATTGTTATGACC GCCAGGAATGTGT CGCGACCGAAGAGAACCG CAGGTCTATTCTGTITGCGAGGGAAATTCT GTAATGAACGGTTACCCACCTCCCCGAAGCCG GCGGGCCCGAGGTGACCTATGAACCCCCGCC ACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCAACCGTGC CCAGCACCTGAAC TCTGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGAAC CCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTA CAC CCTGCCCATCCCAGGGAGGAGATGACCA AGAAC CAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAAACTACAAG ACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTATAGCAAGCTACCGTGGACAAG AGCAAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCCCTGTCCCCGGTAAA TGA
46	Fc ドメインに融合した、 ActRIIB(R64;配列番号29)の	SGRGEAETRECIYYNANWE LERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWLDDFN CY

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	可溶性細胞外ドメインを含む融合タンパク質	DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTVYEPPTAPGGGTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIASKAG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
47	Fc ドメインに融合した、C末端の15アミノ酸が欠失したActRIIB(R64)の可溶性細胞外ドメイン(配列番号30)を含む融合タンパク質	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTIASKAGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	Runx2 qRT-PCRプライマー1	CCGCACGACAACCGCACCAT
49	Runx2 qRT-PCRプライマー2	CGCTCCGGCCCACAAATCTC
50	Alp qRT-PCRプライマー1	ACGTGGCTAACGAAATGTCATC
51	Alp qRT-PCRプライマー2	CTGGTAGGCGATGTCCTTA
52	osterix qRT-PCRプライマー1	TAGTGGTTGGGTTTGTACCGC
53	osterix qRT-PCRプライマー2	AACCAAATAACTCTTATTCCCTAACGT
54	Klotho qRT-PCRプライマー1	GCTCTCAAAGCCCACATACTG
55	Klotho qRT-PCRプライマー1	GCAGCATAACGATAGAGGCC
56	Sm22- $\alpha$ qRT-PCR プライマー1	GTTCCAGACTGTTGACCTCTT
57	Sm22- $\alpha$ qRT-PCR プライマー2	CTGCGCTTCCTTCATAAACCC
58	ヒトRunx2 mRNA	GTGTGAATGCTTCATTGCCTCACAAACAACCA CAGAACCAAGTGCAGGTGCAAACCTTCTCCAG GAGGACAGCAAGAAGTCTCTGGTTAAATGG TTAATCTCCGCAGGTCACTACCAGCCACCGAGA CCAACAGAGTCATTAAGGCTGCAAGCAGTATT TACAACAGAGGGTACAAGTCTATCTGAAAAAA AAAAGGAGGGACTATGGCATCAAACAGCCTCT TCAGCACAGTGACACCAGTCAGCAAAACTCT TTTGGGATCCGAGCACCAGCCGGCGCTTCAGCC CCCCCTCCAGCAGCAGCCTGCAGCCCCGGCAAAATGA GCGACGTGAGCCCCGGTGGTGGCTGCGCAACAG

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>CAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAACACAGCAGCA      GCAGCAGCAGCAACACAGCAGCAGCAGCAGCAGG      AGGCAGGGCGGCGGCGGCTGCAGCAGCAGCAGCAGG      GCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGG      CGGCCGCCCCACGACAACCGACCATGGTGA      GATCATCGCCGACCACCCGGCGAACCTCGTCCG      CACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCGGTGCT      GCCCTCGCACTGGCGTGCAACAAGACCCCTGCC      CGTGCCTCAAGGTGGTAGCCCTGGAGAGG      ACCAGATGGGACTGTGGTTACTGTATGGCGGG      TAACGATGAAAATTATTCTGCTGAGCTCCGGAA      TGCCTCTGCTGTTATGAAAAACCAAGTAGCAAG      GTTCAACGATCTGAGATTGTGGGCCGGAGTGG      ACGAGGCAAGAGTTCACCTTGACCATAACCGT      CTTCACAAATCCTCCCCAAGTAGCTACCTATCA      CAGAGCAATTAAAGTTACAGTAGATGGACCTCG      GGAACCCAGAAGGCACAGACAGAACAGCTTGATG      ACTCTAACCTAGTTGTTCTGACCGCCTCAG      TGATTAGGGCGCATTCTCATCCCAGTATGAG      AGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTC      CCTGAACTCTGCACCAAGTCCTTTAATCCACA      AGGACAGAGTCAGATTACAGACCCAGGCAGG      CACAGTCTCCCCGCGTGGTCTATGACCAAGT      CTTACCCCTCTACCTGAGCCAGATGACGTCCC      CGTCCATCCACTCTACCACCCGCTGTCTCCAC      ACGGGGCACTGGGCTTCCGCCATCACCGATGT      GCCTAGGCGCATTTCAGATGATGACACTGCCAC      CTCTGACTTCTGCCTCTGGCCTCCACTCTCAGT      AAGAAGAGCCAGGCAGGTGCTTCAGAACCTGGG      CCCTTTTCAGACCCAGGCAGTCCCAAGCAT      TTCATCCCTCACTGAGAGGCCCTCTCCAACCC      ACGAATGCACATCCAGCCACCTTACTTACAC      CCCGCCAGTCACCTCAGGCATGTCCTCGGTAT      GTCCGCCACCACTCACTACCACACCTACCTGCC      ACCACCCCTACCCGGCTCTCCCAAAGCCAGAG      TGGACCCCTCCAGACCAGCAGCACTCCATATCT      CTACTATGGCACTTCGTCAAGGATCCTATCAGTT      CCCATGGTGCCGGGGGAGACCGGTCTCCCTCC      AGAATGCTCCGCCATGCACCAACACCTCGAAT      GGCAGCACGCTATTAAATCCAAATTGCTAAC      CAGAATGATGGTGTGACGCTGATGGAAGGCCAC      AGCAGTTCCCAACTGTTGAATTCTAGTGGC      AGAATGGATGAATCTGTTGGCGACCACATTGA      AATTCCCTCAGCAGTGGCCCAGTGGTATCTGGGG      GCCACATCCACACGTATCAATATACATATA   </p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>TAGAGAGAGTGCATATATATGTATATCGATTAG      CTATCTACAAAGTGCCTATTITAGAAGATTTC      TCATTCACTCACTCAGTCATGATCTGCAGCCAT      AAGAGGGTAGATATTGAGAACGAGAAGGCTCA      AGAGAGACAATTGCAATCGAGCTTCAGATTGTT      TACTATTAAGATGTACTTTACAAAGGAACAA      AGAAGGGAAAAGGTATTITGTTTGTGTT      GGTCTGTTATCATCAATAACCTGTTCATATGCC      AATTCAAGAGAGGTGGACTCCAGGTTAGGAGG      GAGAAGAGCAAAGCCGCTCCTCTGTGCTTT      GAAACTTCACACCCCTCACGGTGGCAGCTGTGTA      TGGACCAGTGCCCTCCGCAGACAGCTCACAAAAA      CCAGTTGAGGTGCACTAAAGGGACATGAGGTA      GAATGGATGCTTCCATCACAGTACCATCATTCA      GAATAACTCTCCAATTCTGCTTCAGACATGC      TGCAAGGTCTCATCTGAACGTGTTGGGTTGTTT      TTTTTTTTTTCTGCTCAAGAAAGTGACTT      CAAAAATAACTGATCAGGATAGATTATTTATT      TTACTTTTAACACTCCTCTCCCCTTCCACT      GAACCAAAAAGAAATCCCATCCCTAAAACCTG      CCTCTCCTTTATGCAAAACTGAAAATGGCAA      TACATTATTATAGCCATAATGGTATAAGATAGTG      ATTGCGTTGGCTATGTGTTGTTCTTTTTTT      AAATTATGAATATGTGAAAATCTGAGGTAAC      TGCTAACGTGAATGGTCATATAACTTAAAGAT      ATATTATATAATTATTAATGACATTGGACCCTT      GAAACATTCTTAGTGTATTGATAATGTTGACTTC      GGTCTCTAAAGTGCTTTATTAAATAACAAA      TTTCTCAGTGGCTAGAGCCATATCTGAAATA      TTGCTAAGCAATTCACTTCATCCAGGCACAAAT      GTGATTAAAAAAACTTCCATCTCCAAATAT      TTTAGATATAGATTGTTTTGTGATGTATGAAG      GAAATGTTATGTTAGTTCTTCAGATCTTGAA      TGCCCTAAACACAGCTTGCCTCTAAAGCGGT      AATTAGGGATTAAAAACACCTTGTGGCTT      TATCAGCATGAAATGCTGGAGTGTGTT      CTAATTCTTGGGTAATTATGACTCTTGTCT      ATTAAAAAGACAAGCACAAGTAAATCATTGAA      CTACAGAAAAATGTTCTGTGGTTCTAGTTAA      GCAAAACTCTAAATGCCAGGCTCATAGCAAA      GACATAGTCAGCTAAAGCCGCACATGTGGAT      AGAGGGTCAATTATGAGACACCTAGTACAGG      AGAGCAAAATTGCAACCAGAGATTCTAACCAAC      CAGCCTTACCAAACAACACAACAGGGGAACCC      CAATCTGCCTTACCCAAGGCCCCACTGGCAGCT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>TTCCACAGAATTGCATTTAGAGGAGCAGAACATG      ACATCACTGTCTTGGGAGTAGGTCTCTGAA      AAGGCAGCAGGTTCCAGCAGGTAGCTGAGCTG      AGAGGACATATGGCCCACGGGGACCTACAGAC      AGCCTTGACATTGTATTCTTACAATGGAGG      GCCAAGGAGGGCAAGGGGCTGTGGAGTTGGT      GTCTACTAGTGTGTATGAATTGAGCTAGAGTC      CTTCTGTGGCATGCACITTGACCACTCCTGGCA      GTCACATGGCAGATTCCAAGTGCAAATCCTTA      ATCCAAACAAGGATCATCTAATGACACCACAG      GCCAATCCCTGCTCTCCTCCCCGAAAAGTCAGG      GTCCCTTCATTGAAATCCTCCACCCACCCAAAGC      AGAATTAGCAGAGATTGCCTTCAAACCCCTAA      CGGCCCCCTGTTCTGGTCTTCTCAAACCCA      CCTTGAGGCCACCCAGCATTGCAGGACAGCG      TGTGGGGCAGCTGGACCTGTGCTTCTGCCTGG      GAGTCTCCCTTGAATTCTACTCCTGACTCCTTCTA      ATAAAAATGGATGGAAAGCAAAACATTG      CTTCTAAAGGCCGTATACCAAGTATGCTTAGAT      AAATAAGCCACTTTCTATTACTTAAGTAAGAA      GGAAGTAGTAATTGATACTATTATTGTTGTGT      GTGGTAGCTTGAAGCACACCACTGTCCATTAT      TTGTAAGTGTAAAATATGTGTGTTGTTCAAGC      AGCACTAAAAAGCCAGTGTCTGGTACACAT      TTCAATTAAATTAAATTGACATAAAATGCTAC      CGCCAGTGCAGCTGCATCCTATTAAATTAAAA      AGGTACTATTTGTACATTATTAAATTGTTA      AAAGGGCTTTTAAGTTACAGTACACACATACC      GAGTGACTTTAGGGATGCTTTGTGTTGAAATG      TTACTATAGTGGCTGCAGGCAGCAACCCAGAAA      CACTTTAGAAGCTTTTCTGGGAAAAATTCA      AAGCACTCTCCCTCCACCCCTCACTCCAACCA      CCCCAATGGGGTAATTACATTTCTAGAACAA      AATTCTGCCCTTTTGGTCTAGGGATTAAAATT      TTGTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTACT      GAACCCCTAATTGCACTGGGTCTGTGTTGA      TTGTTGATTCAAGACCAAAAGCAAAGTCCTACT      ACTACTGTGGAACCATGTACTAGTCTGGGAA      TTAAAATAGCGTGGTCTCTTGTAGCACAAAC      ATTGCTGGAATTGCACTGCTTCAATGCAGCC      ACATTCTTATCCATTGCACTGCTCACAATT      TAACCCATATCAGAGTTCCAGAACAGGTAC      AGCTTGGTTAGATTAGTGAATAACATICA      GCCCAGAACTGAGAAACTCAACAGATTAAC      CGTTGCTCTTAGACGGTCTCACTGCCTCTCAC</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		TTGCCAGAGCCCTTCAAAATGAGCAGAGAAGT CCACACCATTAGGGACCACATCTGTGATAAATTCA GAAGGGAGGAGATGTGTGTACAGCTTAAGGA TTCCCTCAATTCCGAGGAAAGGGACTGGCCCAG AATCCAGGTTAACATACATGGAAACACGAAGCATT AGCAAAAGTAATAATTACCTATGGTATTGTA AAGAACAAATAATAAAAAGACACTTCTTCAAACC TTGAATTITGTGTTTTAGAAAACGAATGCATT AAAAATATTCTATGTGAGAATTTTAGATGT GTGTTTACTTCATGTTACAATAACTGTTGCT TTTAATGCAGTACTTGAAATATATCAGCCAA AACCATAACTTACAATAATTCTTAGGTATTCT GAATAAAATTCCATTCTTTGGATATGCTTAC CATTCTTAGGTTCTGTGGAACAAAAATATTG TAGCATTGTGTAATACAGCTTCATTGTTA TTTTTCCAATTGCTATTGCCAAGAATTGCTT CCATGCACATATTGTAAAAATTCCGCTTGTG CACAGGTATGATTGTGGATGAGTTACTCTTA ACTTCAAAGGGACTATTGTATTGTATGTTGCA ACTGTAAATTGAATTATTGGCATTCTCATG ATTGTAATATTAAATTGAAGTTGAATTAAATT TCAATAAAATGGCTTTGGTTTGT <span style="float: right;">10</span>
59	ヒトAlp mRNA	CGGGCCTCACTCGGGCCCCCGCGCCGCTT TAAGGCGGGGGGGTGGTGGCCCGGGCGCGT TGCCTCCCCTCACTCCCGCGCCGCTATCCTGG CTCCGTGCTCCCACCGCGCTTGTGCCTGGACGGA CCCTCGCCAGTGCTCTGCGCAGGATTGGAACAT CAGTTAACATCTGACCACTGCCAGGCCACCCCC TCCCACCCACGTGATTGCATCTCTGGGCTCCA GGGATAAAAGCAGGTCTGGGTGCACCATGATT TCACCATTCTTAGTACTGGCATTGGCACCTGC CTTACTAACTCCTTAGTGCCAGAGAAAGAGAAA GACCCCAAGTACTGGCGAGACCAAGCGCAAGA GACACTGAAATATGCCCTGGAGCTTCAGAAAGCT CAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTT CCTGGGAGATGGGATGGGTGTCTCCACAGTGAC GGCTGCCGCATCCTCAAGGGTCAGCTCCACCA CAACCCTGGGAGGAGACCAAGGCTGGAGATGG ACAAGTTCCCCTTCGTGGCCCTCTCCAAGACGT ACAACACCAATGCCAGGTCCCTGACAGCGCC GGCACCGCCACCGCCTACCTGTGTGGGGTGAAG GCCAATGAGGGCACCGTGGGTAAAGCGCAGC CACTGAGCGTCCCGGTGCAACACCAACCCAGGG GAACGGAGGTACCTCATCCTGCGCTGGGCCAA GGACGCTGGGAAATCTGTGGCATTGTGACCAC <span style="float: right;">20</span> <span style="float: right;">30</span> <span style="float: right;">40</span>

配列番号	説明	配列
		<p>CACGAGAGTGAACCATGCCACCCCCAGCGCCG  CCTACGCCCACTCGGCTGACCGGGACTGGTACT  CAGACAACGAGATGCCCTGAGGCCTTGAGCC  AGGGCTGTAAGGACATCGCTACCAAGCTCATGC  ATAAACATCAGGGACATTGACGTGATCATGGGG  GGTGGCCGAAATACATGTACCCCAAGAATAA  AACTGATGTGGAGTATGAGAGTGACGAGAAAG  CCAGGGGCACGAGGCTGGACGGCCTGGACCTC  GTTGACACCTGGAAGAGCTTCAAACCGAGATAC  AAGCACTCCCACTTCATCTGGAACCGCACGGAA  CTCCTGACCCCTGACCCCCACAATGTGGACTAC  CTATTGGGTCTCTCGAGCCAGGGACATGCAG  TACGAGCTGAACAGGAACAACGTGACGGACCC  GTCACTCTCCGAGATGGTGGTGGTGGCCATCCA  GATCCTGCGGAAGAACCCAAAGGCTTCTTCTT  GCTGGTGGAAAGGAGGCAGAATTGACCACGGGC  ACCATGAAGGAAAAGCCAAGCAGGCCATGCCAT  GAGGGGGTGGAGATGGACCGGGCCATGGGCA  GGCAGGCAGCTTGACCTCCTCGGAAGACACTCT  GACCGTGGTCACTGCGGACCATTCCCACGTCTT  CACATTGGTGGATAACACCCCCCGTGGCAACTC  TATCTTGGTCTGGCCCCCATGCTGAGTGACAC  AGACAAGAAGCCCTTCACTGCCATCCTGTATGG  CAATGGGCCTGGCTACAAGGGTGGTGGCGGTG  AACGAGAGAATGTCTCCATGGTGGACTATGCTC  ACAACAACCTACCAAGGCGCAGTCTGCTGTGCC  TGCGCCACGAGACCCACGGCGGGGAGGACGTG  GCCGTCTCTCCAAGGGCCCCATGGCGCACCTG  CTGCACGGCGTCCACGAGCAGAACTACGTCCCC  CACGTGATGGCGTATGCAGCCTGCATGGGGCC  AACCTCGGCCACTGTGCTCTGCCAGCTCGGCA  GGCAGCCTGCTGCAGGGCCCCCTGCTGCTCGCG  CTGGCCCTCTACCCCCCTGAGGGTCCCTGTTCTGA  GGGCCAGGGCCCCGGGCACCCACAAGCCCGTG  ACAGATGCCAACTTCCCACACGGCAGCCCCCCC  CTCAAGGGCAGGGAGGTGGGGGCCCTCCTCAG  CCTCTGCAACTGCAAGAAAGGGACCCAAGAA  ACCAAAGTCTGCCGCCACCTCGCTCCCTCTG  GAATCTTCCCCAAGGGCAAACCCACTTCTGGC  CTCCAGCCTTGCTCCCTCCCCGCTGCCCTTGG  CCAACAGGGTAGATTCTCTGGGCAGGCAGAG  AGTACAGACTGCAGACATTCTCAAAGCCTCTTA  TTTTCTAGCGAACGTATTCTCCAGACCCAGA  GGCCCTGAAGCCTCCGTGGAACATTCTGGATCT  GACCCTCCCAGTCTCATCTCCTGACCCCTCCACT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>CCCCATCTCCTTACCTCTGGAACCCCCCAGGCC  TACAATGCTCATGTCCCTGTCCCCAGGCCAGC  CCTCCTTCAGGGGAGTTGAGGTCTTCTCCTCA  GGACAAGGCCCTGCTCACTCACTCACTCCAAGA  CCACCAGGGTCCCAGGAAGCCGGTGCGCTGGGT  GGCCATCCTACCCAGCGTGGCCCAGGCCGGGA  AGAGCCACCTGGCAGGGCTCACACTCCTGGGCT  CTGAACACACACGCCAGCTCCTCTGAAGCGA  CTCTCCTGTTGGAACGGCAAAAAAAATT  TTTTCTCTTTTGGTGGTGGTAAAAGGGAACA  CAAAACATTAAATAAAACTTCCAAATATTTC  CGAGGACAAAAAA</p>
60	ヒトOsterix mRNA	<p>CGGCAGGGCGGCAGCAGCCTAGGCAGCAGCAGT  AGCAGAACGAGCAGCCGCCAGCAGCAGCAAG  GACTCTGGAGTCAGAGTAGGACTGTAGGACCG  GAGCCTGAGTGGAACAGGAGTGGAGCTGGCCT  GGGAGAGAGCGGATCCCTCCCAGCACCCCTCAG  GCCACCCGTTGCCTGCACTCTCCGCCAGACC  TCCAGAGAGGAGAGACTCGGGACAGCCAGCCC  CAGGTTCCCCCAGCTCTCCATCTGCCCTGGCTC  CTTGGGACCCGTTCCCCAGCCTCAGGATGGCGT  CCTCCCTGCTTGAGGAGGAAGTTCACTATGGCT  CCAGTCCCCCTGGCCATGCTGACGGCAGCGTGCA  GCAAATTGGTGGCTCTAGCCCTCTGGGGACT  CAACAACCTGGGCAAAGCAGGGCACAAAGAAG  CCGTACTCTGTGGGAGTGCACCTTCAGCCTCC  AAAACCATGGGGATGCTTATCCAGCCCCCTTT  ACAAGCACTAATGGGCTCTTCACCTGCAGGC  AGTCCTCCAGCACCCACCTCAGGCTATGCTAAT  GATTACCCCTCCCTTTCCACTCATCCCTGGGC  CCACAGGCACCCAGGACCCCTGGCTACTAGTGC  CCAAGGGGCACAGCTCTGACTGTCTGCCA  GTGTCTACACCTCTGGACATGACACACCCCT  ATGGCTCTGGTACAAGGCAGGCATCCATGCAG  GCATTTCAACCAGGCCAGGCAACACTCCTACTC  CATGGTGGGATATGCACCCCTGGAGGGCAACTGGC  TAGGTGGTGGGCAGGGCCAGGGTGTGGCTG  CAAGGGACACTGCCACAGGTCCAGCTCAGCCT  CCACTGAACCCCCAGCTGCCACCTACCCATCT  GACTTTGCTCCCTTAATCCAGCCCCCTACCCA  GCTCCCCACCTCTGCAACCAGGGCCCCAGCAT  GTCTTGCCTTAAAGATGTCTATAAACCCAAGGCA  GTGGGAAATAGTGGGCAGCTAGAAGGGAGTGG  TGGAGCCAAACCCCCACGGGGTGCAAGCACTG  GGGGTAGTGGTGGATATGGGGCAGTGGGGCA</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GGCGCTCCTCCTGCAGACTGCCCTAATTGCCAG  GAGCTAGAGCGGTGGGAGCAGCAGCGGCTGG  GCTGCGGAAGAACGCCATCCACAGCTGCCACAT  CCCTGGCTGCGCAAGGTGTATGGCAAGGCTTC  GCACCTGAAGGCCACTTGCCTGGCACACAGG  CGAGAGGCCCTCGTCTGCAACTGGCTTCTG  CGGCAAGAGGTTCACTCGTCGGATGAGCTGGA  GCGTCATGTGCGCACTCACACCCGGAGAAAGA  AGTTCACCTGCCTGCTCTGCTCCAAGCGCTTAC  CCGAAGCGACCACCTGAGCAAACACCGCGCA  CCCATGGAGAACCAAGGCCGGTCCCCCTCCA  GTGGCCCCAAGGAGCTGGGGAGGGCCGCAGC  ACGGGGAGAGGGAGGCCAGTCAGACGCCCG  ACCTTCTGCCTCGCCAGCAACCCCAGAGAAAGC  CCCTGGAGGCAGCCCTGAGCAGAGCAACTTGCT  GGAGATCTGAGCCGGGTGGAAGGTCTCCCACCC  CAGGAGCTGCCCTGACAGTCTCTTGGCTCT  AGACCACTGCTGCCAATCACTCTTACCCC  ATGCATGCCATCCTTCGGGGCTCTCTCCCTCTG  CTCCCTCCTGCCATTCTGGGCTTGGGTATCTCC  TTGCATGCCCTCAGCTCACCTCTCTCAC  CATGAGACTGGCTTCCACAAACTCTCATCTCA  GGCCCTCCCTGTGCCTGATACCTGCACTCCG  GCTCCTAGACTCTGCCCTGCCACACCAACAC  ACTTTCTATTGGGCTCCAAACACTATTCTCCA  TCTCACTCCTGACATGTACCCCTTGCTTCT  CAAGCTTATTCCCTGCTGTCCTCAGCCTCCAGG  CTTCAGTCTCCAACTCTTACACCAATTGCTT  CCATTCTCCAGAACTCTTTCTTACAAA  ACAATGATAATGATAATTATTGCCCCCTGGT  GGCCTCTCATCAGGGTATTGGGTTAGTGAC  CTGGCCAGAGGGTGCCAAGAGGGGGCAGACC  AGTGGGATCTGATCCAAAGATGGGTTGACC  CCAGGGTCAGGGAGGCTGCCCTCAGGCTGTAT  ATTAAACCCCTATGTACCAAGGAGTAATGAATAG  TAATAATTCTATTATGTAAGTTATGATGACGG  GTCAGGTAGAGTGAGCTGGGGAGGGAAAGTGG  TCCATTCTGCTAAGGAAATTCTAGTCAAATGC  ATCTCTGTATAGACAAAATGTTAGTGGAGAAGA  TCTTGTAAATAGAATGTCATCATCAGAATCTC  AGTTGATAGGGTTCTCTTGTAAATGAAGTCTCT  ACAAATTGGGTTAGCTACATCTCTGCTAAACAG  TTGATGGGGTATCTCTGATTAGGGGGATCCCT  AATATCCCCAGCCCCAGCCAGAAGCTGTGAAAC  CTCAAGTCCTATGGAGGGGAGAAGGACTGGAA</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		TGTACCCCATCTCCCTGACTGCAGAGCAGGTT CCTCCACTGCCCAACCCCTAAGACACCATGACC CCATCAGGTTAACCTGGCTTGCCATGGTTATG GAGAGCTTGAGCTGCCATCTTAGATGTGCTCT TTGGGAAAGCCCCTAACAGGAGGACATTGGT TTGGGGGTGCACCTCTGAAGAATGGGTGGGG AAGGCTTCTAGGATCAGATTCAAATAAGTA TGTATTGAGTGCCTACTCTGTGCAAGGCACTAT GCTAGATCTGGTGCCTAGAACGCGCTGAGAAAG AACTAAAGAGCTAGGAGGACAGAGGCCCCCA AGCTGATCTGGTGGTGCATCCACGCACCCCCAC CCTGGGACTTGGATGCTCCATCTCACCTCC AGTGACTTTAAAGCCGCTTCGTGCCTTCTGT AACGTTGGATCCTCCTTCTGTCCCCGTGTC TCAAGGCCCCAAGTTAAAGGGTAAAGCCGCTG GAGCTTGGGAGAGAACATTGTGGAATGGAAG GGATCATGCCCTTGTGGAGTCTTTTTTAA TTAATAAAATAAAAGTTGGATTGAAAAAAA AAAAAAA
61	ヒトKlotho mRNA	CGCGCAGCATGCCGCCAGCGCCCCGCCGCC GCCCGCGGCCGCCGCCGCGCTCGCTGTCGCTGC TGCTGGTGCTGCTGGCCTGGCGGCCGCCGCC TGCCTGCCAGCCGGCGACGGCGCGCAGACC TGGGCCGTGTCTCGGGCCTCCTGCCCGAG GCCGCCGGCCTCTCCAGGGCACCTCCCCGAC GGCTTCCCTCTGGCCGTGGCAGCGCCGCTAC CAGACCGAGGGCGGCTGGCAGCAGCACGGCAA GGGTGCGTCCATCTGGGACACGTTACCCACCA CCCCCTGGCACCCCCGGAGACTCCCGAACGC CAGTCTGCCGTTGGCGCCCCGTGCGCTGCA GCCGCCACCGGGACGTAGCCAGCGACAGCT ACAACAACGTCTTCCCGACACGGAGGCCTGC GCGAGCTGGGGTCACTCACTACCGCTTCTCCA TCTCGTGGCGCGAGTGCTCCCCAATGGCAGCG CGGGCGTCCCCAACCGCGAGGGGCTGCGCTACT ACCGGCCCTGCTGGAGCGGCTGCGGGAGCTG GGCGTGCAGCCGTGGTACCCCTGTACCAACTGG GACCTGCCCAAGCGCTGCAGGACGCCTACGGC GGCTGGGCCAACCGCGCCCTGGCCGACCACTC AGGGATTACCGGGAGCTCTGCTTCCGCCACTTC GGCGGTCAAGTACTGGATCACCATCGAC AACCCCTACGTGGTGGCCTGGCACGGCTACGCC ACCGGGCGCCTGGCCCCGGCATCCGGGGCAG CCCGCGGCTGGGTACCTGGTGGCGCACAAACCT CCTCGGCTCATGCCAAAGTCTGGCATCTCTA

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>CAATACTTCTTCCGTCCCACTCAGGGAGGTCA      GGTGTCCATTGCCCTAAGCTCTCACTGGATCAA      TCCTCGAAGAACGACCGACCACAGCATCAAAG      AATGTCAAAAATCTCTGGACTTTGTACTAGGTT      GGTTTGCCAAACCCGTATTTATTGATGGTGACT      ATCCCAGAGCATGAAGAATAACCTTCATCTA      TTCTGCCTGATTTACTGAATCTGAGAAAAAGT      TCATCAAAGGAACGTGACTTTTGCTCTTG      CTTTGGACCCACCTTGAGTTCAACTTTGGAC      CCTCACATGAAGTCCGCCAATTGGAATCTCCC      AACCTGAGGCAACTGCTTCCCTGGATTGACCTT      GAATTAAACCCTCAAATATTATTGTGGAA      AATGGCTGGTTGTCTCAGGGACCACCAAGAGA      GATGATGCCAAATATATGTATTACCTCAAAAAG      TTCATCATGGAAACCTTAAAGCCATCAAGCTG      GATGGGGTGGATGTCTCGGGTATACCGCATGG      TCCCTCATGGATGGTTTCGAGTGGCACAGAGGT      TACAGCATCAGGCCTGGACTCTCTATGTTGAC      TTTCTAAGCCAGGACAAGATGTTGTTGCCAAAG      TCTTCAGCCTGTTCTACCAAAGCTGATAGAG      AAAAATGGCTCCCTCCTTACCTGAAAATCAG      CCCCTAGAAGGGACATTCCCTGTGACTTGCT      TGGGAGTTGTTGACAACACTACATTCAAGTAGAT      ACCACTCTGTCAGTTACCGACCTGAATGTTT      ACCTGTGGGATGTCCACCACAGTAAAAGGCTTA      TTAAAGTGGATGGGTTGTGACCAAGAAGAGG      AAATCCTACTGTGTTGACTTGCTGCCATCCAG      CCCCAGATCGCTTACTCCAGGAAATGCACGTT      ACACATTTCGCTTCTCCCTGGACTGGGCCCTG      ATTCTCCCTCTGGTAACCAGTCCCAGGTGAAC      CACACCATCCTGCAGTACTATCGCTGCATGGCC      AGCGAGCTTGTCCGTGTCAACATCACCCCCAGTG      GTGGCCCTGTGGCAGCCTATGGCCCCGAACCAA      GGACTGCCGCCCTCCTGGCCAGGCAGGGCGC      CTGGGAGAACCCCTACACTGCCCTGGCTTGC      AGAGTATGCCCGACTGTGCTTCAAGAGCTCGG      CCATCACGTCAAGCTTGGATAACGATGAATGA      GCCGTATACAAGGAATATGACATACAGTGTGG      CCACAAACCTCTGAAGGCCATGCCCTGGCTTGC      GCATGTGTACAATGAAAAGTTAGGCATGCTCA      GAATGGAAAATATCCATAGCCTTGCAGGTGA      TTGGATAGAACCTGCCTGCCCTTCTCCAAAAA      GGACAAAGAGGTGGCCGAGAGAGTTTGGAAAT      TTGACATTGGCTGGCTGGCTGAGGCCATTTCG      GCTCTGGAGATTATCCATGGGTGATGAGGGACT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GGCTGAACCAAAGAAACAATTTCTTCCCTT  ATTCACTGAAGATGAAAAAGCTAATCCAG  GGTACCTTGACTTTGGCTTAAGCCATTATA  CCACCATCCTGTAGACTCAGAAAAGAAGATC  CAATAAAATACAATGATTACCTAGAAGTGCAA  GAAATGACCGACATCACGTGGCTCAACTCCCC  AGTCAGGTGGCGGTAGTGCCCTGGGGTTGCGC  AAAGTGTGAACGGCTGAAGTTCAAGTACGG  AGACCTCCCCATGTACATAATATCCAACGGAAT  CGATGACGGGCTGCATGCTGAGGACGACCAGC  TGAGGGTGTATTATATGCAGAATTACATAAACG  AAGCTCTCAAAGCCCACATACTGGATGGTATCA  ATCTTGCGGATACTTGCTTATTGCTTAACGA  CCGCACAGCTCCGAGGGTTGCCCTATCGTTA  TGCTGCAGATCAGTTGAGCCCAAGGCATCCAT  GAAACATTACAGGAAAATTATTGACAGCAATG  GTTTCCCGGGCCCAGAAACTCTGGAAAGATT  GTCCAGAAGAATTACCGTGTACTGAGTGCA  GTTTTTTCACACCCGAAAGTCTTACTGGCTT  CATAGCTTTCTATTGGCTTCTATTATTCTC  TCTCCCTATATTACTACTCGAAGAAAGGCA  GAAGAAGTTACAAATAGTTCTGAACATTTCT  ATTCAATTGAAATAATTATGCAGACACA  TCAGCTGTAACCATTGCACCTCTAAGTGT  GAAACTGTAAATTCTACATTTGACTCTAGA  AAACATTGGCTTATGACAGAGGTTGA  AATGGGCATAGGTGATCGTAAAATTGAATAA  TGCAGATAGTGCCTGAATTGTTCTCTGGG  TGATTAAGGAACTGACAGGCACTATAATTG  TAACACACTAACAAAGCATGAAAAATTAGGAA  CCACACCAATGCAACATTGTGCAGAAATTG  ATGACAAGATTAGGAATTGGCTCTGCACCC  ACTTCTAAATTAAATGTTCTGGAAAGTAGTAA  TTGCAAGAGITCGAATAGAAAGTTATGTACCAA  GTAACCATTCTCAGCTGCCATAATAATGCCTA  GTGGCTTCCCCCTGTCAAATCTAGTTCTATG  GAAAAGAAGATGGCAGATAACAGGAGAGACGAC  AGAGGGCCTAGGCTGGAATGTTCTTCTGAAA  GCAATGCTTCTATCAAATACTAGTATTAAATT  GTATCTGGTTAATGACATACTGGAGAGCAAAT  TATGGAAATGTGTATTATATGATTGGTGGAGGT  CCTGTCTAAACCCCTGTGTCCTGAGGGATCTGT  CTCACTGGCATCTGTTGAGGGCCTGACATA  GGAAACTTTGATAAGTATCTGCGGAAAAACAA  ACATGAATCCTGTGATATTGGGCTCTCAGGAA</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GCATAAAGCAATTGTGAAATACAGTATAACCGCA      GTGGCTCTAGGTGGAGGAAGGGAGGAAAAAGT      GCTTATTATGTGCAACATTATGATTAAATCTGATT      ATACACCATTTCAGCAGATCTGGAAATGAAT      GACATGACCTTTCCCTAGAGAATAAGGATGAAA      TAATCACTCATTCTATGAACAGTGACACTACTT      TCTATTCTTAGCTGTACTGTAATTCTTGAGT      TGATAGTTTACAAATTCTTAATAGGTTCAAAA      GCAATCTGGTCTGAATAACACTGGATTGTTTC      TGTGATCTCTGAGGTCTATTATGTTTTGCTG      CTACTCTGTGGAAGTAGCTTGAACTAGTTTA      CTTTGAACCTTCACGCTGAAACATGCTAGTGAT      ATCTAGAAAGGGCTAATTAGGTCTCATCCTTA      ATGCCCTTAATAAGTCTTGCTGATTTCAGA      CAGGAAGTCTCTATTACACTGGAGCTGTT      TATAGATAAGTCAATATTGTATCAGGCAAGATA      AACCAATGTCTAACAGGCATTGCCAACCTCAC      TGACACAGGGCTAGTGTATAATAATATACTG      TACTATATAATATATCATCTTAGAGGTATGATT      TTTTCATGAAAGATAAGCTTGGTAATATTCTAT      TTAAAGTGGACTTATTAAAATTGGATGCTAGA      GAATCAAGTTATTATGTATATATTCTGA      TTATAAGAGTAATATATGTTCTTGTAAAAATT      TTAAACACAGAAACTATATGCAAAGAAAAA      ATAAAAATTATCTATAATCTCAGAACCCAGAAA      TAGCCACTATTACATTTCCTACGTATTATTT      TACATAGATCATATTGTATATAGTTAGTATCTT      ATTAAATTATTATGAAACTTCCTTGTCTT      ATTAGTCTCAAAGCATGATTAAATAGTTGT      TGAGTATTCCACCACAGGAATGTATCACAACTT      AACCGTCCCCTTGTAGACTAGTTCTTATTAA      ATGTTGATGAATGTGTTAAAAATAATTGTT      GCTACATTACTTAATTCTTGACTGTAAAGA      GAAGTAATTGCTCCTTGATAAAAGTATTATAATT      AATAATAATCTGCCTGCAACTTTGCCTTCTT      TCATAATC</p>
62	ヒトSm22- $\alpha$ mRNA	<p>TCACCACGGCGGCAGCCCTTAAACCCCTCACC      CAGCCAGCGCCCCATCCTGTCTGTCCGAACCCA      GACACAAGTCTTCACTCCTCCTGCGAGCCCTG      AGGAAGCCTGTGAGTCATTGGCTGGGGCTTG      GAGGGAAGTTGGCTGGAGCTGGACAGGAGCA      GTGGGTGCATTCAGGCAGGCCTCTGAGGTC      CCAGGCAGCTCCAGCTCCCTGGCTAGGGAA      ACCCACCCCTCTCAGTCAGCATGGGGCCCAAGC      TCCAGGCAGGGTGGGCTGGATCACTAGCGTCCT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GGATCTCTCTCAGACTGGGCAGCCCCGGGCTCA      TTGAAATGCCCGGATGACTTGGCTAGTCAGA      GGAATTGATGAAACCACCGGGGTGAGAGGGA      GGCTCCCATCTCAGCCAGCACATCCACAAGG      TGTGTGTAAGGGTCAGGCGCCGGCCGGTTAGG      CCAAGGCTCTACTGTCTGTTGCCCTCCAGGAG      AACTTCCAAGGAGCTTCCCCAGACATGGCAA      CAAGGGTCCTCCTATGGCATGAGCCCGAAGT      GCAGTCAAATCGAGAAGAAGTATGACGAGG      AGCTGGAGGAGCGGCTGGTGGAGTGGATCATA      GTGCAGTGTGCCCTGATGTGGGCCGGCAGAC      CGTGGCGCTTGGCTCCAGGTCTGGCTGAAG      AATGGCGTGATTCTGAGCAAGCTGGTGAACAGC      CTGTACCCCTGATGGCTCCAAGCCGGTGAAGGTG      CCCGAGAACCCACCCATGGTCTCAAGCAG      ATGGAGCAGGTGGCTCAGTTCTGAAGGCGGCT      GAGGACTATGGGTGATCAAGACTGACATGTT      CAGACTGTTGACCTCTTGAAGGCAAAGACATG      GCAGCAGTGCAGAGGACCCCTGATGGCTTGGC      AGCTTGGCAGTGACCAAGAATGATGGCACTA      CCGTGGAGATCCAACCTGGTTATGAAGAAAGC      GCAGGAGCATAAGAGGGAAATTACAGAGAGCC      AGCTGCAGGAGGGAAAGCATGTCATTGGCCTTC      AGATGGGCAGCAACAGAGGGGCTCCCAGGCC      GGCATGACAGGCTACGGACGACCTCGGCAGAT      CATCAGTTAGAGCGGAGAGGGCTAGCCCTGAG      CCCGCCCTCCCCCAGCTCTGGCTGCAGCCA      TCCCCTTAGCCTGCCTCACCCACACCCGTGTG      GTACCTTCAGCCCTGCCAAGCTTGAAGGCTCT      GTCACTGAGCAATGTAAGTGCACCTGGCAGC      TCCTCCCTGTGCCCCCAGCCTCAGCCCAACTTCT      TACCCGAAAGCATCACTGCCTGGCCCCCTCC      CCCGGCTGCCCTCATCACCTCTACTGTCTCCTCC      CTGGGCTAAGCAGGGGAGAAGCAGGGCTGGGG      TAGCCTGGATGTGGGCCAAGTCCACTGTCTCC      TTGGCGGAAAAGCCATTGAAGAAGAACCAAG      CCCAGCCTGCCCTATCTGCTCTGGAATATT      TTGGGGTTGGAACTCAAAAAAAAAAAAAAAA      ATCAATCTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAA</p>
63	ヒトRunx2タンパク質	MASNSLFSTVTPCQQNFFWDPSTSRRFSPSSSLQP GKMSDVSPVVAAQQQQQQQQQQQQQQQQQQ QQQQEAAAAAAAAAAAAAAAVPRLRPPHDN RTMVEIIADHPAELVRTDSPNFLCSVLPShWRCK TLPVAFKVVALGEVPDGTVVTVMAGNDENYSAE LRNASAVMKNQVARFDLRFVGRSGRGKSFTLTI

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		TVFTNPPQVATYHRAIKVTVDGPREPRRHRQKLD DSKPSLFSDRSLSDLGRIPHPSMRVGVPQNPRPSL NSAPSPFNPQQGSQITDPRQAQSSPPWSYDQSYP YLSQMTSPSIHSTTPLSSTRGTGLPAITDVPRRISD DDTATSDFCLWPSTLSKKSQAGASELGPFDPRQF PSISSLTESRFNSNPRMHYPATFTYTPPVTSQMSLG MSATTHYHTYLPPPYPGSSQSQSGPFQTSSTPYLY YGTSSGSYQFPMPVPGGDRSPSRMLPPCTTSNGST LLNPNLPNQNDGVADGSHSSPTVLNSSGRMDE SVWRPY
64	ヒトAlpタンパク質	MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQ ETLKYLELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTV TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTY NTNAQVPSDASAGTATAYLCGVKANEGETVGVSAAT ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTR VNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDV EYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSHF IWRNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRN NVTDSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGGRID HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSED TLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDT DKKPFTAILEYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAH NNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMMAHLL HGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAG SLAAGPLLLALALYPLSVLF
65	ヒトOsterixタンパク質	MASSLLEEEVHYGSSPLAMLTAACSKFGGSSPLR DSTTLGKAGTKKPYSVGSDSLASKTMGDAYPAPF TSTNGLLSPAGSPPAPTSGYANDYPPFSHPGPTG TQDPGLLVPKGHSSSDCLPSVYTSLDMTHPYGSW YKAGIHAGISPGPGNTPTPWWDHMHPGNWLGGG QQQGDGLQGTLPTGPAQPPLNPQLPTYPSDFAPL NPAPYPAPHLLQPGPQHVLPQDVYKPKAVGNSG QLEGSGGAKPPRGASTGGGGYGGSGAGRSSCDC PNCQEERLERLGAAAGLRKKPIHSCHIPCGKVG KASHLKAHLRWHTGERPFVCNWLCFCGKRFRTRSD ELERHVRTHTREKKFTCLLCSKRFRSDHLSKHQ RTHGEPPGPPPSGPKELGEGRSTGEEEASQTPRP SASPATPEKAPGGSPEQSNLLEI
66	ヒトKlothoタンパク質	MPASAPPRRPRPPPSLSSLVLLGLGRRRLRAEP GDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGFLWA VGSAAYQTEGGWQQHQKGKASIWTDTFHPLAPP GDSRNASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRD TEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREG LRYYRRLLERLRELGVQPVVTLYHWDLQPQLQD

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		AYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFGGQVKYW ITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPLRGYLVA HNLLLAHAKVWHLYNNTSFRPTQGGQVSIALSSH WINPRRMTDHSIKECQKSILDFVLGWFAKPVFIDG DYPESMKNLSSILPDFTESEKKFIKGTAFFALCF GPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFN HPQIFIVENGWFVSGTTKRDDAKYMYYLKKFIME TLKAJLKGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRR GLFYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKEKNGFPPL PENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTD LNVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKRRKSYCVDEA AIQPQIALLQEMHVTHFRFSDLWALILPLGNQSQV NHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPN QGLPRLLARQGAWEWPYTALAFAEYARLCFQEL GHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLKAHALA WHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSQK DKEVAERVLEFDIGWLAEPIFGSGDYPWVMRDW LNQRNNFLPYFTEDEKKLIQGTFDFLALSHYTIL VDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQAV VPWGLRKVLNWLKFKYGDLPMYIISNGIDDGLHA EDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAY SFNDRTAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIID SNGFPGPETLERFCPEEFTVCTECSFFHTRKSLLAF IAFLFFASIIISLISLYSKKGRRSYK
67	ヒトSm22- $\alpha$ タンパク質	MANKGPSYGMSREVQSKIEKKYDEELEERLVEWI IVQCGPDVGRPDGRGLGFQVWLKNGVILSKLVNS LYPDGSKPVKVPENPPSMVFQKMEQVAQFLKAA EDYGVIKTDMFQTVDLFEGKDMAAVQRTLMAHG SLAVTKNDGHYRGDPNWFMKKAQEHKREFTESQ LQEKGKHVIQLQMGSNRGASQAQMTGYGRPRQIIS
68	ヒト $\alpha$ -SMAタンパク質	MCEEEDSTALVCDNGSGLCKAGFAGDDAPRAVF PSIVGRPRHQGVVMVGQKDSYVGDEAQSKRGI LTLKYPIEHGIITNWDDMEKIWHHSFYNELRVAPE EHPTLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMY VAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGKVTHNVPIYEG YALPHAIMRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVT TAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLE KSYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAG IHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNVLSGGTTMYPG IADRMQKEITALAPSTMKIKIHPPERKYSVWIGGS ILASLSTFQQMWISKQEYDEAGPSIVHRKCF
69	ヒトMYOCDタンパク質	MTLLGSEHSLLIRSKERSVLQLRLQQRRTQEQLAN QHIPPLKRPAEFHEQRKHLDSDKAKNSLKRKARN RCNSADLVNMHILQASTAERSIPTAQMKLKRARL ADDLNEKIALRPGPLELVEKNILPVDSAVERKAIKG

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>NQVSFSKSTDAAFEEEDSSDGLSPDQTRSEDPQN  SAGSPPDAKASDTPSTGSLGTNQDLASGSENDRN  DSASQPShQSDAGKQGLGPPSTPIAVHAAVKSKS  LGDSKNRHKKPKDPKPKVKKLKYHQYIPPDQKA  EKSPPPMDSAYARLLQQQLFLQLQILSQQQQQQ  QHRFSYLGMHQAQLKEPNEQMVRNPNSSTPLSN  TPLSPVKNSFSGQTGVSSFKPGPLPPNLDDLKVSE  LRQQLRIRGLPVSGTKTALMDRLRPFQDCSGNPV  PNFGDITTVTFPVTPNTPNYQSSSTSALSNGFYH  FGSTSSSPPIPASSDLSVAGSLPDTFNDASPSFGLH  PSPVHVCTEESLMSSLNGGSVPSELDGLDSEKDK  MLVEKQKVINELTWKLQQEQRQVEELRMQLQKQ  KRNNCSEKKPLPFLAASIKQEEAVSSCPFASQVPV  KRQSSSECHPPACEAAQLQPLGNAHCVESSDQT  NVLSSTFLSPQCSPQHSPLGAVKSPQHISLPPSPNN  PHFLPSSSGAQGEGRVSSPISSQVCTAQNSGAHD  GHPPSFSPHSSSLHPPFGAQADSSHGAGGNPCPK  SPCVQQKMAQLHSSDKVGPKFSIPSPTEFSKSSAIS  EVTQPPSYEDAVKQQMTRSQQMDELLDVLIESTGE  MPADAREDHSCQLQKVPKIPRSSRSPTAVLTKPSAS  FEQASSGSQIPFDPYATDSDEHLEVLLNSQSPLGK  MSDVTLLKIGSEEPHFDGIMDGSGKAEDLFNA  HEILPGPLSPMQTQFSPSSVDSNGLQLSFTESPWET  MEWLDTTPNTPGFALTSSPSIFNIDFLDVTDL  NLNSSMDLHLQQW </p>
70	ヒト $\alpha$ -SMA mRNA	<p>CTCTCCCCGCCCGCGGGCGGGCGCGCACTCA  CCCACCCGC CGGGAGCGGACCTTGGCTTGGC  TTGTCAAGGGCTTGTCCAGGAGTTCCGCTCCTCTC  TCCAACCGGGGTCCCCCTCCAGCGACCTAAAG  CTTCCCAGACTTCCGCTTCATTCCCTGTCCGCAC  CCCACGCCACCTCAACGTGGAGCGCAGTGGTC  TCCGAGGAGCGCCGGAGCTGCCCCGCTGCCA  GCGGGGTCA GC ACTT CGCATCAAGGCCCCAAGA  AAAGCAAGT CCTCCAGCGTTCTGAGCACCCGGG  CCTGAGGGAAAGGTCTAACAGCCCCGGGAGC  CACTCTCCAACGCCCTCCG CAGCAGCCCCGCC  TCCCAGGTGCCCGCTGCCGCTGCCGCC  ATCCCCCACGCCCTCCGCCGCCACTTG  CCTATCCCCGGGACTAAGACGGGAATCCTGTGA  AGCAGCTCCAGCTATGTGTGAAGAAGAGGACA  GCACTGCCTTGGTGTGTGACAATGGCTCTGGGC  TCTGTAAGGCCGGCTTGCTGGGAGCGATGCTC  CCAGGGCTGTTCCCATCCATTGTGGGACGTC  CCAGACATCAGGGGTGATGGTGGGAATGGGA  AAAAAGACAGCTACGTGGGTGACGAAGCACA </p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GAGAAAAGAGGAATCCTGACCCCTGAAGTACC  CGATAGAACATGGCATCATCACCAACTGGGAC  GACATGGAAAAGATCTGGACCACTCTTCTAC  AATGAGCTTCGTGTTGCCCTGAAGAGCATCCC  ACCCTGCTCACGGAGGCACCCCTGAACCCCAAG  GCCAACCGGGAGAAAATGACTCAAATTATGTTT  GAGACTTCAATGTCCCAGCCATGTATGTGGCT  ATCCAGGCGGTGTGCTCTCTATGCCCTGGAA  CGCACAACCTGGCATCGTGCTGGACTCTGGAGAT  GGTGTCAcccacaATGTCCCCATCTATGAGGGC  TATGCCTTGCCCCATGCCATCATGCGTCTGGAT  CTGGCTGGCCGAGATCTCACTGACTACCTCATG  AAGATCCTGACTGAGCGTGGCTATTCCCTCGTT  ACTACTGCTGAGCGTGGAGATTGTCCGGGACATC  AAGGAGAAACTGTGTTATGTAGCTCTGGACTTT  GAAAATGAGATGCCACTGCCATCCTCATCC  TCCCTTGAGAAGAGTTACGAGTTGCCTGATGGG  CAAGTGATCACCATCGGAAATGAACGTTCCGC  TGCCCAGAGACCCCTGTTCCAGCCATCCTCATC  GGGATGGAGTCTGCTGGCATCCATGAAACCACC  TACAACAGCATCATGAAGTGTGATATTGACATC  AGGAAGGACCTCTATGCTAACAAATGCTCTATCA  GGGGCACCACATGTACCCCTGGCATTGCCGAC  CGAATGCAGAAGGAGATCACGGCCCTAGCACC  CAGCACCACATGAAGATCAAGATCATGCCCTCC  GGAGCGCAAATACTCTGCTGGATCGGTGGCTC  CATCCTGGCCTCTGTCCACCTCCAGCAGAT  GTGGATCAGCAAACAGGAATACGATGAAGCCG  GGCCTCCATTGTCACCGCAAATGCTCTAAA  ACACTTTCCTGCTCCTCTCTGCTCTAGCACACA  ACTGTGAATGCTCTGTGGAATTATGCCCTCAGT  TCTTTCCAATCATCCTAGCCAAAGCTCTGAC  TCGTTACCTATGTGTTTTAATAAAATCTGAAAT  AGGCTACTGGTAAAAAAAAAAAAAAA  AAAAAAAAAAAAAAA  </p>
71	ヒトMYOCD mRNA	<p>AATGCCCGGAGCCTATGACATCAGACAGGAA  CGCCTGGGATGCCCGCTGCTCCTGGCCAACCT  CCGAGGAGGAGGAGGGTCCGCCGGCTAACAGAG  TTAATTAGCCCCGCACGGCGAGGGGGGGAGGCG  CCAGTTTCTGGGGACACTGGCTGCCACTGTAC  TCCTACCCAGGGGAGCTCACGGAGAGTTGGATG  AATTCTGGTTGTTAGCTGCQGTCAAGCTGGCT  CCGGGAGCCTGTTGCTGGTGGAGAACAGGGG  GCGCCTGGCCAAGGGACCAGCGGCTTGCTGAG  ACTCAACATGACACTCCTGGGTCTGAGCATTC</p>

配列番号	説明	配列
		<p>CTTGCTGATTAGGAGCAAGTCAGATCAGTTT      ACAGTTAACACTCAACAAAGAAGGACCCAGG      AACAACTGGCTAACCAAGGCATAATACCACCA      CTGAAACGTCCAGCTGAATTCCATGAGCAAAGA      AAACATTTGGATAGTGACAAGGCTAAAAATTCC      CTGAAGCGAAAGCCAGAACAGGTGCAACAG      TGCCGACTTGGTAATATGCACATACTCCAAGC      TTCCACTGCAGAGAGGTCCATTCAAATGCTCA      GATGAAGCTGAAAAGAGCCCGACTGCCGATG      ATCTCAATGAAAAAAATTGCTCTACGACCAGGGC      CACTGGAGCTGGTGGAAAAAAACATTCTTCCTG      TGGATTCTGCTGTGAAAGAGGCCATAAAAGGTA      ACCAGGTGACTTCTCAAATCCACGGATGCTT      TTGCCTTGAAGAGGGACAGCAGCAGCGATGGG      CTTTCTCCGGATCAGACTCGAAGTGAAGACCCC      CAAAACTCAGCGGGATCCCCGCCAGACGCTAA      AGCCTCAGATACCCCTCGACAGGTTCTCTGGG      GACAAACCAGGATCTGCTTCTGGCTCAGAAAA      TGACAGAAATGACTCAGCCTCACAGCCAGCCA      CCAGTCAGATCGGGGAAGCAGGGGCTGGCC      CCCCCAGCACCCCCATAGCCGTGCATGCTGCTG      TAAAGTCAAATCCTGGTGACAGTAAGAACCC      GCCACAAAAAGCCCAAGGACCCCAAGCCAAAG      GTGAAGAAGCTTAAATATCACCAGTACATTCCC      CCAGACCAGAAGGCAGAGAAGTCCCCCTCCACC      TATGGACTCAGCCTACGCTCGGCTGCTCCAGCA      ACAGCAGCTGTTCTGCAGCTCCAAATCCTCAG      CCAGCAGCAGCAGCAGCAACACCGATTCA      GCTACCTAGGGATGCACCAAGCTCAGCTTAAGG      AACCAAATGAACAGATGGTCAGAAATCCAAAC      TCTTCTCAACGCCACTGAGCAATACCCCTGT      CTCCTGTAAAAACAGTTTTCTGGACAAACTG      GTGTCTCTCTTCAAACCAAGGCCACTCCCACC      TAACCTGGATGATCTGAAGGTCTCTGAATTAAAG      ACAACAGCTTCAATTGGGCTTGCTGTGTC      AGGCACCAAAACGGCTCTCATGGACCCGGCTTC      ACCCTCCAGGACTGCTCTGGCAACCCAGTGCC      GAACTTGGGATATAACGACTGTCACTTTCC      TGTACACACCAACACCGCTGCCAATTACCAAGTC      TTCCTCTTCTACCACTGCCCCGTCCAACGGCTTC      TACCACTTGGCAGCACCAAGCTCCAGCCCCCG      ATCTCCCGAGCCTCTGACCTGTCAGTCGCTG      GGTCCCTGCCGGACACCTCAATGATGCCTCCC      CCTCCTTGGCCTGCACCCGTCCCCAGTCCACG      TGTGCACGGAGGAAGTCTCATGAGCAGCCTG</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>AATGGGGCTCTGTCCTCTGAGCTGGATGG      CTGGACTCCGAGAAGGACAAGATGCTGGTGG      GAAGCAGAAGGTGATCAATGAACCTCACCTGGA      AACTCCAGCAAGAGCAGAGGCAGGTGGAGGAG      CTGAGGATGCAGCTCAGAACAGCAGAAAAGGAA      TAACTGTTAGAGAAGAACGCCGCTGCCTTCCT      GGCTGCCTCCATCAAGCAGGAAGAGGCTGTCTC      CAGCTGCCTTTGCATCCCAGTACCTGTGAA      AAGACAAAGCAGCAGCTCAGAGTGTCAACCCAC      CGGCTGTGAAGCTGCTCAACTCCAGCCTCTTG      GAAATGCTCATGTGTGGAGTCCTCAGATCAA      CCAATGTACTTCTCACATTCTCAGCCCCCA      GTGTTCCCCTCAGCATTCAACCGCTGGGGCTGT      GAAAAGCCCACAGCACATCAGTTGCCCTCATC      ACCCAACAAACCTCACTTCTGCCCTCATCCTCC      GGGGCCAGGGAGAACGGCACAGGGTCTCCTC      GCCCATCAGCAGCCAGGTGTGCACTGCACAGA      ACTCAGGAGCACACGATGGCCATCCTCCAAGCT      TCTCTCCCCATTCTCCAGCCTCCACCCGCCCT      CTCTGGAGCCAAGCAGACAGCAGTCATGGTGC      CGGGGGAAACCCCTGTCCTAAAAGCCCATGTGT      ACAGCAAAAGATGGCTGGTTACACTTTCTGA      TAAGGTGGGCCAAAGTTCAATTCCATCCCC      AACTTTCTAAGTCAGTCAGCAATTTCAGA      GGTAACACAGCCTCCATCCTATGAAGATGCCGT      AAAGCAGCAAATGACCCGGAGTCAGCAGATGG      ATGAACCTCTGGACGTGCTTATTGAAAGCGGAG      AAATGCCAGCAGACGCTAGAGAGGGATCACTCA      TGTCTCAAAAAGTCCCAAAGATAACCCAGATCT      TCCCGAAGTCAACTGCTGTCTCACCAAGCCC      TCGGCTTCTTGAACAAGCCTCTTCAGGCAGC      CAGATCCCCCTTGATCCCTATGCCACCGACAGT      GATGAGCATCTTGAAGTCTTATTAAATTCCCAG      AGCCCCCTAGGAAAGATGAGTGATGTCACCCCT      CTAAAAAATTGGGAGCGAAGAGCCTCACTTGT      GGGATAATGGATGGATTCTCTGGGAAGGCTGCA      GAAGACCTCTCAATGCACATGAGATCTGCCA      GGCCCCCTCTCCAATGCAGACACAGTTTCA      CCCTCTCTGTGGACAGCAATGGCTGCAGTTA      AGCTTCACTGAATCTCCCTGGAAACCATGGAG      TGGCTGGACCTCACTCCGCCAAATTCCACACCA      GGCTTAGCGCCCTCACCACCGCAGCCCCAGC      ATCTTCAACATCGATTCTGATGTCACTGATC      TCAATTGAAATTCTCCATGGACCTTCACTTGCA      GCAGTGGTAGAATGCCAATGCACCAAGTGCTAT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GGAAGACCAATGGAGTCCATGGGGAAAGCA      CACAGCCATACATACTTACTGTCCAAAACAG      AAGAAGAAGAAGAGAATTAAAAAGAAGCAATG      ATITCTGTGCCAATGAACAAGAACAAAAGTCAT      TTTTAGAAATACATATACTGTAAATATTACCAA      CAGTCAGTAACGTGTTAATGATTCAACAATGCA      TTAAAAGAATGTGCTTCTCAGATTAAGGATGC      CAAAAAAAGATATTCACTGCCTTTCAAAGACC      AGTATATTCTAGCCCATAATTTCTCAGGCA      TTGTTGGGCATAAGCTCACACTGTAAGCTTT      CTCATGAATTCACTAGACATAACGTGGAAGGAA      AACGTAGTCTTTGGGAGTACAGGGAAAGCCAGC      CCCTCAAAGCTTATGGAAGACATACCTGCAATG      GAAGCTGTTGCCAATGTCTCCATTACTATCTT      CAAAGAGAAGCCAGACCCAGCTCAGATCAA      AAGTTCTTGAGACAGAGGAACAAAACCAATCG      ATTTCAGGGAAAGCTAATCAACTCTCTTCCCT      CTACCACAAAACGCCCTGCTGGAGTGGTTCTG      AACCTGTACCCAGGACTCGATGTGGTCACTAAT      AACAAATTAAACCTGAACGTGAGTCCACAGAACTCC      ACTCGGAACCTTCTCTTTTAACACTAGTGGCCC      AATCATTCCCACCATCTCTGTGCTGATAAGTAC      GTGTCTTAGATGAGAACCCCTGAAGAACATGCAGA      CCTTCTCCCCGAAGGAGATGCCACAAGCTCT      CCAACACAGCCCCCTTAGTTCCAAGACTAGA      GATGACCACATTGGTAGAAGTATATCTCGAGGC      ACAGGAAGGGAGCCCCACCAGGGATAATTCAAG      ACAGGACTAGAGAATAACATCATTACATACC      CTGGGATAAACACCCCTGGGTTCTATAGAACAGA      CTATTACTTATGGGAGTCCAACCTCTCCCTTTGT      TTTGTTATTATCAGTTATCTTCTCCACTCCA      CTTTCTCTCAAGGTACCAATCCTTCTGCTCCACAT      TCGTTGGCCATCTTCTTTCTGCTCCACAT      TGGGAGGGAGGGACTCTCAGTTCTAACAAAGCT      GCCATACTCCTAACGAAAGCCATTGAAAGAAAT      TTAACAATCCAGGTTCTCTGGAGAACACTCATTC      TCCACACGCACAGTTGCTGCAAAGGAAGTGTG      CAAGAACATTCTGAGGAAGAAACTGGTGAATTG      GTCCCATCAGTCACGAAGTTCTTCTATTCTCGTT      TAGTTTCAAGAAATTATTGGTTGTGGCTCT      GGGGAAATTGGAAATCATTACATTGTAAAGAC      AAATATGGATGATATTACAAGAGAGAACATTCA      GATCTGGTTTTGAAAGAAAACAGAACATTGCGC      ATTGAAAACGATGGAAGGAAAAAGACAATGGT      CTAATGTGCATTCTCATTACCTCTCGTGGCTTT   </p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GGCTGGGAGTTGGAAAAAGCTAAAATTCAGA      ACAGTCTCTGTAAGGCCTCTGTGGCTCCAGTT      CACCAATTATATTGTGATGCTGTAGAAAGG      AGCTATTGCTGTTGTTGTTTTTATTTAAAT      CACTAAGGCACTGTTTATCTTTGTAaaaaaaa      aaaaaaaaaAGTTGTTCACTGTGCACTTATAGAA      AAAATAATCAAAAATGTTGGGATTTAGAAGCT      CTCTTTGATAAACCAAAGATTAGAAGTCAT      TCCATTGTTAACTTGTAaaaATGTGTGAACACA      GAGAGTTTTGGTGATTGCTACTCTGAAAGCTG      CCAGATCTTATTCTGGGGTGGATGTGGAGGA      ATACACATACACACACAAACATACATGTATGTA      TAATAGATATATACATATGTGTATATTATATCT      GTGTGTGCATGTATCTCCAAAAGCGCGTTACA      GAGTTCTACACCAAAAGCCTTAACCCTTAATC      TGCTGTGAATGATACTGGCCTTCTCACTATG      AATTCTGATTAACCAACCAGACTACACGTTGC      CTCTCTGTATGACTAACGGCTCCAACCCGAT      GACTCACAGCTACTTGCTTATCGTGAACAAGCT      CATCTGGCAATGAATATGGATGTGAAAAGACA      GAACAGCTTCACCATTAGTAGCTGGAATGGTA      TCACAGTCTTTATAGAGGAATATGAAAGGAAC      AAGAAAATCATTTCATTCCTTATCTGTATT      GTGCTTAAAGATCCACATGGTAAATTTTTA      TTTGCTTATGTCAGTCAGAACCAAAAAA      AATCCAGAAGAAAAATTGCCAGTGTTCCTT      GAAGATGAAGCTACTGGGAAGAAAACCTTAT      TAATACACTCCACACATTGTCATTCTCAGCT      GTTGGTGTTCCTGGGGCTTGACAAAGCTTGC      TGGTCAGTGCACTTTCAGGTGTCACGTTTGCT      GTTGTATGTTTTCTTCCCCCTACTTCCTTGG      AAAACAAACTCACACAGTCCCCACTCTGAGA      CCTGGACTGAGTGTATTATTTTCTTGG      TATTTCTATCTGAGAGACTAGACCTAGTTAGGA      GGCCTCTGACTCTCCAGATTGTACCTTAT      GGGGATCTTGAGGCTATGACCCAGGACTGATA      GATATGCCCTACGGAAGACAAAAGATAAAATG      GTTCCTATATCTTAATGCAAACCAACACAGTTA      AAAGAGCAGATCTGGATAACTGCTCTCAACC      TGCTTCTACAGTCTCCACAAACCGCATTCAACC      TCTCTCTCATAGCTCAGACATGAAATTGAGG      GAGAAAATGGAGATAATTGGGAGAAAATTGA      TGAAGTTGGCTGCTTCCAGTAGATCAGATAATC      CATGAATTGTCCTCCATTGAGAATTATTITTA      AATTCTTTAAACTCTCGTGTGTCTTGTGA</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		TGACAAATCAGGCATGACTAAAAGATGTACAG AGACTTACGAAGATGGTCACATTCAAGTTCCCT AATGCTCTTAGAACCTGAAGATGACCATGTGTA GTITCTTAAGACCTCTGAACCCCCATGGTGT GAAGACTTGAAGACATTGAGCTATCTGCTGC AGTCTGGTAGATTCTACTTATCTAAAGAAGTC AAAAAAATTATTCTGTGCAAGTGCTTGCAAGGAAG CCAGTGCTTATTAGTAGTGACCCCTGCTTCTATCA ACGTTATTGAGACAAACACATATTCTATTCTAAG GGAGAAAAGAGGGAGGAAGAGAGAGGGAGGGAGG GAGGAAGAAGAGGGAGGGAGCGAGGAAGGAA GATAGGAGATGGTAGGGGGTAAAGAGAAAAA GGAGGGAGAAGGGAGGAAGGAAAGGAAGAGA GGAAAGAAAAGGAGGGAGGAAGGAAAAAAGGCCA AACTTTCTGATCTATGAACCTCTCAGTTCAGCTG TCACATTATGAGAAGTAAATCAGAATTITTTA AGGAGAAGTCATTCTTAGCACTACAATAATTGT ACCAAGTAATTGAGGAACCAAGACAATCTTCAC CTGAATAATAGAGGGTCTGAGAACTGTCAGCCT TTTGCCATTCAAAAACATTATGTCCAACCTGA AAAAAAAGCATCAATAAAACCTATCCCAAGCA TTCAAAATAGTCCTTCAAATGTTATTATT AAAGTCATCAGCTTTAGAAACAGATTCTG GTCTGGCTGAAAACCTCCCACAAACAAATTACTC ATCCAGTGGCTAATATTAAATGCCACCATGGG CAGAGCACACAAATCTCAGATAAACAAACTG AATTGATTCAAGCACAGATTGTCAGATTGAAT GACCAGGGAGTTGTATTGACATGCAAGAAC CTAAGAATCTCCCAGTCCTCAAACACTAGAAACCT TTCAGCTACGATGAAAAAAAAAGGGGTCTT CATTTTCCAAGAGGGGGTGGAGGTGGGGATCA CTTTTAGCTAAAGCTATCTCTCACTTCAAAT TCTTGTCTTTCTTGTGGACAAACACCACTAG TCTATCACTGGAGATCTTAAATATCTCCCAC ATTAAAACATCCACGAGAGTTGAAGATTGT GTTGATTGCCAGATACAGAACCCCTGAAAAT AAGGAAAGGGTGGAGGAAGCATTGTTGTGTCCT ATCCCTACTTATCGTAGCAGCTCTATAGACAAA AGGGACACTTACTGGTGAGCCTCTGGCCCTAA AAGAAAATCATCTAAGAATAATGAAGGCAATT GATTCCCCCAGCCCTCAGCTGCCTCCTC ACAGAAGGAAGTICCCAAAATTGCTGGTACAC AGTTGCAATCAAATATCAGATATGAGAAAACC TGTAGTGAAGAGTCTGGGTTCTGGTTTTCTCAT AAATCCAATATAAATTGTAGGTTGGTTCAGGG

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>TCAAAATTGCCAGTGCTTATTAGACAGATGAT      ACTGATAGACACACAGAGCCAGGTCTGGAA      CAAGACAATCCTGTAGTGCCAAGATCTGGTCAG      TTGCGTTAAGGAGCTGGGTTGATTCTAGAGTC      CAGGTTTATAGAGAAACCTGGCTAGATTGAGC      CTACCCATGGGGAGACGATTCAAGACAGGAT      GAGATCTGGGAAGAATTGTTGTATCTGCCA      GGGAAATTATCACAGGACTCATGAAATGCAATA      ACATGTGAGTAAGTCCCTTGTGATTCTGGAA      TCAGCGATTTCCCTGTGGATTAAGACAAACCA      ACGCCAGAAGGTCTCCTGTGCTTATTITAACCA      TCTGCTCCCACCGTGAACCTGGAGCATGCATT      TCCTAGAAGTGGTTCATAGCTCCTGTGTGTTCA      TGGAAAAGGGGAGTATAATGATGGGATGCTG      GAAGCTTTTAATGTTCAAAGGAAAGGAA      CCCACACTGCTCCCCAGAGTCCCTTCCAATGG      CCCTGCAGTAAGAACGGAGGACAATGTATTGCT      GGGTCTTAAATCCTCCCTCAGTGAAGCACAA      AGAGACACTTGTAAAGAAAAAAAGAGCAAGC      ATAGGTTCTCTGTGGACCTTGTGGAGTGGTGT      TTTCACGTTGGCTCTTGGCTCAATTGAGCATA      ATCAGAAAGAAATGTGGTTATTGGGAAGAGA      CAAAAAGCAGTGGCTAAATACCAAAGTTGGC      ATGTGTTCTTTTAAAAAAATGTTATTAAAG      TATATTITTAATAAAATGTTATTAAAG      AAAAAAAAAAAAAAA</p>
72	ヒトBSAPタンパク質	<p>MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQ      ETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTV      TAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTY      NTNAQVPDSAGTATAYLGVVKANEVTGVSAAT      ERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTR      VNHAUTPSAAYAHSADRWDWYSDNEMPPEALSQGC      KDIAYQLMHNIIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDV      EYESDEKARGTRLGDLVDTWKSFKPRYKHSHF      IWNRTTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRN      NVTDSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLVEGGGRID      HGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIQQAGSLTSED      TLTVVADHSHVFTFGGYTPRGNNSIFGLAPMLSDT      DKKPFTAILYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAH      NNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMMAHLL      HGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAG      SLAAGPLLLALALYPLSVLF</p>
73	ヒトBSAP mRNA	<p>CCGGGCCTCACTCGGGCCCCCGCGGCCCTTA      TAAGGCAGGCGGGGTGGTGGCCCCGGCCCGCT      TCGCCTCCGCCACTCCGCGCCCGCTATCCTGG</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>CTCCGTGCTCCCACCGCGCTTGTGCCTGGACGGA      CCCTCGCCAGTGCTCTGCGCAGGATTGGAACAT      CAGTTAACATCTGACCACTGCCAGCCCACCCCC      TCCCACCCACGTGATTGCATCTCTGGGCTCCA      GGGATAAAAGCAGGTCTTGGGGTGCACCATGATT      TCACCATTCTTAGTACTGGCCATTGGCACCTGC      CTTACTAACTCCTTAGTGCAGAGAAAAGAGAAA      GACCCCAAGTACTGGCGAGACCAAGCGCAAGA      GACACTGAAATATGCCCTGGAGCTTCAGAAGCT      CAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTT      CCTGGGAGATGGATGGGTGTCCTCACAGTGAC      GGCTGCCCGCATCCTCAAGGGTCAGCTCCACCA      CAACCCCTGGGGAGGAGACCAGGCTGGAGATGG      ACAAGTTCCCCTTCGTGGCCCTCTCCAAGACGT      ACAACACCAATGCCAGGTCCCTGACAGCGCC      GGCACCGCCACCGCCTACCTGTGTGGGTGAAG      GCCAATGAGGGCACCGTGGGGTAAGCGCAGC      CACTGAGCGTCCCGGTGCAACACCAACCCAGGG      GAACGAGGTACCTCCATCCTGCGCTGGGCAA      GGACGCTGGAAATCTGTGGCATTGTGACCAC      CACGAGAGTGAACCATGCCACCCCCAGCGCCG      CCTACGCCCACCGGTGACCGGGACTGGTACT      CAGACAACGAGATGCCCTGAGGCCTGAGCC      AGGGCTGTAAGGACATGCCCTACCGAGCTCATGC      ATAACATCAGGGACATTGACGTGATCATGGGG      GGTGCCGGAAATACATGTACCCAAAGAATAA      AACTGATGTGGAGTATGAGAGTGACGAGAAAG      CCAGGGGCACGAGGCTGGACGGCCTGGACCTC      GTTGACACCTGGAAGAGCTTCAAACCGAGATAC      AAGCACTCCCACCTCATCTGGAACCGCACGGAA      CTCCTGACCTTGACCCCCACAATGTGGACTAC      CTATTGGGTCTTTCGAGCCAGGGACATGCAG      TACGAGCTGAACAGGAACAAACGTGACGGACCC      GTCACCTCCGAGATGGTGGTGGTGGCATCCA      GATCCTGCGGAAGAACCCCAAAGGCTTCTTCTT      GCTGGTGGAAAGGAGGCAGAATTGACCACGGGC      ACCATGAAGGAAAAGCCAAGCAGGCCCTGCAT      GAGGCAGGTGGAGATGGACCGGGCCATCGGGCA      GGCAGGGCAGCTTGACCTCCTCGGAAGACACTCT      GACCGTGGTCACTGCGGACCATCTCCACGTCTT      CACATTGGTGGATAACACCCCCCGTGGCAACTC      TATCTTGGTCTGGCCCCCATGCTGAGTGACAC      AGACAAGAAGCCCTCACTGCCATCCTGTATGG      CAATGGGCCTGGCTACAAGGTGGTGGCGGTG      AACGAGAGAATGTCTCCATGGTGGACTATGCTC</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		ACAACAACTACCAGGCGCAGTCTGCTGTGCC TGC GCC AC GAG ACC CAC GG CGGG AGG GAC GTG GCC GT CT TCT CA AG GG CCC AT GG CG CAC CTG CTG CAC GG CG TCC AC GAG CAG AACT AC GT CCCC CAC GT GAT GG CG TAT GC AG CCT GC AT CGGG CC AAC CT CGG CCA CT GT GCT CCT GC CAG CT CGG CA GGC AG C CT T GCT GC AGG CCCC CT GCT GCT CG CG CT GG CC CT CA CCCCC CT GAG CG TCC T GT T CT GA GGG CCC AG GG CCC CGGG CACC ACA AG CCC GTG AC AG AT GCA ACT TCCC AC AC CGG CAG CCCCC CCCC CT CA AG GGG CAG GG AG GT GG GGG CCT C CT CA G CCT CT GCA ACT GCA AG AA AG GGG ACCA AG AA ACCA AGT CT GCG CCC AC CCT CG CT CCCC CT G GA AT CT TCCC AAG GG CCA A ACCC ACT TCT GGC CT CC AG C CT T GCT CC CT CCC GCT GCC CT TT GG CCA AC AG GG TAG ATT CT CT TGG G CAG G CAG AG AGT AC AG ACT GCA GAC ATT CT CAA AG CCT CT TA TTTT CT AG CGA AC GT ATT CT CC AG ACC CAGA GG CC CT GA AG C CT CC CGT GG A AC ATT CT GG AT CT GAC C CT CCC AGT CT CAT CT CCT GAC CCT CCC ACT CCC AT CT C CT TA CCT CT GG A ACC CCCC AGG CCCC TACA AT GCT CAT GT CC CT GT CCC CAG G CCCC AGC CCT C CT CAG GGG AG TT GAG GT CT T CT C CT CA GG ACA AGG C CT TG CT CACT CACT CACT CCA AGA CC ACC AG GG TCC CAG GA AG C CG GT GG CT GG GT GG CC AT C CT ACC CAG CG TGG CCG CAG G CCG GGA AG AG CC AC CT GG CAG GG CT CAC ACT CCT TGG CT CT G A AC AC AC CG CC AG CT CCT CT G A AG CGA CT CT CCT GT T GG A AC GG CAA AAA AAA AT TT TT TTTT CT CT TTTT GG TGG TGG TAA A AGG A AC A CAA AAC AT T AA ATA AAA ACT TT CCA AA AT ATT C CG AGG AC AAAAAA AAAAAA
74	Snail mRNA	ATT CATT GCG CCC CG GC AC GG CT AG CG AG TGG TT CT TCT GCG CT ACT GCT GCG CGA AT CGG CG AC CCC AGT G C CT CG ACC ACT AT GCG CG CT TT TC CT CG T CAG GA AG CC CT CG ACC CCA AT CGG AAG CCT AACT AC AG CG AG CT G CAG G ACT CT AAT CCA GAG TT AC CT CC AG CAG CG CC TAC G ACC AGG CC CAC CT GCT GG CAG CC AT CCC AC CT CC CG GAG ATC CT CA ACC CCA CCG C CT CG CT G CCA AT GCT CAT C TGG GACT CT GT CC CT GG CG CCCC AAG CCC AG CCA ATT G C CT GG G C CT CC CT CG GCT CC AGG GAG AT CCC AG GG TGG CAG AG CT GAC CT CC CT GT CAG AT GAG GAC AGT TGG A AAG GCT CCC AG CCCCC CAG CCC ACC CT CAC CGG CT CC TCG T CTT CT CCT

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>ACTTCAGTCTCTCCTGGAGGCCGAGGCCTAT      GCTGCCTTCCCAGGCTGGGCCAAGTGCCCAAG      CAGCTGGCCCAGCTCTGAGGCCAAGGATCTC      CAGGCTCGAAAGGCCTCAACTGCAAATACTGC      AACAAAGGAATACCTCAGCCTGGTGCCCTCAAG      ATGCACATCCGAAGCCACACGCTGCCCTGCGTC      TGCAGAACCTGCGGAAGGCCCTCTCTAGGCC      TGGCTGCTACAAGGCCATGTCCGGACCCACACT      GGCGAGAAGGCCCTCTCCTGTCCCCACTGCAGC      CGTGCCTTCGCTGACCGCTCCAACCTGCGGGCC      CACCTCCAGACCCACTCAGATGTCAAGAAGTAC      CAGTGCCAGGCCTGTGCTCGGACCTCTCCGA      ATGTCCCTGCTCCACAAGCACCAAGAGTCCGGC      TGCTCAGGATGTCCCCGCTGACCCCTGAGGCTC      CCTCTTCCCTCCATACCTGCCCTGCCTGACAG      CCTTCCCCAGCTCCAGCAGGAAGGACCCACAT      CCTTCTCACTGCCATGGAATTCCCTCTGAGTGC      CCCACTTCTGCCACATCAGCCCCACAGGACTT      TGATGAAGACCATTCTGGTTCTGTGTCCTCTG      CCTGGGCTCTGGAAGAGGCCCTCCATGGCCAT      TTCTGTGGAGGGAGGGCAGCTGGCCCCCAGGCC      TGGGGGATTCTCTGAGCTGGCCTGTCTGCGTGGG      TTTTGTATCCAGAGCTGTTGGATAACAGCTGCT      TTGAGCTACAGGACAAAGGCTGACAGACTCACT      GGGAAAGCTCCCACCCCACTCAGGGGACCCCACT      CCCCTCACACACACACCCCCCACAAGGAACCCCTC      AGGCCACCCCTCCACGAGGTGTGACTAACTATGC      AATAATCCACCCCCCAGGTGCAGCCCCAGGGCCT      GCGGAGGCGGTGGCAGACTAGAGTCTGAGATG      CCCCGAGCCCAGGCAGCTATTCTAGCCTCCTGT      TTGGTGGGTGGCACCTGTTCCCGGGCAATT      AACAAATGTCTGAAAAGGGACTGTGAGTAATGG      CTGTCACCTGTCGGGGGCCAAGTGGGGTGCTC      TGGTCTGACCGATGTGTCCTCCAGAACTATTCT      GGGGGCCCGACAGGTGGGCTGGGAGGAAGAT      GTTTACATTTAAAGGTACACTGGTATTATAT      TTCAAACATTGTATCAAGGAAACGTTITGTA      TAGTTATATGTACAGTTATTGATATTCAATAA      AGCAGTTAATITATATATTAAAAAA      AAAAAA</p>
75	Dkk1 mRNA	<p>GCAGAGCTCTGTGCTCCCTGCAGTCAGGACTCT      GGGACCGCAGGGGGCTCCCGACCCCTGACTCTG      CAGCCGAACCGGCACGGTTCTGTGGGGACCCA      GGCTTGCAAAGTGACGGTCATTCTCTTCTT      CTCCCTCTGAGTCCTCTGAGATGATGGCTCTG</p>

配列番号	説明	配列
		<p>GGCGCAGCGGGAGCTACCCGGGTCTTGTGCGCG  ATGGTAGCGGCGGCTCTCGGCGGCCACCCCTCTG  CTGGGAGTGAGCGCCACCTGAACCTCGGTTCTC  AATTCCAACGCTATCAAGAACCTGCCCGGACCG  CTGGCGGCCGCTGCGGGGCACCCAGGCTCTGCA  GTCAGCGCCQCGCCGGGAATCTGTACCCGGGC  GGGAATAAGTACCAGACCATTGACAACATACCA  GCCGTACCCGTGCGCAGAGGACGAGGGAGTGC  GCACTGATGAGTACTGCGCTAGTCCCACCCGCG  GAGGGGACGCAGGCGTGCAAATCTGTCTCGCCT  GCAGGAAGCGCCGAAAACGCTGCATGCGTCAC  GCTATGTGCTGCCCGGGAAATTACTGCAAAAT  GGAATATGTGTGTCTCTGATCAAAATCATTC  CGAGGAGAAATTGAGGAAACCATCACTGAAAG  CTTGTAATGATCAGCACCTGGATGGTA  TTCCAGAAGAACCAACCTGTCTCAAAATGTA  TCACACCAAAGGACAAGAACGGTTCTGTTGTCT  CCGGTCATCAGACTGTGCCTCAGGATTGTGTTG  TGCTAGACACTCTGGTCCAAGATCTGTAAACC  TGTCTGAAAGAACGGTCAAGTGTGTACCAAGCA  TAGGAGAAAAGGCTCTCATGGACTAGAAATATT  CCAGCGTTGTTACTGTGGAGAACGGTCTGTCTT  CCGGATACAGAAAGATCACCACATCAAGCCAGTA  ATTCTCTAGGCTTCACACTGTGAGAGACACT  AAACCAAGCTATCCAATGCAGTGAACCTCTT  ATATAATAGATGCTATGAAAACCTTTATGACC  TTCATCAACTCAATCTAAGGATATAACAGTC  TGTGGTTCAAGCATTCCAATAAACACCTT  CCAAAAACCTGGAGTGTAAAGAGCTTGTCTT  TATGGAACTCCCCTGTGATTGCAGTAAATTACT  GTATTGTAAATTCTCAGTGTGGCACTACCTGT  AAATGCAATGAAACTTTAATTATTTCTAAA  GGTGCTGCACTGCCTATTTTCTCTTGTATGT  AAATTGGTACACATTGATTGTATCTGACTG  ACAAATATTCTATATTGAACGTAAAGTAAATCAT  TTCAAGCTTATAGITCTAAAAGCATAACCCCTTA  CCCCATTTAATTCTAGAGTCTAGAACGCAAGGA  TCTCTGGAAATGACAAATGATAGGTACCTAAAA  TGTAAACATGAAAATACTAGCTTATTTCTGAAA  TGTACTATCTTAATGCTTAAATTATATTCTCCCTT  TAGGCTGTGATAGTTTGTGAAATAAAATTAAAC  ATTAAATATCATGAAATGTTATAAGTAGACATA  CATTTGGGATTGTGATCTAGAGGTTGTGTT  GTGTACGTATGTGTGTTACAAGAACGGAA  GTGTGATATGTTAAAGATGATCAGAGAAAAG</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		ACAGTGTCTAAATATAAGACAATATTGATCAGCTCTAGAATAACTTTAAAGAAAGACGTGTTCTGCATTGATAAACTCAAATGATCATGGCAGAATGAGAGTGAATCTTACATTACTACTTTCAAAAAATAGTTCCAATAAATTAATAACCTAAAAAAAAAA
76	Collal mRNA	TCGTCCGGAGCAGACGGGAGTTCTCCTCGGGGT CGGAGCAGGAGGCACGCCGGAGTGTGAGGCCAC GCATGAGCGGACGCTAACCCCCCTCCCCAGCCAC AAAGAGTCTACATGTCTAGGGTCTAGACATGTT CAGCTTGTCGGACCTCCGGCTCCTGCTCCTCTTA GCGGCCACCGCCCTCCTGACGCCACGGCCAAGA GGAAGGCCAAGTCGAGGGCCAAGACGAAGACA TCCCACCAATCACCTGCGTACAGAACGGCTCA GGTACCATGACCGAGACGTGTGGAAACCCGAG CCCTGCCGGATCTGCGTCTGCGACAAACGGCAAG GTGTGCGATGACGTGATCTGTGACGAGACC AAGAACTGCCCGGCCGAAGTCCCCGAGGG CGAGTGTGTCCTGCCCCGACGGCTCAGA GTCACCCACCGACCAAGAAACCACCGCGTCG AGGGACCCAAGGGAGACACTGGCCCCGAGGC CCAAGGGGACCCGCAGGCCCCCTGGCCGAGA TGGCATCCCTGGACAGCCTGGACTTCCGGACC CCCCGGACCCCCCGGACCTCCCGGACCCCCCTGG CCTCGGAGGAAACTTGCTCCCCAGCTGTCTTA TGGCTATGATGAGAAATCAACCGGAGGAATTTC CGTGCGTGGCCCCATGGTCCCTCTGGTCTCG TGGTCTCCCTGGCCCCCTGGTGCACCTGGTCC CCAAGGCTTCCAAGGTCCCCCTGGTGAGCCTGG CGAGCCTGGAGCTCAGGTCCCCTGGTCCCCG AGGTCCCCCAGGTCCCCCTGGAAAGAATGGAG ATGATGGGAAGCTGGAAAACCTGGTGTCTG GTGAGCGTGGCCTCCTGGCCTCAGGGTGCTC GAGGATTGCCCGAACAGCTGGCCTCCCTGGAA TGAAGGGACACAGAGGTTCACTGGTTGGATG GTGCCAAGGGAGATQCTGGTCTGCTGGTCTTA AGGGTGAGCCTGGCAGCCCTGGTAAAGAATGGA GCTCCTGGTCAGATGGGCCCCCTGGCCTGCT GGTGAAGAGAGGTGCCCTGGAGCCCCCTGGCCT GCTGGTGTCTGGAAATGATGGTGTACTGGT GCTGCCGGGCCCCCTGGTCCACCGGGCCCCGCT GGTCCCTGGCTTCCCTGGTGTGTTGGTGTCTA AGGGTGAAGCTGGTCCCCAAGGGCCCCGAGGC TCTGAAGGTCCCCAGGGTGTGCGTGGTGAAC GGCCCCCTGGCCTGCTGGTGTGCTGGCCT GCTGGAAACCCCTGGTGTGATGGACAGCCTGGT

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GCTAAAGGTGCCAATGGTGCTCCTGGTATTGCT      GGTGCTCCTGGCTTCCCTGGTGCCCGAGGCC      TCTGGACCCCAGGGCCCCGGCGGCCCTGGT      CCCAAGGGTAACAGCGGTGAACCTGGTGCCT      GGCAGCAAAGGAGACACTGGTCTAAGGGAGA      GCCTGGCCCTGTTGGTCAAGGACCCCCTGG      CCCTGCTGGAGAGGAAGGAAAGCGAGGAGCTC      GAGGTGAACCCGGACCCACTGGCCTGCCCGA      CCCCCCTGGCGAGCGTGGTGGACCTGGTAGCCGT      GGTTTCCCTGGCGCAAGATGGTGGTGCCTGGTCCC      AAGGGTCCCCTGGTGAACGTGGTCTCCTGGTGAAGCT      CCTGCTGGCCCCAAAGGATCTCCTGGTGAAGCT      GGTGCTCCGGTGAAGCTGGTCTGCCTGGTGCCT      AAGGGTCTGACTGGAAGCCCTGGCAGCCCTGGT      CCTGATGGAAAATGGCCCCCTGGTCCC      GGTCAAGATGGTCGCCCGGACCCCCAGGCC      ACCTGGTGCCGTGGTCAAGGCTGGTGTGATGGG      ATTCCCTGGACCTAAAGGTGCTGGAGAGCC      CGGCAAGGCTGGAGAGCGAAGGTGTTCCCGGAC      CCCCTGGCGCTGTCGGTCCCTGCTGGCAAAGATG      GAGAGGCTGGAGCTCAGGGACCCCCCTGGCC      GCTGGTCCCCTGGCAGAGAGAGGTGAACAAGG      CCCTGCTGGCTCCCCCGGATTCCAGGGTCTCCC      TGGTCTGCTGGTCCCTCCAGGTGAAGCAGGCAA      ACCTGGTGAACAGGGTGGTCTGGAGACCTTGG      CGCCCCCTGGCCCCCTGGAGCAAGAGGCGAGA      GAGGTTTCCCTGGCGAGCGTGGTGTGCAAGGTC      CCCCTGGCTCTGGTCTGGTCCCCGAGGGGCCAAG      GTGCTCCCGGCAACGATGGTCTAAGGGTGTGATG      CTGGTCCCCCTGGAGCTCCCCGTAGCCAGGGCG      CCCCTGGCTTCAGGAATGCCTGGTGAACGTG      GTGCAAGCTGGTCTTCCAGGGCTAAGGGTGAACA      GAGGTGATGCTGGTCCAAAGGTGCTGATGGCT      CTCCTGGCAAAGATGGCGTCCGTGGTCTGACTG      GCCCATGGTCTCTGGCCCTGCTGGTGC      CTGGTGACAAGGGTGAAGTGGTCCCAGCGGC      CCTGCTGGTCCCAGCTGGAGCTCGTGGTGC      GGAGACCGTGGTGA      GGCCTGGTCCCTGGGCCCCGGCC      GCTGGCTTGTGGCCCCCTGGTGTGACGGC      CAACCTGGTGTAAAGGCGAACCTGGTGTGCT      GGTGCTAAAGGCGATGCTGGTCCCCCTGGCC      GCCGGACCCGCTGGACCCCCCTGGCCCCATTGGT      AATGTTGGTGTCTGGAGGCCAAAGGTGCTCGC      GGCAGCGCTGGTCCCCCTGGTGTACTGGTT      CCTGGTGTCTGGCCGAGTCGGTCTCCTGGC   </p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>CCCTCTGGAAATGCTGGACCCCTGGCCCTCCT      GGTCTGCTGCAAAGAAGGCGGCAAAGGTCC      CCGTGGTGAGACTGGCCCTGCTGGACGTCTGG      TGAAGTTGGTCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCTGC      TGGCGAGAAAGGATCCCCTGGTGTGATGGTCC      TGCTGGTGCTCTGGTACTCCCGGGCCTCAAGG      TATTGCTGGACAGCGTGGTGTGGTCGGCCTGCC      TGGTCAGAGAGGGAGAGAGAGAGGGCTTCCTGGTCT      TCCTGGCCCTCTGGTGAACCTGGCAAACAAGG      TCCCTCTGGAGCAAGTGGTQAACGTGGTCCCCC      TGGTCCCCTGGGCCCCCTGGATTGGCTGGACC      CCCTGGTGAATCTGGACGTGAGGGGGCTCCTGG      TGCCGAAGGTTCCCCCTGGACGAGACGGTTCTCC      TGGCCTCAAGGGTGACCGTGGTGAAGACCGGCC      CCGCTGGACCCCTGGTGTCTGGTGTCTGG      GTGCCCTGGCCCCGGTGGCCCTGCTGGCAAGA      GTGGTGATCGTGGTGAAGACTGGTCTGCTGGTC      CGCCGGTCTGTCGGCCCTGTTGGCGCCCGTG      GCCCCGCCGACCCCAAGGCCCCCTGGTGAC      AAGGGTGAGACAGGGGAACAGGGCGACAGAGG      CATAAAGGGTCAACCGTGGCTCTCTGGCCTCCA      GGGTCCCCCTGGCCCTCTGGCTCTCTGGTGA      ACAAGGTCCCTCTGGAGCCTCTGGTCTGCTGG      TCCCCGAGGTCCCCCTGGCTCTGCTGGTGTCTCCT      GGCAAAGATGGACTCAACGGTCTCCCTGGCCCC      ATTGGGCCCCCTGGTCTCTCGCGGTGCACTGGT      GATGCTGGTCTGTTGGTCCCCCGGGCCCTCCT      GGACCTCCTGGTCCCCCTGGTCTCTGGCCT      GGTTCACTTCAGCTCCTGGCCAGCCACCTC      AAGAGAAGGCTCACGATGGTGGCCGCTACTAC      CGGGCTGATGATGCCAATGTGGTTCGTGACCGT      GACCTCGAGGTGGACACCACCCCTCAAGAGCCTG      AGCCAGCAGATCGAGAACATCCGGAGCCCAGA      GGGCAGCCGCAAGAACCCCGCCGACCTGCC      GTGACCTCAAGATGTGCCACTCTGACTGGAAAGA      GTGGAGAGTACTGGATTGACCCCAACCAAGGCT      GCAACCTGGATGCCATCAAAGTCTCTGCAACA      TGGAGACTGGTGAACCTGCGTGTACCCACTC      AGCCCAGTGTGGCCAGAACGAACTGGTACATC      AGCAAGAACCCCAAGGACAAGAGGCATGTCTG      GTTCGGCGAGAGCATGACCGATGGATTCCAGIT      CGAGTATGGCGGCCAGGGCTCCGACCCCTGCCGA      TGTGGCCATCCAGCTGACCTTCTGCGCCTGAT      GTCCACCGAGGCCTCCAGAACATCACCTACCA      CTGCAAGAACAGCGTGGCCTACATGGACCAAGC     </p> <p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">20</p> <p style="text-align: right;">30</p> <p style="text-align: right;">40</p>

配列番号	説明	配列
		<p>AGACTGGCAACCTCAAGAAGGCCCTGCTCCTCC AGGGCTCCAACGAGATCGAGATCCGCCGAG GGCAACAGCCGCTTCACCTACAGCGTCACTGTC GATGGCTGCACGAGTCACACCGGAGCCTGGGG CAAGACAGTGATTGAATACAAAACCACCAAGA CCTCCCGCTGCCCATCATCGATGTGGCCCCCT TGGACGTTGGTGGCCAGACCAAGGAATTGGCT TCGACGTTGGCCCTGTCTGCTTCCTGAAACTCC CTCCATCCCAACCTGGCTCCCTCCCACCCAACC AACTTTCCCCCAACCCGGAAACAGACAAGCA ACCCAAACTGAACCCCCCTCAAAGCCAAAAAA TGGGAGACAATTACATGGACTTGGAAAATA TTTTTTCTTGCATTCATCTCTCAAACCTAGTT TTTATCTTGACCAACCGAACATGACCAAAAAC CAAAAGTGCATTCAACCTTACCAAAAAAA AAAAAAAAAGAATAAATAAAACTTTTAAA AAAGGAAGCTGGTCCACTTGCTTGAAGACCCA TGCAGGGGTAAGTCCCTTCTGCCGTTGGGCT TATGAAACCCAATGCTGCCCTTCTGCTCCTT CTCCACACCCCCCTGGGGCCTCCCTCCACTC CTTCCCAAATCTGTCTCCCCAGAAGACACAGGA AACAAATGTATTGCTGCCAGCAATCAAAGGCA ATGCTCAAACACCCAAAGTGGCCCCCACCTCAG CCCGCTCTGCCGCCAGCACCCCCAGGCC GGGGGACCTGGGGTCTCAGACTGCCAAAGAA GCCTTGCATCTGGCGCTCCCATGGCTTTGCA ACATCTCCCTCGTTTGAGGGGGTCAATGCC GGGGGAGCCACCAGCCCCACTGGGTTGG GGAGAGTCAGGAAGGGCCACGACAAAGCAGAA ACATCGGATTGGGAACGGGTGTCAATCCCTT GTGCCGCAGGGCTGGGGAGAGACTGTTCT GTTCTTGTGTAAGTGTGTGCTGAAAGACTAC CTCGTTCTGTCTGATGTGTACCGGGGCAACT GCCTGGGGCGGGGATGGGGCAGGGTGGAAAG CGGCTCCCCATTITATACCAAAAGGTGCTACATC TATGTGATGGGTGGGGTGGGGAGGGAAATCACT GGTGCTATAGAAATTGAGATGCCCCCCCAGGCC AGCAAATGTTCCCTTGTCAAAGTCTATTIT ATTCCCTGATATTCTTTTTTTTTTTTTTT GTGGATGGGGACTTGTGAATTCTAAAGGTG CTATTAAACATGGGAGGAGAGCGTGTGCGGCTC CAGCCCAGCCGCTGCTCACTTCCACCCCTCT CCACCTGCCTCTGGCTCTCAGGCCTGCTCTC CGACCTCTCTCCTGAAACCCCTCCACAGC TGCAGCCCACCTCTCCGGCTCCCTCTAGTCTGT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		CCTGCGTCCTCTGTCCCCGGGTTCAAGAGACAA CTTCCCAAAGCACAAAGCAGTTTCTCCCCTAG GGGTGGGAGGAAGCAAAAGACTCTGTACCTAT TTTGTATGTGTATAATAATTGAGATGTTTAA TTATTITGATTGCTGGAATAAAGCATGTGGAAA TGACCCAAACATAA
77	アクチビンA mRNA	ATGCCCTTGCTTGGCTGAGAGGATTCTGTTG GCAAGTTGCTGGATTATAGTGAGGAGTTCCCC ACCCCAGGATCCGAGGGGCACAGCGCGCCCC CGACTGTCCGTCTGTGCGCTGGCCGCCCTCCC AAAGGATGTACCCAACCTCTCAGCCAGAGATGGT GGAGGCCGTCAAGAACACATTAAACATGCT GCACTTGAAGAACAGACCCGATGTCACCCAGC CGGTACCCAAGGCAGCGCTCTGAACCGCGATCA GAAAGCTTCATGTGGCAAAGTCGGGGAGAAC GGGTATGTGGAGATAGAGGATGACATTGGAAG GAGGGCAGAAATGAATGAACATTATGGAGCAGA CCTCGGAGATCATCACGTTGCCGAGTCAGGTT GGTGCTGGCATTGGCAGGGGGTGGGGAGGGT GGGGGTGGGAGGGTAAAATATATTCTTGTAC AGTCCCAGGAGGAACCTCTTCCCTTCAGCTG GAAACTGCCTGGAAAGTTATTAGTTATTAGGT GATGGTAGCGGACTAGCCGACGGAGGGCAGGC AGGGGAGGGGGAGAGGACTTACAGAAAAGGA ATTCTCGGTGAGCTCTGCCTGGAGATGACTGG CTTACACTTACTAAACCCAGCGGGTCACACAGA GAGGAAGCTCGGGCCAATGTTGAGCTGGAAG GCAGACTGTGAGGGGCTGCCTGCCCTGCCTGT GAAACAGATCTGAGCAGCCGGAGGAAAGCCGC GGCATTTCGGGTGCTAGGGGAGCAGAGGAGG CTTCCGGACCCATCCAAGTTTATTGAGGGT AGAGGGGTGAATGTACCAAGGATTGGAGTGGAA TGGCACAGATGAAGTCACTCTTAAACAAAC CTTCCCTTAAAAGTCCAATCTGGGCCACAT TGGAGAACAGGGCATATTATGAGTGACAGTC ATTITACCTTAGAAAATGTCCTATAAGTCAC AGGCACCACATTCAAGACAGGGAAAGAGCTACT TTGGGGACAGTTGTCTTAAGACCAGCAGTTAC TTTGGGACACTGACTTTGCTCTGAAAGAA AAAAAAATAAATAAAACAACCAGTTTGTCTT TCTAAAGTTACTAAGAGCTCTGCCAAGGAAC GAACCTTGACAAAGTACTCTCAGATACTACGCT GAAGTCACTCAATCTTAAGAGGAAGAAG
78	Snai1プライマー1	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA
79	Snai1プライマー2	AGATGAGCATTGGCAGCGAG

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
80	Dkk1プライマー1	CCTTGAACTCGGTTCTCAATTCC
81	Dkk1プライマー2	CAATGGTCTGGTACTTATTCCCG
82	Colla1プライマー1	GAGGGCCAAGACGAAGACATC
83	Colla1プライマー2	CAGATCACGTCATCGCACAAAC
84	アクチビンプライマー1	TCATCACGTTGCCGAGTCA
85	アクチビンプライマー2	GCTAGTCCGCTACCATCACC
86	ヒトAxin2 mRNA	ACTGGCTCCGCGAGCCTGGCCCCGGGGAGTCG GCTGGAGCCGGCTGCCTTGATAAGGTCTGG CAACTCAGTAACAGCCCCGAGAGCCGGGAAATA AAAATAACCCCTCAGAGCGATGGATTTCGGGGC CGCCCCGGCGGCCGAGGCCGCCGAAGGCC TGCTGTAAAAGAGAGGGAGGTTAGATGAGCCC CTGCTGACTTGAGAGAGACAGAGAGAGACCACGC CGATTGCTGAGAGGAACGGAAAGAAGAAAAAT TCCCAGACTCAGTGGGAAGAGCTCCCTCACCAT GAGTAGCGCTATGTTGGTACTTGCCTCCCGA CCCCAGCAGCAGCTCCGTGAGGATGCCCGCG GCCCCCCAGTGCCAGGGGAAGAAGGGGAGACCC CACCGTGTCAAGCCAGGGTGGCAAGGGCCAG GTCACCAAACCCATGCCTGTCTCTTCCAACACC AGGCGGAACGAAGATGGGTTGGGGAGCCGGA GGGGCGGGCATCTCCGGATTCCCTCTGACCCG GTGGACCAAGTCTTACACTCCTTATTGGCGA TCAAGACGGTCTTACCTGTTCCGAACCTTCT GGAGAGGGAGAAATCGTGGATACTTAGACT TCTGGTTGCCTGCAATGGATTAGGCAGATGA ACCTGAAGGATAACAAAACCTTACGAGTAGCCA AAGCGATCTACAAAAGGTACATTGAGAACAAAC AGCATTGTCTCCAAGCAGCTGAAGCCTGCCACC AAGACCTACATAAGAGATGGCATCAAGAAC GCAGATTGATTCCATCATGTTGACCAGGGCGCA GACCGAGATCCAGTCGGTGTGGAGGAAAATG CCTTACAGATGTTTGACTTCTGATATATACCT CGAATATGTGAGGAGTGGGGAGAAAACACAG CTTACATGAGTAATGGGGACTCGGGAGCCTAA AGGTCTGTGTGGCTATCTCCCCACCTGAATG AAGAAGAGGAGTGGACTTGTGCCACTTCAAG TGCAAACCTTCGCCAACCGTGGTTGGCTGTCC AGCAAAACTCTGAGGGCCACGGCGAGTGTGAG GTCCACGGAAACTGTTGACAGTGGATACAGGTC CTTCAAGAGGAGCGATCCTGTTAATCCTTATCA CATAGGTCTGGCTATGTCCTTGCACCAAGCCAC CAGCGCCAACGACAGTGAGATATCCAGTGATG CGCTGACGGATGATTCCATGTCCATGACGGACA GCAGTGTAGATGGAATTCCCTCCTTATCGTGTGG

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GCAGTAAGAACAGCTCCAGAGAGAAATGCAT      CGCAGTGTGAAGGCCAATGGCCAAGTGTCTCTA      CCTCATTTCCCGAGAACCCACCGCCTGCCAAG      GAGATGACCCCCGTGGAACCCGCCACCTTGCA      GCTGAGCTGATCTCGAGGCTGGAAAAGCTGAA      GCTGGAGTTGGAGAGGCCACAGCCTGGAGG      AGCGCCTGCAGCAGATCCGAGAGGGATGAAGAG      AGAGAGGGCTCCGAGCTCACACTCAATTGGCGG      GAGGGGGCGCCCACGCAGCACCCCTCTCCCTA      CTGCCCTCCGGCAGCTACGAGGAAGACCCGCA      GACGATACTGGACGATCACCTGTCCAGGGTCT      CAAGACCCCTGGCTGCCAGTCTCCAGGCGTAGG      CCGCTATAGCCCCGCTCCGCTCCCGACCA      CCACCACCAACCATTGCAAGTACCAACTCCCT      GCTCCGCCGGGTGGCAAGCTGCCTCCGGCGC      CGCCTCGCCGGCGCCTGCCCTCTCGGGGG      CAAAGGCTTGTGACCAAGCAGACGACGAAGC      ATGTCCACCACCACTACATCCACCACTGCG      TCCCCAAGACCAAGGAGGAGATCGAGGCGGAG      GCCACGCAGCGGTGCACTGCTCTGCCCTGGG      GGCACGCAGTATTACTGCTACTCGAAATGCAA      AGCCACTCCAAGGCTCCGAAACCATGCCAG      CGAGCAGTTGGCGGCAGCAGAGGCAGTACCTT      GCCCAAACGCAATGGGAAAGGCACGGAGCCGG      GCCTGGCCCTGCCGCCAGGGAAAGGAGGGGCC      CCCGGCGGAGCTGGGCCCTGCAGCTCCCCGG      GAGGAAGGAGACAGGTCGAGGATGTCTGGCA      GTGGATGCTGGAGAGTGAGCGGCAGAGCAAGC      CCAAGCCCCATAGTGCCAAAGCACAAAAAAAG      GCCTACCCCTGGAGTCTGCCGCTCGTCTCCA      GGCAGACGAGCCAGCCGGCACCATCTGTGGGG      GGGCAACAGCGGGCACCCCCCGCACACCCCCC      GTGCCACCTGTTCAACCAGGACCCCTGCGATGC      CTCCCTGACCCCACCAACACGCTGGCTCAGC      TGGAGGAGGCCTGTCGAGGCTAGCTGAGGTGT      CGAACCCCCAAAGCAGCGGTGCTGTGGGCC      AGTCAGCAGAGGGACAGGAATCATTGGCCAC      TGTTCAAGCAGGGAGCACACCCCTCTCCAATCC      AAGCCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGAGCCAA      AGAAACTGGCAGGTGTCACGCCAGCGCTCCAGGCC      AGTGAGTTGGTTGTCACTTACTTTCTGTGGGG      AAGAAATTCCATACCGGAGGATGCTGAAGGCT      CAGAGCTTGACCCCTGGGCCACTTAAAGAGCAG      CTCAGAAAAAGGGAAATTATAGGTATTACTTC      AAAAAGCAAGCGATGAGTTGCCTGTGGAGC</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		<p>GGTGTGAGGAGATCTGGGAGGAATGAGACGG  TGCTCCGATGTATGAAGGCCGGATTCTGGGCA  AAGTGGAGCGGATCGAATGAGCCCTGGGCTG  GCTTGGTGAACGTGGAGCCGAAGCTCTG  TGAACTGTCTGGCTGTGAGCAACTGCGACAAA  ACATTGAAGGAAAATTAAACCAATGAAGAA  GACAAAGTCTAACCGAAGAACATCGGCCAGTGGC  CTTCGGGAGGGCGGGGGGAGGTTGATTTCATG  ATTCACTGAGCTGGTACTGACTGAGATAAGAAA  AGCCTGAACATTTATTAAAAACATGACCACTC  TTGGCTATTGAAGATGCTGCCTGTATTGAGAG  ACTGCCATACATAATATATGACTTCCTAGGGAT  CTGAAATCCATAAACTAAGAGAAAATGTGTATA  GCTTACCTGAACAGGAATCCTACTGATATTAA  TAGAACAGTTGATTCCCCCATCCCCAGTTAT  GGATATGCTGCTTAAACTTGAAGGGGGAGAC  AGGAAGTTTAATTGTTCTGACTAAACTTAGGA  GTTGAGCTAGGAGTGCCTCATGGTTCTCAC  TAACAGAGGAATTATGCTTGCACACTACGTCCCT  CCAAGTGAAGACAGACTGTTAGACAGACTTT  TTAAAATGGTGCCTTACCATGACACATGCAGA  AATTGGTGCCTTGTCTTCTTCTTCTATGCTG  CTCTGTTTGTCTTAAAGGTCTTGAGGGTTGACC  ATGTTGCGTCATCATCACATTGGGGTTGT  GTTGGATGGGATGATCTGTTGCAGAGGGAGAG  GCAGGGAACCTGCTCCTCGGGCCCCAGGTTG  ATCCTGTGACTGAGGCTCCCCCATGTAGCCT  CCCCAGGCCAGGGCCCTGAGGCCTGCTAGAAT  CACTGCCGCTGTGCTTCGTGAAATGACAGTT  CCTTGTCTTCTGTTCTGTTCTGTTTACATT  AGTCATTGGACCACAGCCATTGAGGAACACTACCC  CCTGCCCAACAAAGAAATGAACAGTTGAGGG  AGACCCAGCAGCACCTTCCTCCACACACCTTC  ATTITGATGTTGGGTTTGTGTTAAGTTAAC  TGTACATTCTGTTGCCATTGTTACTTGTACTAT  ACATCTGTATATAGTGTACGGAAAAGAGTATT  AATCCACTATCTCTAGTGCTTGACTTAAATCA  GTACAGTACCTGTACCTGCACGGTCACCCGCTC  CGTGTGTCGCCCTATATTGAGGGCTCAAGCTT  CCCTTGTCTTGTAAAGGGTTATGTATAAATA  TATTTATGCCCTTATTACAAGTCTGTACTC  AATGACTTTGTCTGACATTTGTTACTTAT  ACTGTAATTATGCATTATAAAGAGTCTATT  AGGAAAATTACTGGTACAATAATTATTGTAAT  TAAGAGATGTAGCCTTATTAAAATTTTATATT</p>

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
87	ヒトAxin2アミノ酸配列	TTCAAAAAAAAAAA MSSAMLVTCLPDPSRFREDAPRPPVPGEGETPP CQPGVGKGQVTKPMPVSSNRRNEDGLGEPEGR ASPDSPTRWTKSLHSLLGDQDGAYLFRTFLERE KCVDTLDFWFACNGFRQMNLKDTKTLRVAKAIY KRYIENNSIVSKQLPATKTYIRDGIKKQQIDSIMF DQAQTEIQSVMEEENAYQMFLTSIDIYLEYVRSGGE NTAYMSNGGLGSLKVVCGYLPTLNEEEETCAD FKCKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETVDSGYRS FKRSDPVNPYHIGSGYVFAPATSANDSEISSDALT DDSMSMTDSSVDGIPPYRVGSKKQLQREMHRSV KANGQVSLPHFPRTHRLPKEMTPVEPATFAAELIS RLEKLKLELESRHSLEERLQQIREDEERESELTLN SREGAPTQHPLSLLPSGSYEEDPQTILDDHLSRVL KTPGCQSPGVGRYSPRSRSPDHHHHHHSQYHSLL PPGGKLPPAAASPGACPLGGKGFVTQTTKHVH HHYIHHHAVPKTKEEIEAEATQRVHCFCPGGSEY YCYSKCKSHSKAPETMPSEQFGGSRGSTLPKRNG KGTEPGLALPAREGGAGPGAGALQLPREEGDRSQ DVWQWMLESERQSKPKPHSAQSTKKA YPLESAR SSPGERASRHHWGGNSGHPRITPRAHLFTQDPA MPPLTPPNTLAQLEEACRRLAEVSKPPKQRCCVA SQQRDRNHSATVQTGATPFSNPSLAPEDHKEPKK LAGVHALQASELVVTYFFCGEEIPYRRMLKAQSL TLGHFKEQLSKKGNYRYYFKKASDEFACGAVFEE IWEDETVLPMYEGRILGKVERID

10

20

30

## 【0560】

## (11. 等価物)

本発明は、その具体的な実施態様に関して詳細に記載されているが、機能的に等価であるバリエーションが本発明の範囲内にあることが理解されるであろう。実際、本明細書に示され、記載されたものに加えた本発明の様々な変更は、前述の説明及び付随する図面から当業者に明らかになるであろう。そのような変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施態様の多くの等価物を認識するか、又はルーチンの実験だけを用いて、それらを確認することができるであろう。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

40

## 【0561】

本明細書に言及された全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各々の個々の刊行物、特許、又は特許出願が、その全体として引用により具体的かつ個別に組み込まれることが示される場合と同じ程度に、引用により本明細書中に組み込まれる。

【図1】

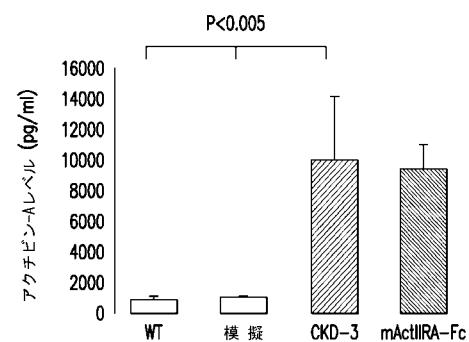


図1A

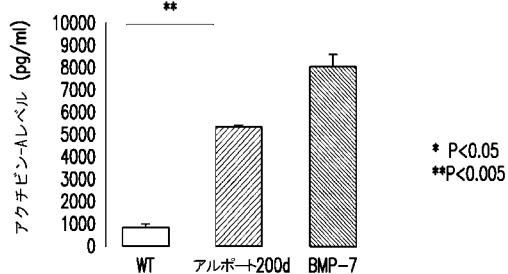


図1B

【図2】

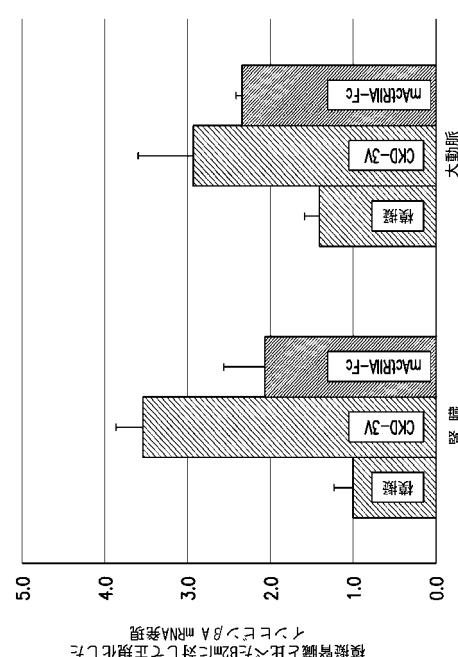


図2

【図3】

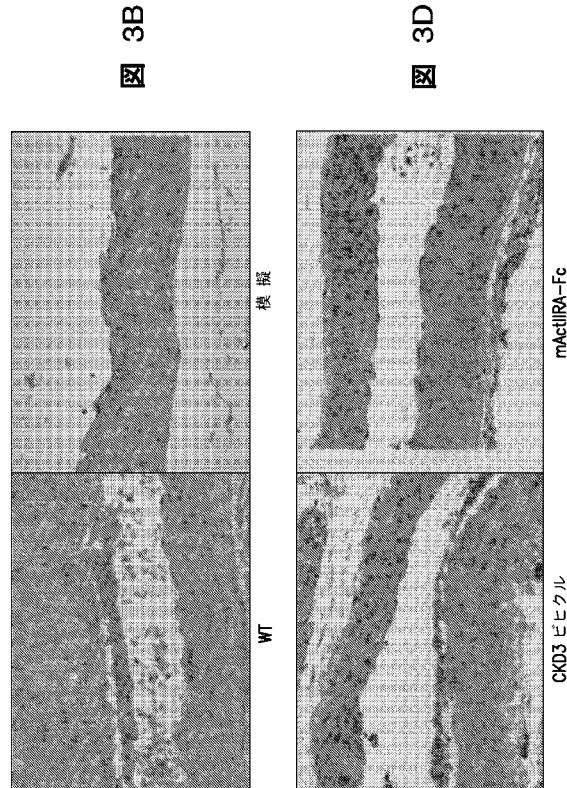


図3A

図3C

図3D

【図4 A - E】

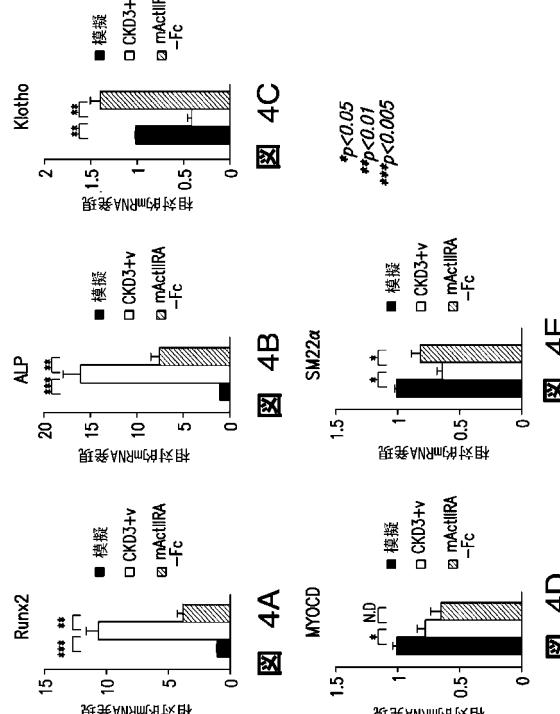


図4C

図4B

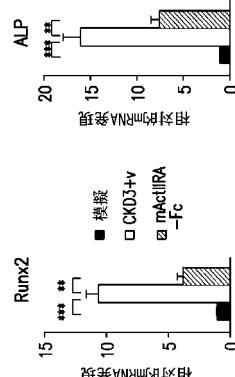


図4A

図4D

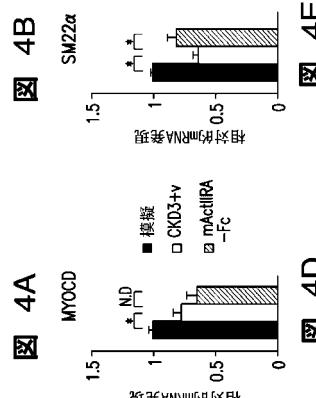


図4E

【図 4 F】

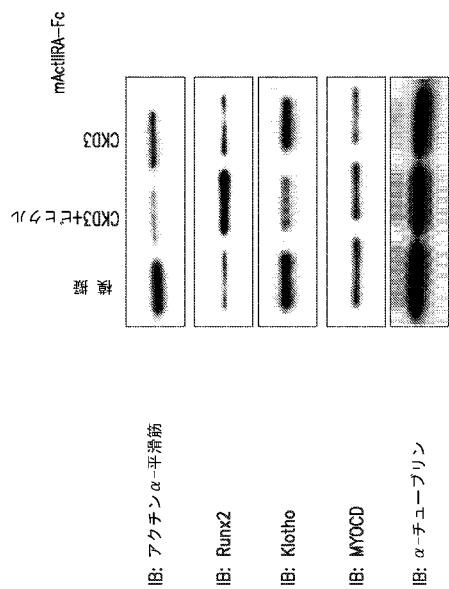
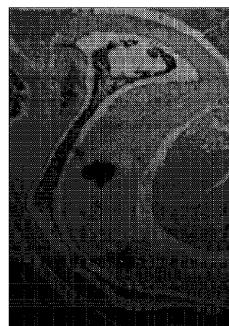
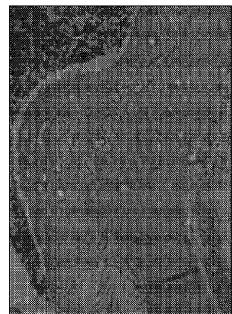


図 4F

【図 5 A】

CKD-3 ve Rx  
FIG. 5A

【図 5 B】

CKD-3 mActRIIA-Fc Rx  
FIG. 5B

【図 6 A - B】

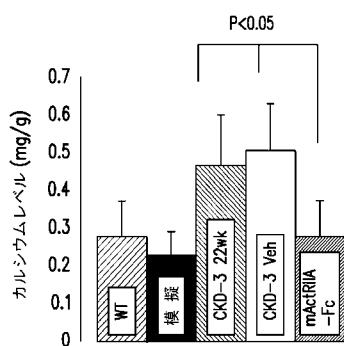


図 6A

【図 6 C】

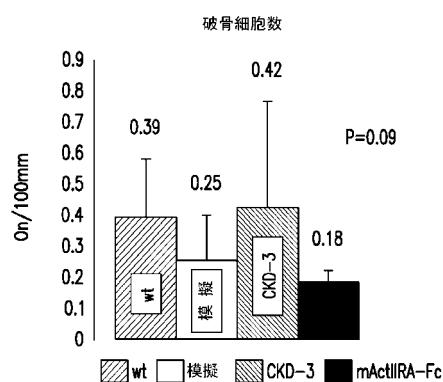


図 6C

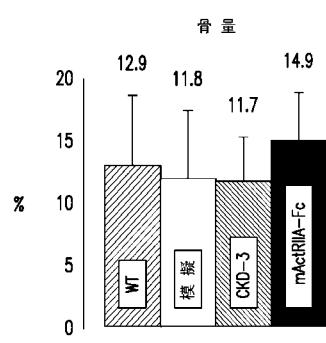


図 6B

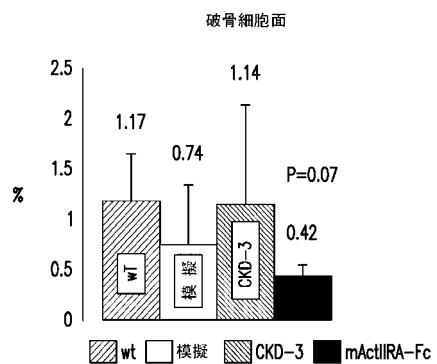


図 6D

【図 7 A】

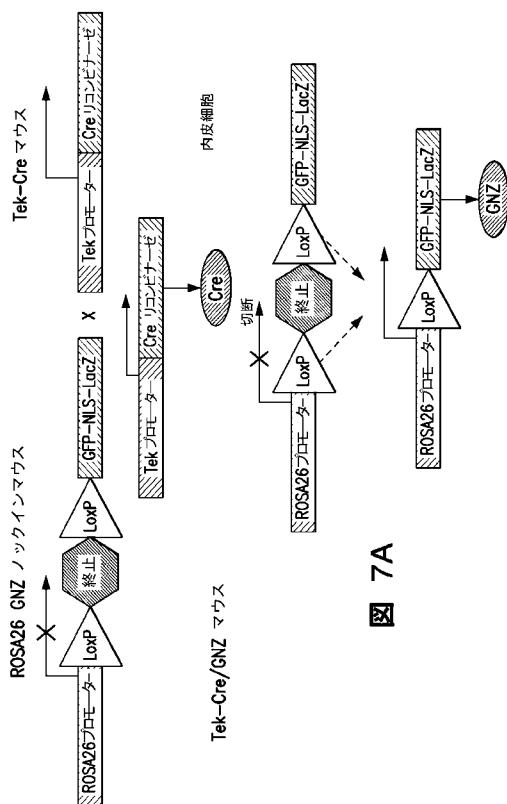


図 7A

【図 7 B】

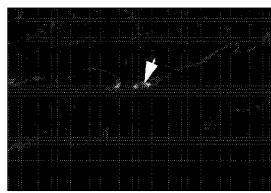


FIG. 7B

【図 7 C】

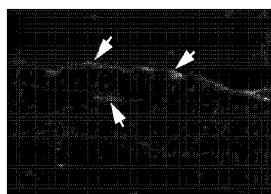


FIG. 7C

【図 7 D】

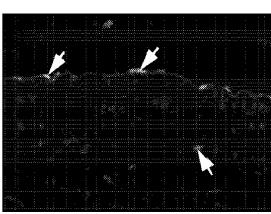


FIG. 7D

【図 8】

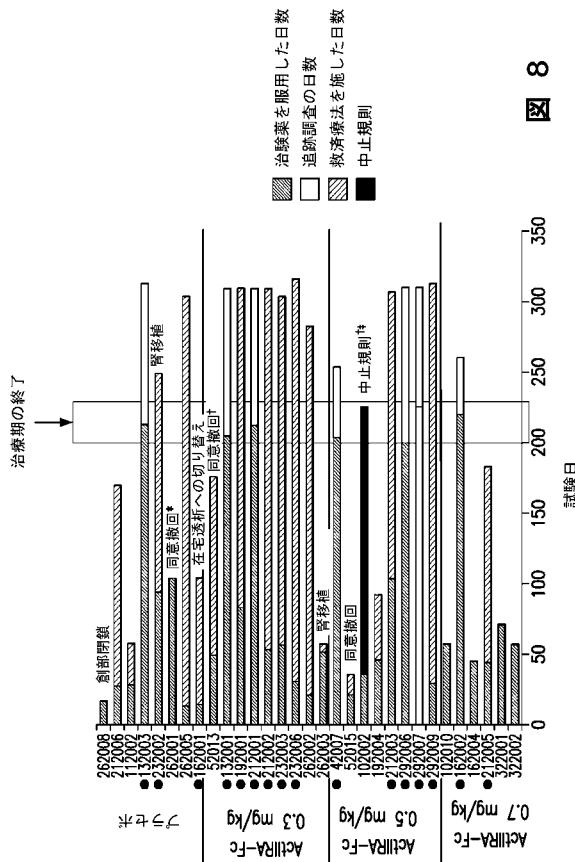


図 8

【図 9 A】

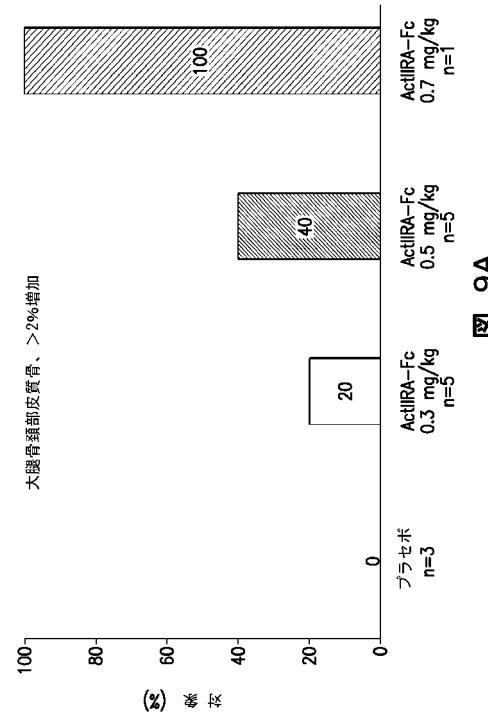


図 9A

【図 9 B】

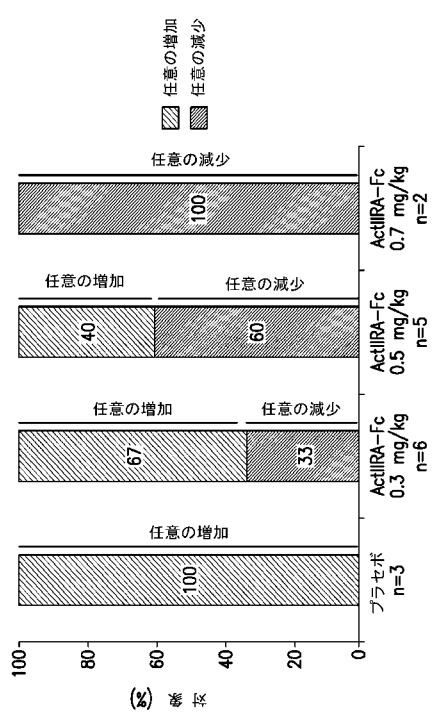


図 9B

【図 10 A】

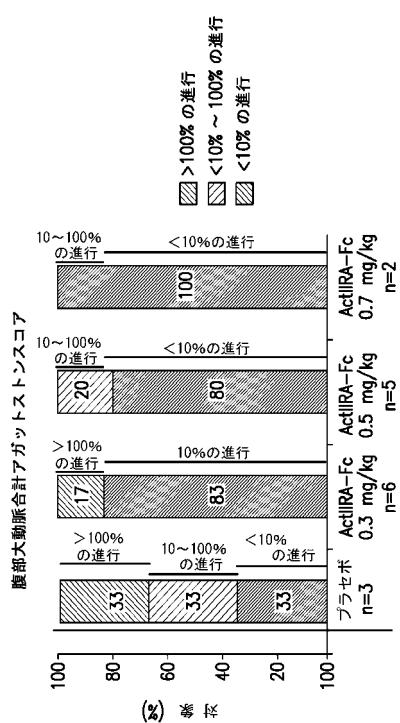


図 10A

【図 10 B】

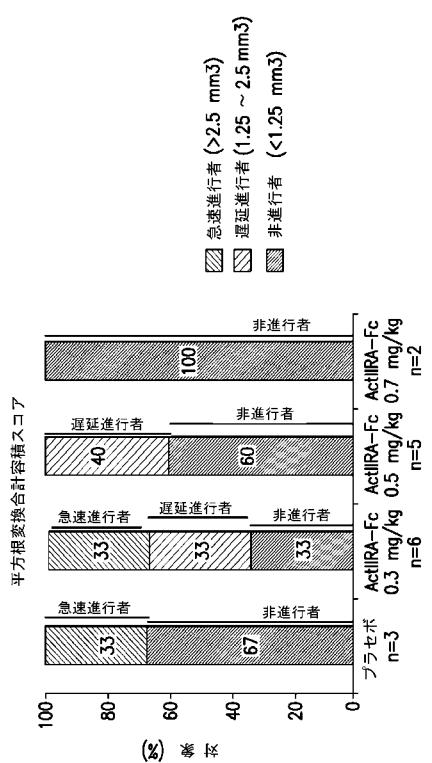


図 10B

【図 11】

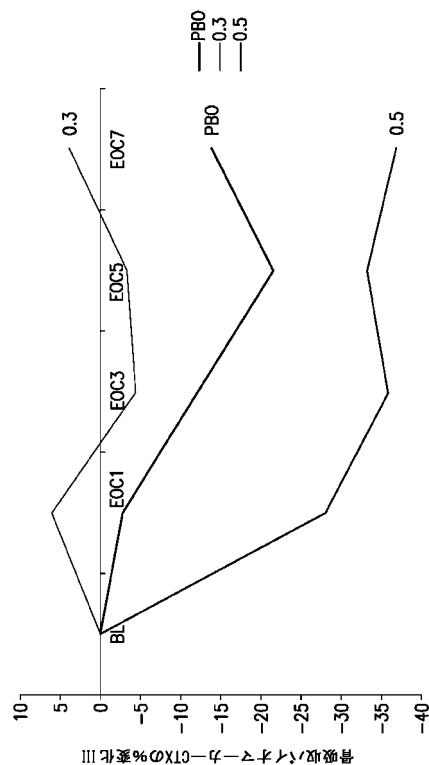


図 11

EOC = 接与サイクルの終了

【図 12A - B】

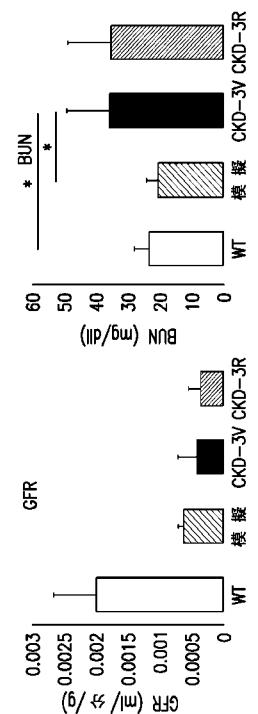


図 12B

図 12A

【図 12C - D】

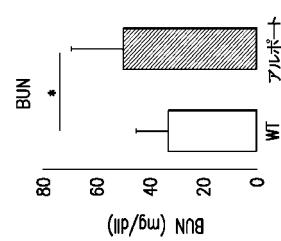


図 12D

図 12C

【図 13A - B】

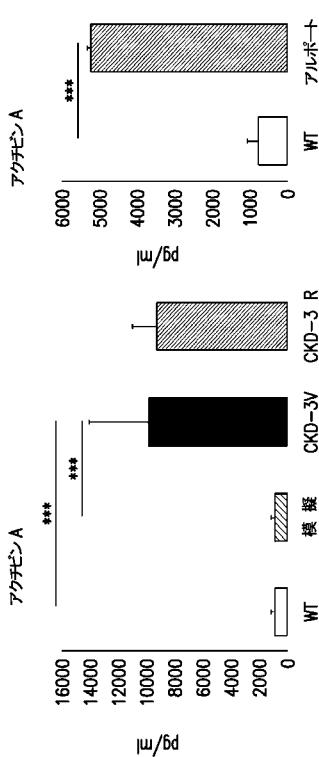


図 13B

図 13A

【図 13C - E】

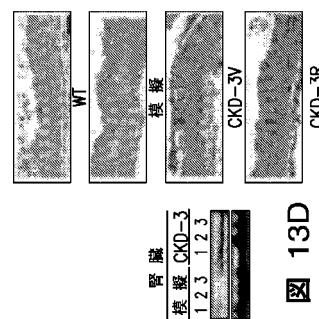
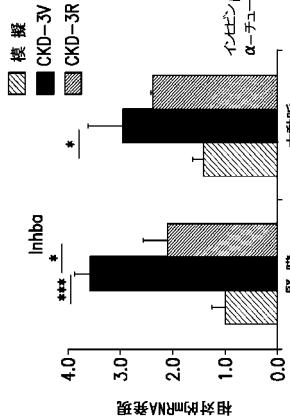


図 13E

図 13D

図 13C



【図 13 F - G】

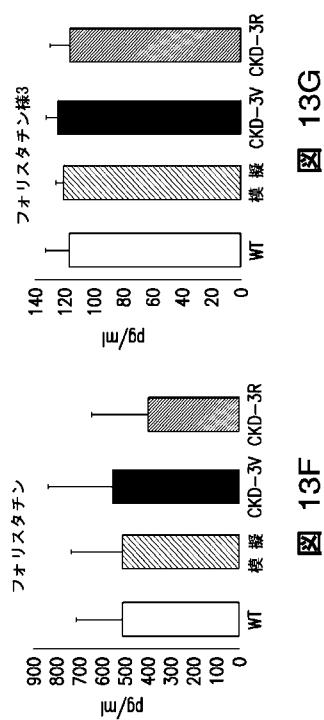


図 13F

【図 14 A - B】

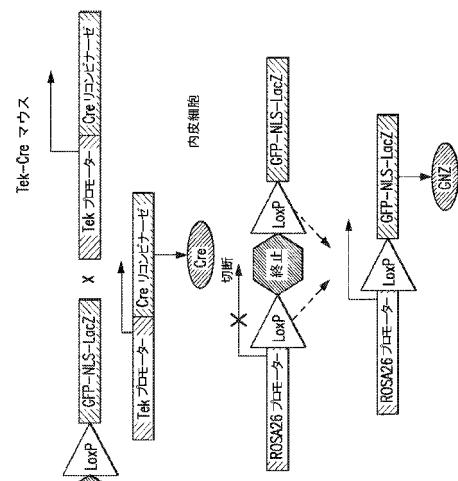


図 13G

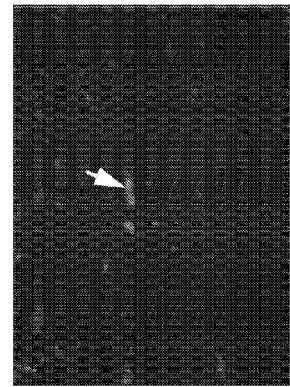
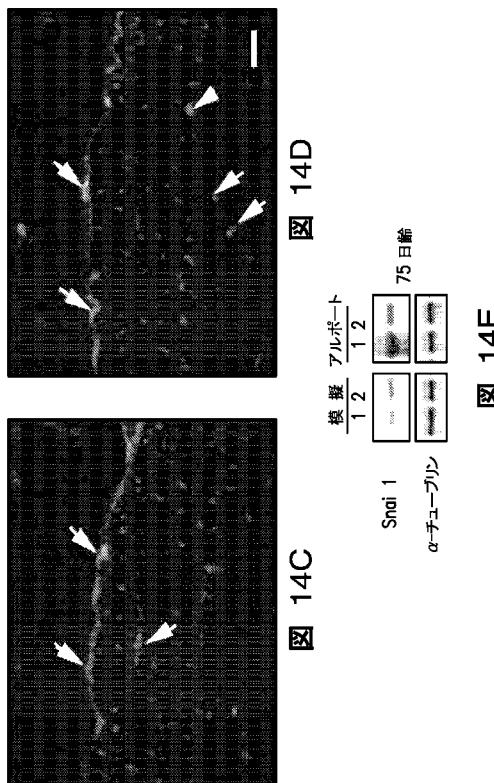
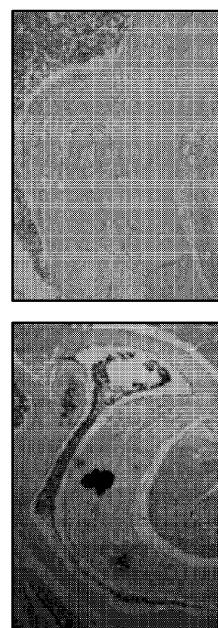


図 14B

【図 14 C - E】



【図 15 A】



【図 15B】

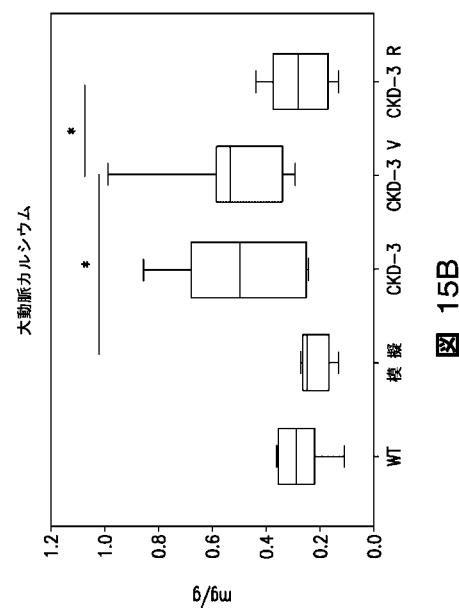


図 15B

【図 16】

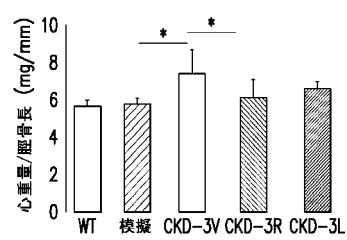


図 16A

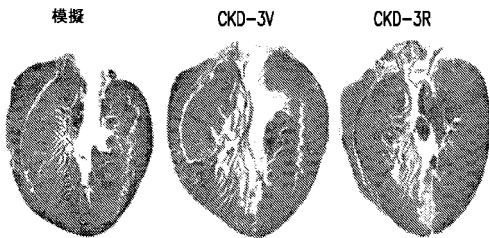


図 16B

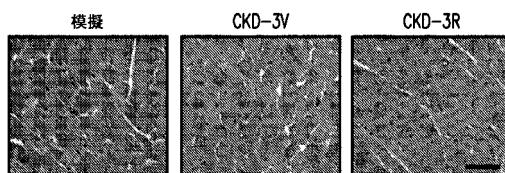


図 16C

【図 17】

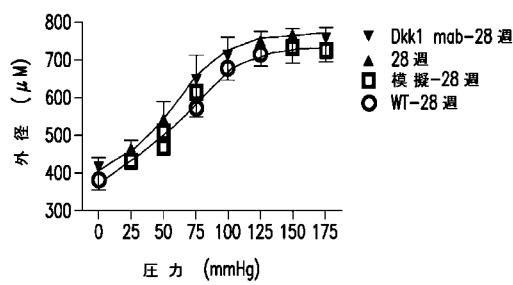


図 17A

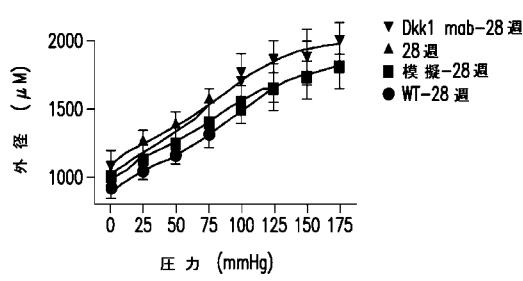


図 17B

【図 18A - B】

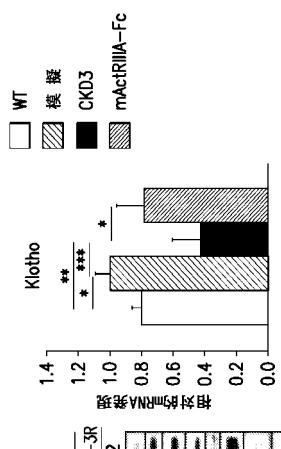


図 18A

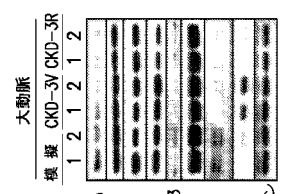
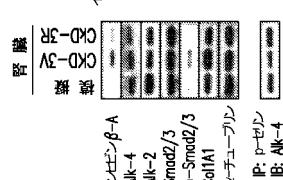


図 18B



【図 18C】

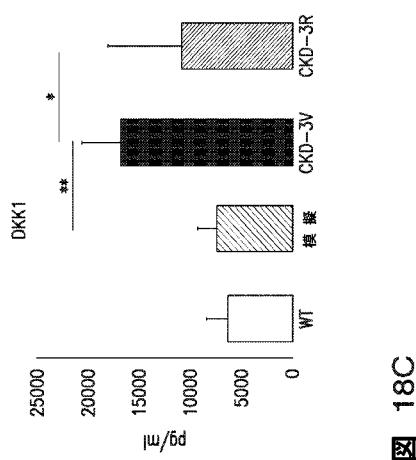


図 18C

【図 19】

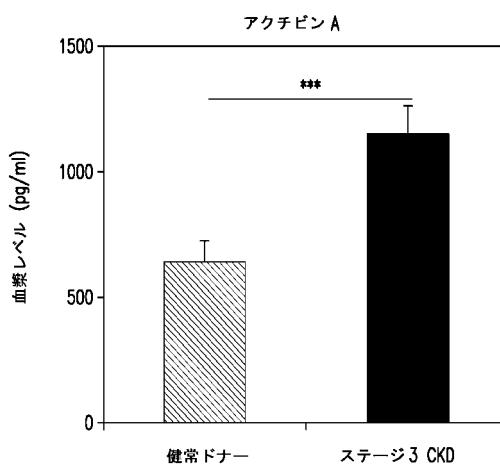
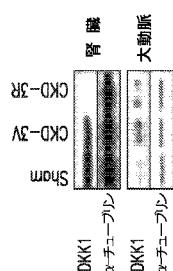


図 19



【図 20】

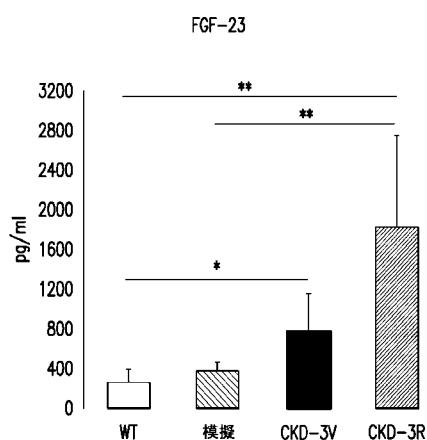


図 20

【図 21A - B】

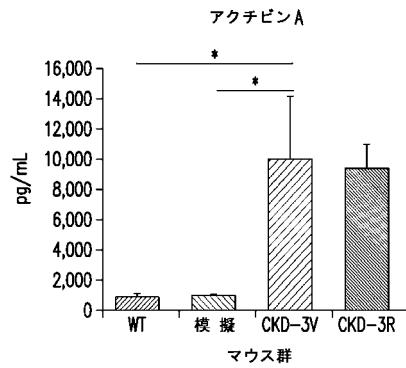


図 21A

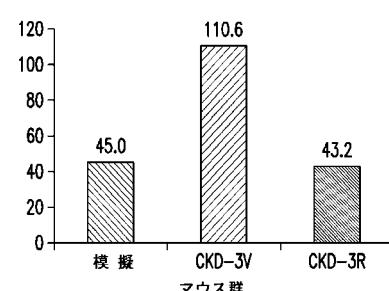


図 21B

【図 2 1 C - D】

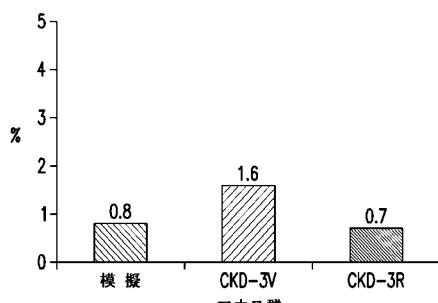


図 21C

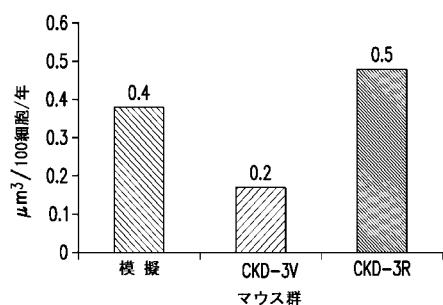


図 21D

【図 2 2 B - C】

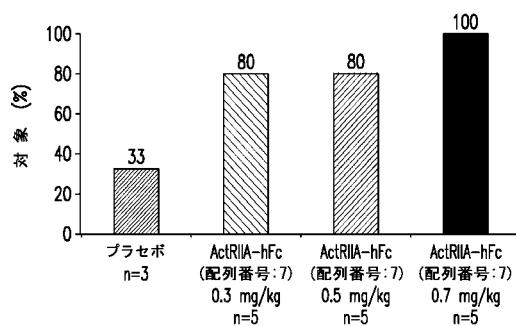


図 22B

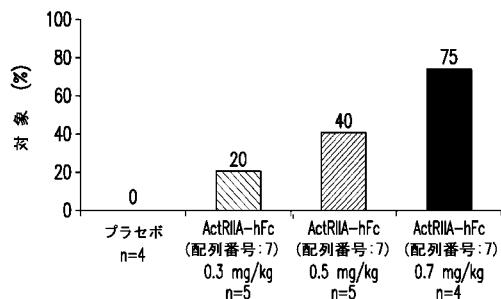
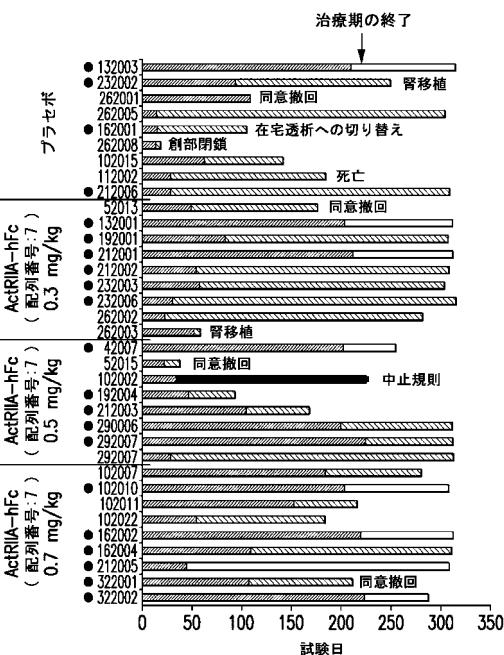


図 22C

【図 2 2 A】



注: 「▼」は、ベースライン時と225日目にペアのQCT測定を行った対象を示す。

\*試験108日目に同意を撤回した1人のプラセボ対象は試験148日目に死亡し、救済療法を受けていた1人のプラセボ対象は186日目に死亡した。

プロトコル違反

対象は、29日目に血圧上昇に関する中止規則基準を満たし、治験を中止し、救済療法を36日目に施し、追跡調査を継続した。対象には、ベースライン時に、不完全な評価に基づいて、非適格血圧に関する誤差を無作為に割り付けた。

図 22A

【図 2 3】

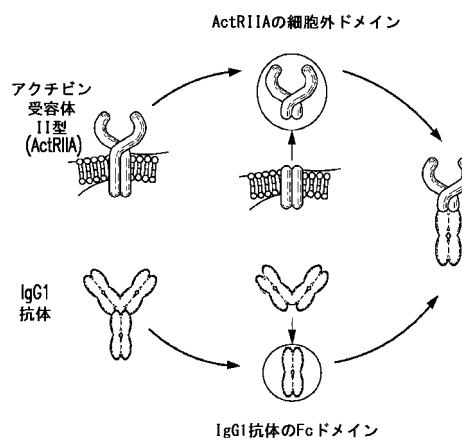


図 23A

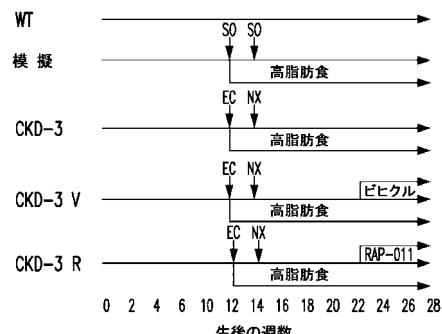


図 23B

【図 24 A - B】



図 24A

【図 24 C】

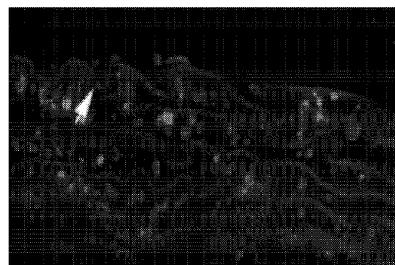


FIG. 24C

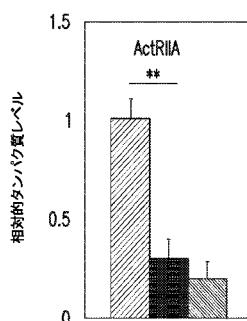


図 24B

【図 24 D】

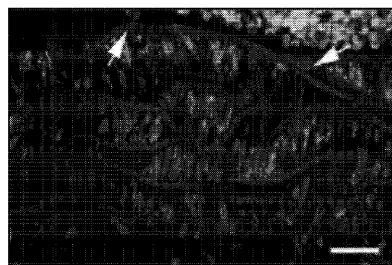


FIG. 24D

【図 25 A】

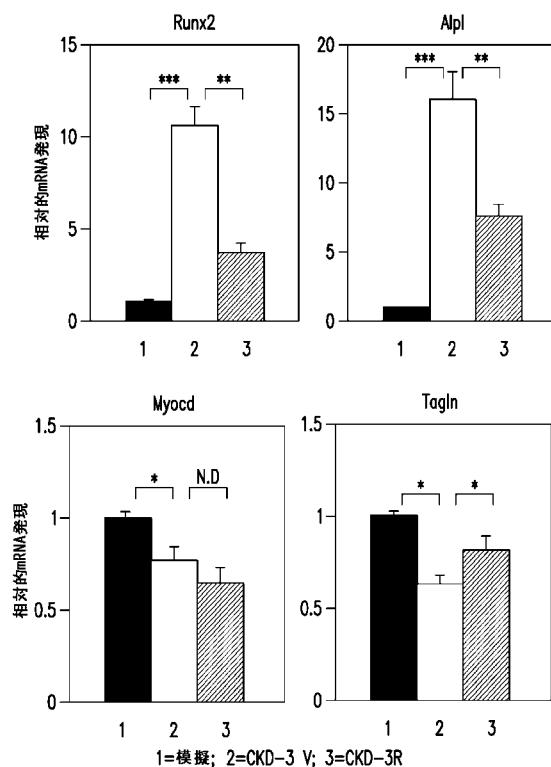


図 25A

【図 25 B - C】

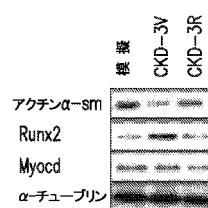
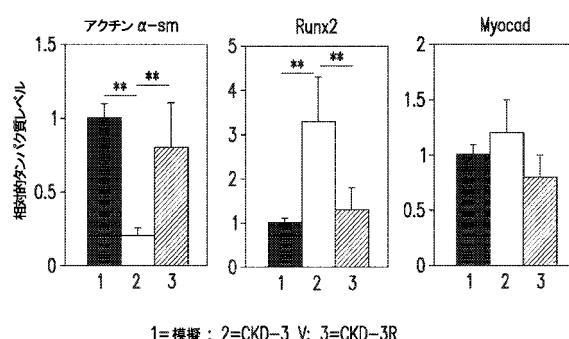


図 25B



1=模擬 ; 2=CKD-3 V; 3=CKD-3 R

図 25C

【図 26A】

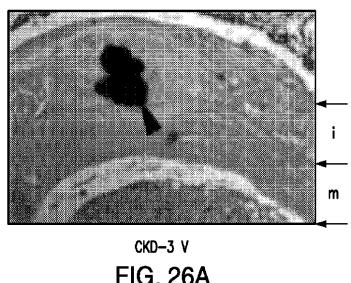


FIG. 26A

【図 26B】

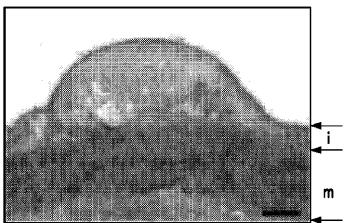


FIG. 26B

【図 26C】

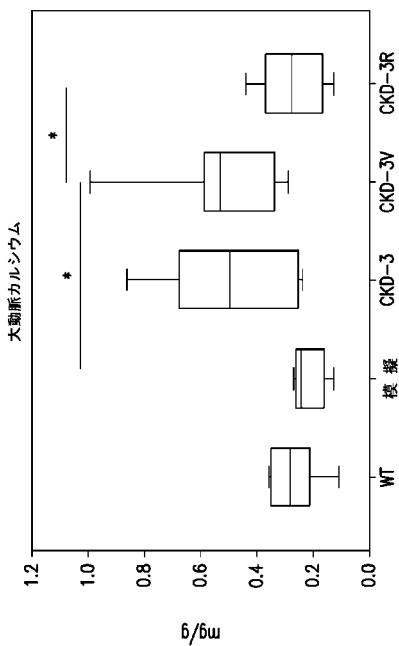


図 26C

【図 27】

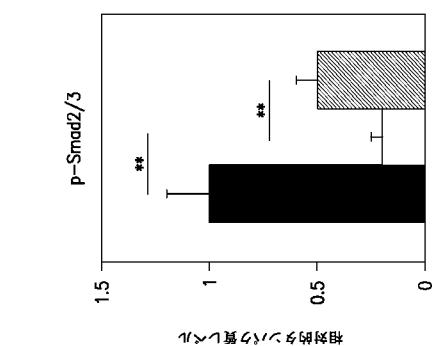


図 27B

図 27A

【図 28 A - C】



図 28A



図 28B

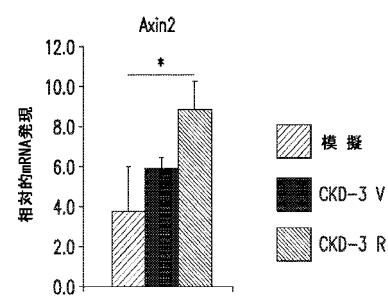


図 28C

【図 28D - E】

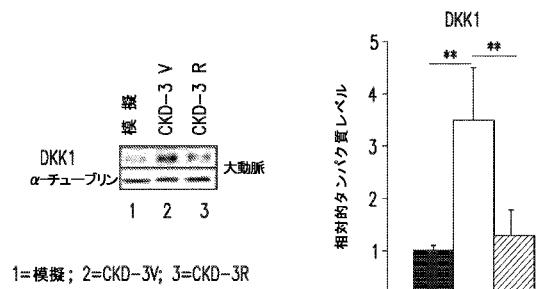


図 28D

【図 29】

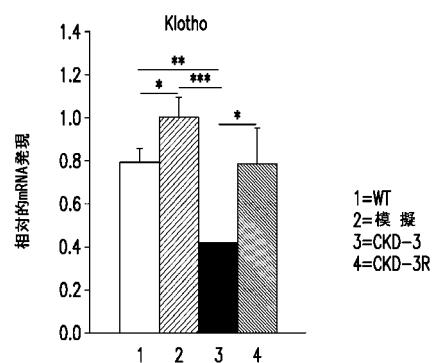


図 29A

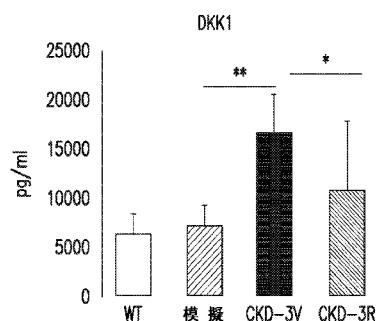


図 28E

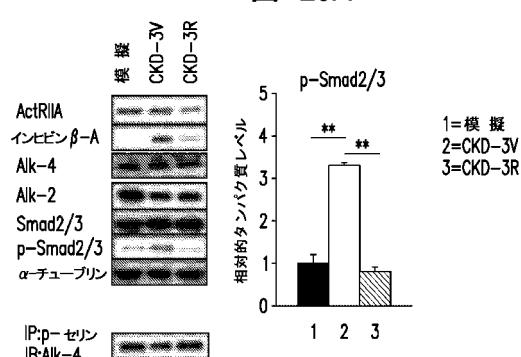


図 29B

【図 30A】

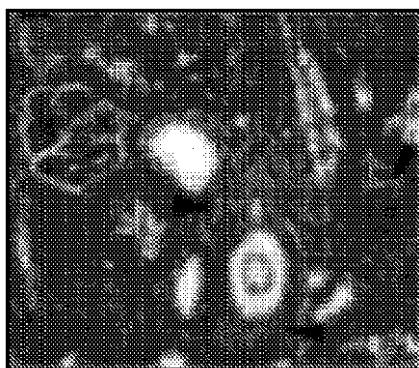


FIG. 30A

【図 30B】

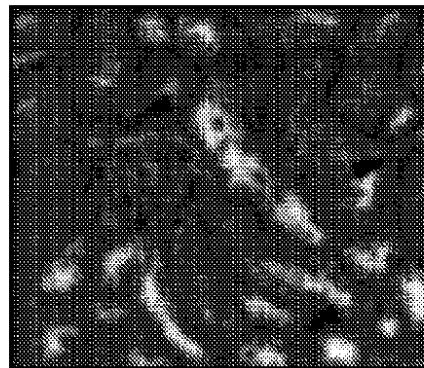


FIG. 30B

【図 30C】

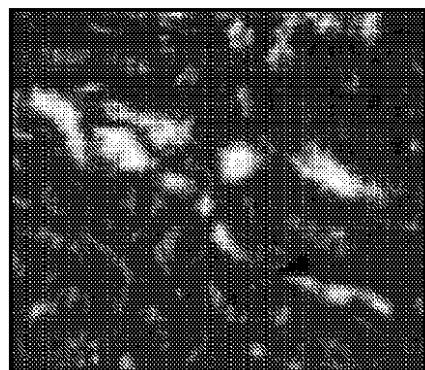


FIG. 30C

【図 30D】

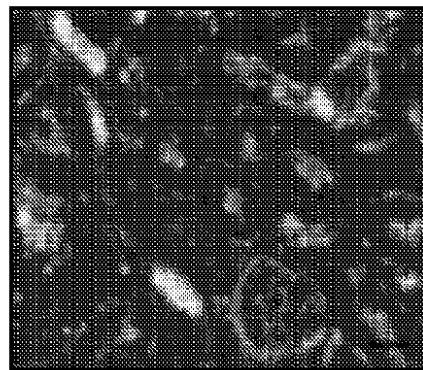


FIG. 30D

【図 30E】

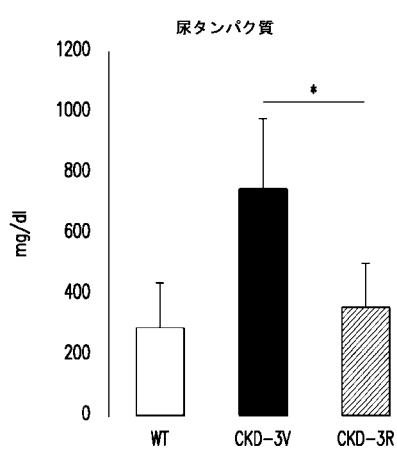
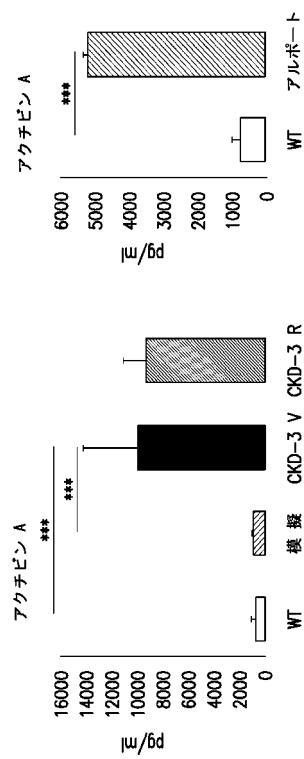


図 30E

【図 31A - B】

図 31A  
図 31B

【図 3 1 C - E】

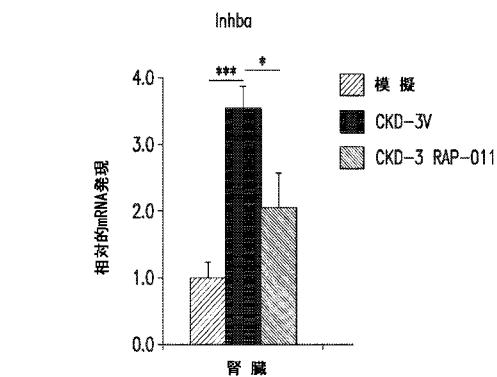


図 31C

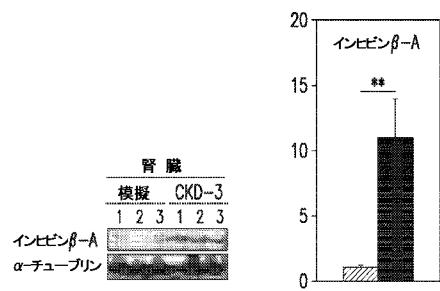


図 31D

図 31E

【図 3 2 A】

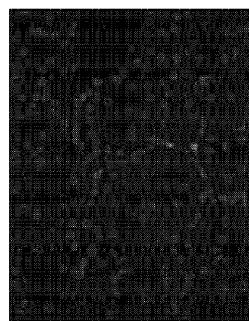


FIG. 32A

【図 3 2 B】

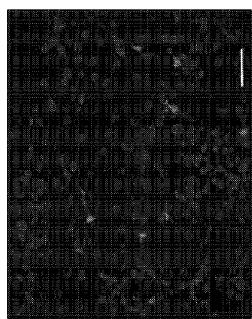


FIG. 32B

【図 3 3 A】

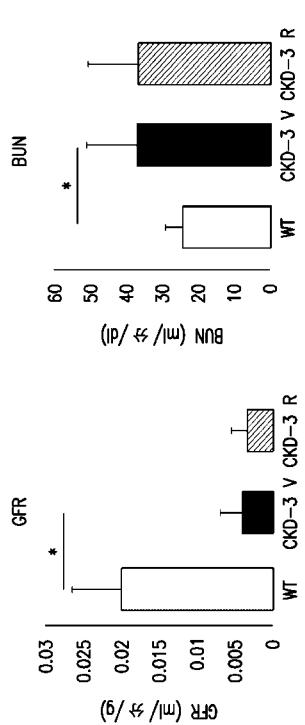


図 33A

【図 3 3 B】

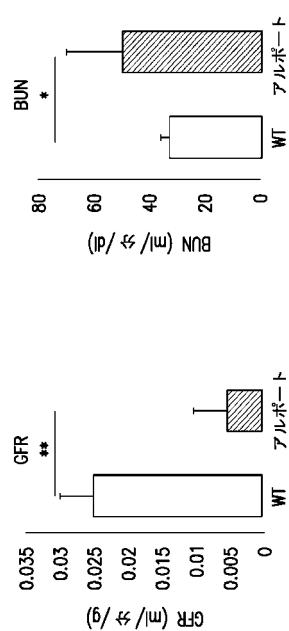
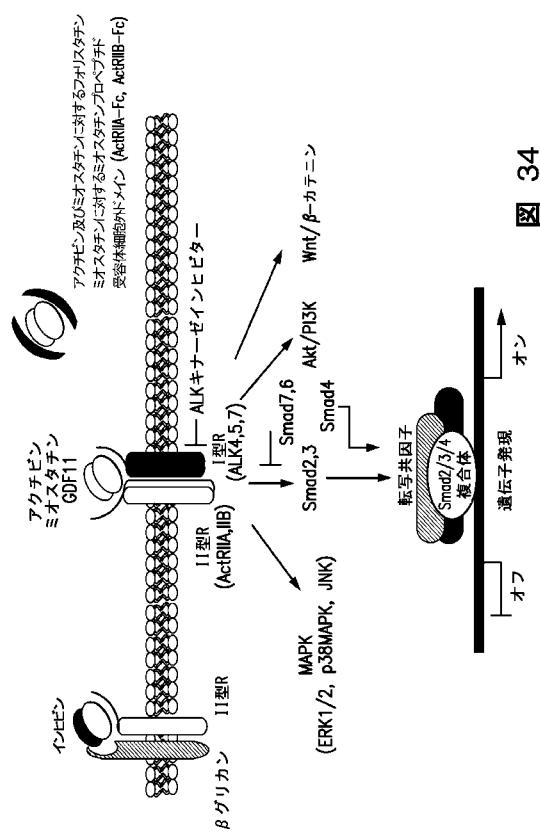


図 33B

【図 34】



【図 35A】

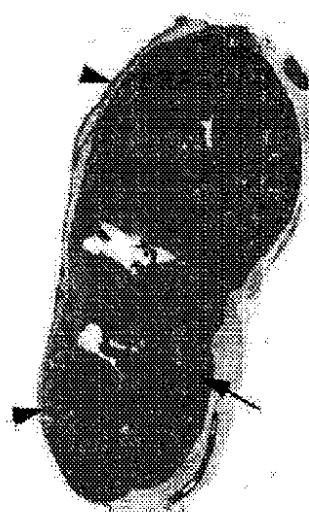


FIG. 35A

【図 35B】

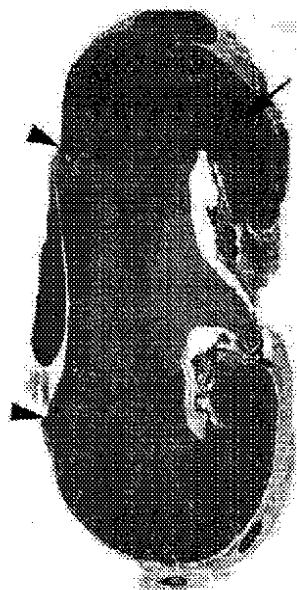


FIG. 35B

【図 35C】

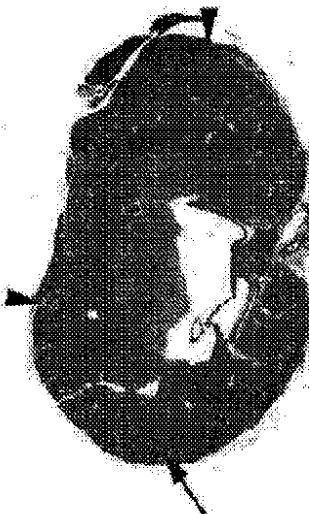


FIG. 35C

【図 35D】

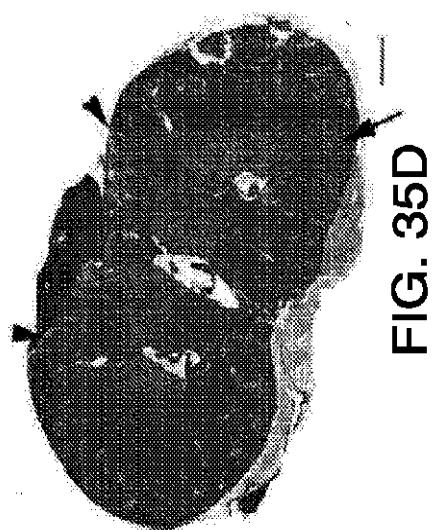
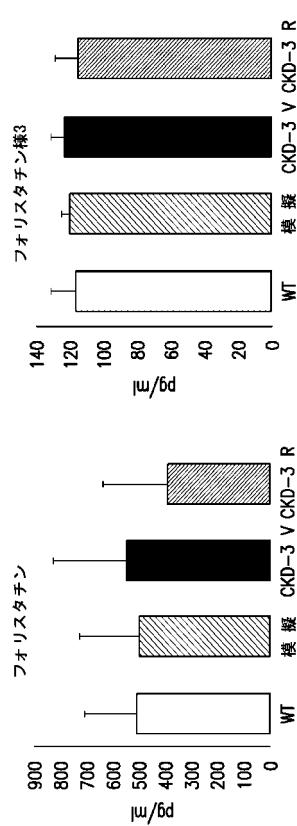


FIG. 35D

【図 36】

図 36A  
図 36B

【図 37】

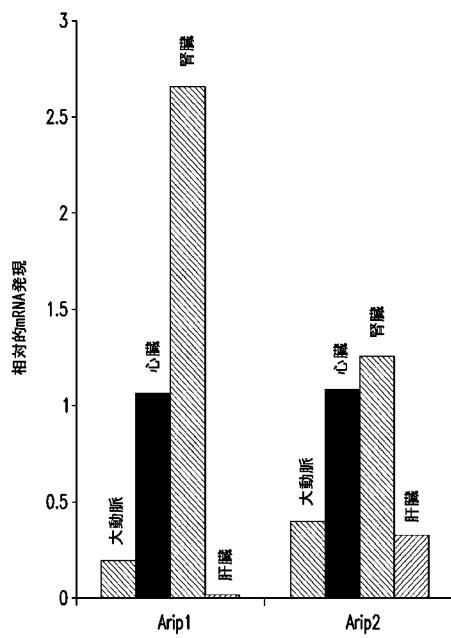


図 37

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月26日(2017.6.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017533191000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/54674									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61P 9/00, A61K 38/00 (2016.01) CPC - A61K38/179, C07K14/705 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61P 9/00, A61K 38/00 (2016.01) CPC: A61K38/179, C07K14/705											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K38/00, G01N2800/52, G06F19/3443											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: cardiovascular disease, activin type II, ActRII signalling inhibitor activin type II, ActRIIA mRNA, RUNX, SNAIL, activin, DKK1, urinary protein, CTX, Klotho, MYOCD, vascular calcification, arterial stiffness, left ventricular hypertrophy (LVH), bone resorption, renal disease, refere											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 2014/071158 A1 (CELGENE CORPORATION) 08 May 2014 (08.05.2014) para [0032], [0033], [0035], [0037], [0044], [0047], [0051], [0056], [00206], [00212]</td> <td style="padding: 2px;">1-10, 14-34, 41-42, 51-52, 63-67</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">Fang et al. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification. Kidney International (January 2014) Vol 85, No 1, pp 142-150, abstract, pg 142, col 2, para1, pg 143, col 1, para 2, pg 144, col 2, para 1, Fig. 5</td> <td style="padding: 2px;">1-10, 14-34, 41-42, 51-52, 63-67</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 2014/071158 A1 (CELGENE CORPORATION) 08 May 2014 (08.05.2014) para [0032], [0033], [0035], [0037], [0044], [0047], [0051], [0056], [00206], [00212]	1-10, 14-34, 41-42, 51-52, 63-67	Y	Fang et al. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification. Kidney International (January 2014) Vol 85, No 1, pp 142-150, abstract, pg 142, col 2, para1, pg 143, col 1, para 2, pg 144, col 2, para 1, Fig. 5	1-10, 14-34, 41-42, 51-52, 63-67
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	WO 2014/071158 A1 (CELGENE CORPORATION) 08 May 2014 (08.05.2014) para [0032], [0033], [0035], [0037], [0044], [0047], [0051], [0056], [00206], [00212]	1-10, 14-34, 41-42, 51-52, 63-67									
Y	Fang et al. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification. Kidney International (January 2014) Vol 85, No 1, pp 142-150, abstract, pg 142, col 2, para1, pg 143, col 1, para 2, pg 144, col 2, para 1, Fig. 5	1-10, 14-34, 41-42, 51-52, 63-67									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **T** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention **X** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search  04 February 2016	Date of mailing of the international search report  <b>71 FEB 2016</b>										
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US 15/54674
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input checked="" type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input checked="" type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter.</i> 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter.</i> 1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter.</i> 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 15/54674

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

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

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claims Nos.: 11-13, 35-40, 43-50, 53-62, 68-80 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

\*\*\*\*\* See Supplemental Sheet to continue \*\*\*\*\*

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

**Remark on Protest**

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/>            | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.   |
| <input type="checkbox"/>            | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. |
| <input checked="" type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees.   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/54674

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

**Group I:** Claims 1-10, 14-17, (63-67)(in part) directed to a method for treating and/or preventing cardiovascular disease in a subject having altered biomarker levels.

**Group II:** Claims 18-34, 41-42, 51-52, (63-67)(in part) directed to a method for treating and/or preventing cardiovascular disease in a subject, comprising a process of determining appropriate dosage for the treatment with an ActRII signaling inhibitor.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special Technical Features**

Group I requires a special technical feature of a subject having at least one altered biomarker level as compared to level in a reference population, not required by group II.

Group II require a special technical feature of administering to the subject an adjusted dose of the ActRII signaling inhibitors, not required by group I.

**Common Technical Features**

The common technical feature shared by Groups I and II is a method for treating and/or preventing a cardiovascular disease in a subject, comprising administering to the subject a pharmaceutically effective dose of an ActRII signaling inhibitor and measuring a level of a biomarker in said subject. The diseases that can be treated with ActRII signalling inhibitor include cardiovascular disease, vascular calcification, arterial stiffness, left ventricular hypertrophy, renal disease, or bone resorption. The biomarker includes, for example, total alkaline phosphatase (ALP) and bone-specific alkaline phosphatase (BSAP).

However, these shared technical feature do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by WO 2014/071158 A1 to Sloan et al. (hereinafter Sloan) (para [0008]) "provided herein are methods for treating an adynamic bone disorder in a subject, wherein the method comprises administering a therapeutically effective amount of an ActRII inhibitor to a subject in need.", para [0033] "CKD-MBD can be diagnosed as a systemic disorder of mineral and bone metabolism due to chronic kidney disease and manifested by ... abnormalities of calcium ... alkaline phosphatases (total or bone specific)", para [00172] "Various circulating markers of bone turnover can be used to diagnose bone disorders, such as low bone turnover. Circulating markers of bone turnover are markers of bone formation such as bone specific alkaline phosphatase", para [0042] "In certain embodiments, a subject suffering from, or at risk of suffering from, a form of CKD-MBD and/or extraskeletal calcification, e.g., vascular calcification, has increased levels of FGF23, a hormone produced by osteocytes"; para [0051] "methods described herein result in the improvement of one or more symptoms of vascular calcification. Exemplary symptoms include, without limitation, increases in the levels of vascular (e.g., arterial) calcium, ... loss of arterial elasticity, ... development of left ventricular hypertrophy, decrease in coronary artery perfusion, and myocardial ischaemia.", para [0026] Figure 6: mActRIIA-Fc increases Bone Mineral Density.", para [0019] "In certain embodiments, the subject to be treated with the methods provided herein has end stage renal disease.")

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

continuation of item no. 4: Claims 11-13, 35-40, 43-50, 53-62, 68-80 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 14/705	

(31) 優先権主張番号 62/170,015

(32) 優先日 平成27年6月2日(2015.6.2)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/078,321

(32) 優先日 平成26年11月11日(2014.11.11)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,Th,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72) 発明者 キース フルスカ

アメリカ合衆国 ミズーリ州 63141 クレベ クール コンウェイ ロード 12437

(72) 発明者 イイフ ファング

アメリカ合衆国 ミズーリ州 63108 セント ルイス ウエスト パイン 102番 43  
94

(72) 発明者 ウイリアム スミス

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 12498 ウッドストック グラスコ ターンピケ 152  
1

(72) 発明者 ニアンハング チェン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07920 バスキング リッジ スミスフィールド コ  
ート 34

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA14 DA36

4B063 QA01 QA05 QA19 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR62 QS25  
QS34 QX02  
4C076 AA95 CC11 CC41 EE41 EE59 FF70 GG50  
4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA08 BA21 BA22 BA23 MA66 NA14  
ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA451 ZA452 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812  
ZA961 ZA962 ZA971 ZA972 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZC331 ZC332  
ZC351 ZC352 ZC411 ZC412  
4H045 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA23 FA74