(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-19860
(P2017-19860A)
(43)公開日　平成29年1月26日(2017.1.26)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	4C076
A61P 21/00	(2006.01)	A61P	21/00	4C084
A61P 7/02	(2006.01)	A61P	7/02	4H045
A61P 13/12	(2006.01)	A61P	13/12	
A61K 47/50	(2017.01)	A61K	47/48	

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 72 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-204858 (P2016-204858)
(22)出願日　平成28年10月19日 (2016.10.19)
(62)分割の表示　特願2014-172279 (P2014-172279)の分割
原出願日　平成21年8月13日 (2009.8.13)
(31)優先権主張番号　61/189,094
(32)優先日　平成20年8月14日 (2008.8.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509125475
アクセルロン　ファーマ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　シドニー　ストリート　１２８
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ジャスバー　シーラ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４２１－６８１８，　レキシントン，　リンカーン　テラス　３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】赤血球レベルを高めるためのＧＤＦトラップの使用

(57)【要約】
【課題】赤血球レベルを高めるためのＧＤＦトラップの使用の提供。
【解決手段】特定の態様において、本発明は、げっ歯類および霊長類を含む脊椎動物において、特に、ヒトにおいて、赤血球および／またはヘモグロビンのレベルを増加させるための組成物および方法を提供する。本発明は、赤血球およびヘモグロビンのレベルを高めるために、ＧＤＦトラップを用いることができることを実証する。他のＡｃｔＲＩＩＢリガンド、例えばＧＤＦ１１および／またはミオスタチンと比較して、アクチビン（例えば、アクチビンＡおよび／またはアクチビンＢ）に有意に低い親和性を有する改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドを、ＧＤＦトラップと称す。
【選択図】図１５

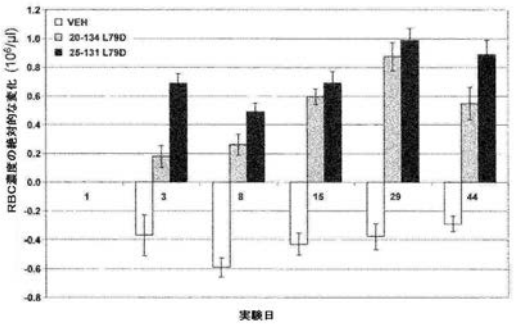


FIGURE 15

【特許請求の範囲】
【請求項１】
赤血球レベルを高めるためのＧＤＦトラップの使用など。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願）
この出願は、２００８年８月１４日に出願された米国仮出願第６１／１８９，０９４号の利益を主張する。上記米国仮出願の教示の全ては、参照によって本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
成熟した赤血球（ｒｅｄ　ｂｌｏｏｄ　ｃｅｌｌ）、すなわちエリスロサイト（ｅｒｙｔｈｒｏｃｙｔｅ）は、脊椎動物の循環系において酸素の輸送を担っている。赤血球は、比較的高い酸素分圧（pO_2）の肺において酸素を結合し、そして、比較的低いpO_2の身体の領域へと酸素を運搬するタンパク質であるヘモグロビンを高濃度で有する。
【０００３】
成熟赤血球は、赤血球生成と呼ばれるプロセスにおいて、多能性の造血幹細胞から生成される。出生後の赤血球生成は、主として、骨髄および赤脾臓において生じる。種々のシグナル伝達経路の連繋した作用により、細胞の増殖、分化、生存および死のバランスが制御される。正常な条件下では、赤血球は、身体において一定の赤血球質量を維持する速度で生成され、そして、この生成は、種々の刺激（酸素圧の増減または組織の要求を含む）に応じて増減し得る。赤血球生成のプロセスは、分化系列が決定した（ｌｉｎｅａｇｅ　ｃｏｍｍｉｔｔｅｄ）前駆体細胞の形成から始まり、そして、一連の別個の前駆体細胞型を通って進行する。赤血球生成の最終段階は、網状赤血球が血流へと放出されるときに生じ、成熟赤血球の形態を帯びながら、そのミトコンドリアおよびリボソームを失う。血中での網状赤血球レベルの上昇、または、網状赤血球：赤血球の比の上昇は、赤血球生成速度の増加を示す。
【０００４】
エリスロポエチン（Ｅｐｏ）は、出生後の脊椎動物における赤血球生成の最も重要な正の調節因子として広く認識されている。Ｅｐｏは、組織酸素圧の低下（低酸素）および低い赤血球レベルまたは低いヘモグロビンレベルに対し、これを補う赤血球生成性の応答を調節する。ヒトでは、Ｅｐｏレベルの上昇は、骨髄および脾臓における赤血球先駆細胞の生成を刺激することによって、赤血球の形成を促進する。マウスでは、Ｅｐｏは、主として脾臓における赤血球生成を増強する。
【０００５】
種々の臨床的状況において赤血球レベルを増加させるため、そして、特に、貧血の処置のために、組換え型Ｅｐｏの種々の形態が医師によって使用されている。貧血は、血中のヘモグロビンまたは赤血球が正常レベルよりも低いことによって特徴付けられる、広く定義される状態である。ある場合には、貧血は、赤血球の生成または生存における原発性の障害によって引き起こされる。より一般的には、貧血は、他の系の疾患に対して続発的である（非特許文献１）。貧血は、赤血球の生成速度の低下もしくは破壊速度の増加から、または、出血に起因する赤血球の喪失によって生じ得る。貧血は、例えば、慢性腎不全、化学療法処置、骨髄異形成症候群、慢性関節リウマチおよび骨髄移植を含む種々の障害から生じ得る。
【０００６】
Ｅｐｏを用いた処置は、代表的に、数週間の期間にわたり、健康なヒトにおいて約１～３ｇ／ｄＬのヘモグロビンの上昇をもたらす。貧血の個体に投与された場合、この処置レジメンは、しばしば、ヘモグロビンおよび赤血球のレベルのかなりの増加を提供し、そし

て、クオリティオブライフの改善と生存の延長につながる。Ｅｐｏは、一様に有効ではなく、多くの個体は、高用量に対してさえも不応性である（非特許文献２）。５０％を超えるがんを有する患者がＥｐｏに対して不十分な応答を有し、末期の腎疾患を有する患者の約１０％が低反応性であり（非特許文献３；非特許文献４）、そして、骨髄異形成症候群を有する患者の１０％未満しか有利に応答しない（非特許文献５）。炎症、鉄およびビタミンの欠乏、不適切な透析、アルミニウムの毒性、および副甲状腺機能亢進を含むいくつかの要因は、治療応答が乏しいことを予測し得、そして、Ｅｐｏに対する抵抗性の分子機構は未だにはっきりとしていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｗｅａｔｈｅｒａｌｌ　＆　Ｐｒｏｖａｎ、Ｌａｎｃｅｔ（２０００年）３５５巻、１１６９～１１７５頁
【非特許文献２】Ｈｏｒｌら、Ｎｅｐｈｒｏｌ　Ｄｉａｌ　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ（２０００年）１５巻、４３～５０頁
【非特許文献３】Ｇｌａｓｐｙら、Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ（１９９７年）１５巻、１２１８～１２３４頁
【非特許文献４】Ｄｅｍｅｔｒｉら、Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ（１９９８年）１６巻、３４１２～３４２５頁
【非特許文献５】Ｅｓｔｅｙ、Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｈｅｍａｔｏｌ（２００３年）１０巻、６０～６７頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

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

【課題を解決するための手段】

【０００９】

（発明の概要）

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

【００１０】

特定の態様では、本開示は、アミノ末端およびカルボキシ末端の切断および配列変化を有するＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドを含む、改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドであるＧＤＦトラップを提供する。任意選択で、本発明のＧＤＦトラップは、ＡｃｔＲＩＩＢ受容体の１つまたは複数のリガンド、例えばＧＤＦ８（ミオスタチンとも呼ばれる）、ＧＤＦ１１、ＮｏｄａｌおよびＢＭＰ７（ＯＰ－１とも呼ばれる）と優先的に拮抗するように設計されてもよい。ＧＤＦトラップの例には、アクチビン親和性が大いに低下したＡｃｔＲＩＩＢ由来の改変体のセットが含まれる。これらの改変体は、他の組織への影響を低減し

つつ、赤血球に対する望ましい影響を示す。そのような改変体の例には、配列番号１の７９位に対応する位置に酸性アミノ酸（例えば、アスパラギン酸、Ｄまたはグルタミン酸、Ｅ）を有するものが含まれる。特定の実施形態では、ＧＤＦトラップポリペプチドは、配列番号７、２６、２８、２９、３２、３７または３８のアミノ酸配列、および上記のいずれかと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチドを含むか、それからなるか、または事実上それからなるアミノ酸配列を含む。

【００１１】

特定の態様では、本開示はＧＤＦ８、ＧＤＦ１１、アクチビン（例えば、アクチビンＢ）、ＢＭＰ７またはｎｏｄａｌなどのＡｃｔＲＩＩＢリガンドに結合するＧＤＦトラップ、および薬学的に許容される担体を含む医薬調製物を提供する。任意選択で、ＧＤＦトラップは、１０マイクロモル未満、１マイクロモル未満、１００ナノモル未満、１０ナノモル未満、または１ナノモル未満のＫｄでＡｃｔＲＩＩＢリガンドに結合する。任意選択で、ＧＤＦトラップは、ＡｃｔＲＩＩＢリガンドによって誘発される細胞内シグナル伝達事象などの、ＡｃｔＲＩＩＢシグナル伝達を阻害する。そのような調製物に用いられるＧＤＦトラップは、例えば、配列番号２、３、７、１１、２６、２８、２９、３２、３７、３８もしくは４０から選択されるアミノ酸配列を有するＧＤＦトラップ、または配列番号２、３、７、１１、２６、２８、２９、３２、３７、３８もしくは４０から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％もしくは９９％同一であるアミノ酸配列を有するＧＤＦトラップ、または配列番号１のＬ７９に対応する位置が酸性アミノ酸である、配列番号２、３、７、１１、２６、２８、２９、３２、３７、３８もしくは４０から選択されるアミノ酸配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％もしくは９９％同一であるアミノ酸配列を有するＧＤＦトラップを含む、本明細書に開示されるもののいずれかでよい。そのような調製物に用いられる好ましいＧＤＦトラップは、配列番号２６のアミノ酸配列からなるか、または事実上それからなる。ＧＤＦトラップは、天然のＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの機能的断片、例えば、配列番号２、３、７、１１、２６、２８、２９、３２、３７、３８もしくは４０から選択される配列の少なくとも１０、２０もしくは３０アミノ酸を含むもの、またはＣ末端の１、２、３、４、５もしくは１０～１５アミノ酸を欠き、Ｎ末端の１、２、３、４もしくは５アミノ酸を欠く配列番号２の配列を含むことができる。好ましいポリペプチドは、配列番号２または４０と比較して、Ｎ末端の２～５アミノ酸、およびＣ末端の３以下のアミノ酸の切断を含む。ＧＤＦトラップは、天然に存在するＡｃｔＲＩＩポリペプチドに対して、（例えば、リガンド結合ドメインにおいて）ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドのアミノ酸配列に１または複数の変更を含み得る。アミノ酸配列の変更は、例えば、哺乳動物、昆虫もしくは他の真核生物細胞において生成される場合にポリペプチドのグリコシル化を変更し得るか、または、天然に存在するＡｃｔＲＩＩポリペプチドに対して、ポリペプチドのタンパク質分解による切断を変更し得る。

【００１２】

ＧＤＦトラップは、１つのドメインとして、ＡｃｔＲＩＩポリペプチド（例えば、１または複数の配列の差異を有するＡｃｔＲＩＩＢのリガンド結合部分）と、所望の特性（例えば、改善された薬物動態、より容易な精製、特定の組織への標的化など）を提供する１または複数のさらなるドメインとを有する融合タンパク質であり得る。例えば、融合タンパク質のドメインは、インビボ安定性、インビボ半減期、取込み／投与、組織局在化もしくは分布、タンパク質複合体の形成、融合タンパク質の多量体化および／または精製のうちの１または複数を増強し得る。ＧＤＦトラップ融合タンパク質は、免疫グロブリンＦｃドメイン（野生型または変異体）、または血清アルブミンを含み得る。特定の実施形態では、ＧＤＦトラップ融合物は、Ｆｃドメインと細胞外ＡｃｔＲＩＩＢドメインとの間に位置する比較的構造化されていない（ｕｎｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ）リンカーを含む。この構造化されていないリンカーは、ＡｃｔＲＩＩＢの細胞外ドメインのＣ末端の約１５アミノ酸の構造化されていない領域（「テール」）に対応することができるか、またはそれは、

二次構造が比較的存在しない３～５、１５、２０、３０、５０もしくはそれ以上のアミノ酸の人工配列であってもよい。リンカーは、グリシン残基およびプロリン残基が豊富であり得、そして例えば、スレオニン／セリンおよびグリシンの繰り返し配列（例えば、TG_4（配列番号１３）もしくはSG_4（配列番号１４）の単一体（ｓｉｎｇｌｅｔ）もしくは繰り返し）または一連の３つのグリシンを含み得る。融合タンパク質は、エピトープタグ、ＦＬＡＧタグ、ポリヒスチジン配列、および、ＧＳＴ融合物のような精製配列を含み得る。特定の実施形態では、ＧＤＦトラップ融合物は、リーダー配列を含む。リーダー配列は、天然のＡｃｔＲＩＩＢリーダー配列または異種のリーダー配列であってもよい。特定の実施形態では、リーダー配列は組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）リーダー配列である。一実施形態では、ＧＤＦトラップ融合タンパク質は、式Ａ－Ｂ－Ｃに示すアミノ酸配列を含む。Ｂ部分は、配列番号２または４０のアミノ酸２５～１３１に対応するアミノ酸配列からなる、ＮおよびＣ末端が切断されているＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドである。Ａ部分およびＣ部分は、独立に０、１または１を超えるアミノ酸であることができ、ＡおよびＣ部分の両方はＢに対して異種である。Ａおよび／またはＣ部分は、リンカー配列を通してＢ部分に結合することができる。

【００１３】

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

【００１４】

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

【００１５】

特定の態様では、本開示は、変化させたリガンド結合性（例えば、ＧＤＦ８結合性）ドメインを含む可溶性のＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドであるＧＤＦトラップを提供する。変化させたリガンド結合性ドメインを有するＧＤＦトラップは、例えば、ヒトＡｃｔＲＩＩＢのＥ３７、Ｅ３９、Ｒ４０、Ｋ５５、Ｒ５６、Ｙ６０、Ａ６４、Ｋ７４、Ｗ７８、Ｌ７９、Ｄ８０、Ｆ８２およびＦ１０１（番号付けは、配列番号１と比較したもの）などのアミノ酸残基に１つまたは複数の変異を含むことができる。任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインは、ＡｃｔＲＩＩＢ受容体の野生型リガンド結合性ドメインと比較して、ＧＤＦ８／ＧＤＦ１１などのリガンドに対してより高い選択性を有することができる。例示すると、これらの変異は、変化させたリガンド結合性ドメインの、アクチビンよりもＧＤＦ１１（したがって、おそらくＧＤＦ８）に対する選択性を増加させることが本明細書で実証される：Ｋ７４Ｙ、Ｋ７４Ｆ、Ｋ７４Ｉ、Ｌ７９Ｄ、Ｌ７９ＥおよびＤ８０Ｉ。以下の変異は反対の影響を有し、ＧＤＦ１１よりもアクチビン結合の比率を高める：Ｄ５４Ａ、Ｋ５５Ａ、Ｌ７９ＡおよびＦ８２Ａ。全体的（ＧＤＦ１１およびアクチビン）結合活性は、「テール」領域または、おそらく、構造化されていないリンカー領域の組入れによって、さらにＫ７４Ａ変異の使用によって増加させることができる。リガンド結合親和性の全体的低下を引き起こした他の変異には、以下のものが含まれる：Ｒ４０Ａ、Ｅ３７Ａ、Ｒ５６Ａ、Ｗ７８Ａ、Ｄ８０Ｋ、Ｄ８０Ｒ、Ｄ８０Ａ、Ｄ８０Ｇ、Ｄ８０Ｆ、Ｄ８０ＭおよびＤ８０Ｎ。所望の効果を達成するために、変異を組み合わせることができる。例えば、ＧＤＦ１１：アクチビン結合比に影響を及ぼす変異の多くは、リガンド結合に全体

的に負の影響を及ぼし、したがってこれらを、リガンド結合を一般に増加させてリガンド選択性を有する改善された結合性タンパク質を生成する変異と組み合わせてもよい。例示的な実施形態では、ＧＤＦトラップは、任意選択で追加のアミノ酸置換、付加または欠失と組み合わせた、Ｌ７９ＤまたはＬ７９Ｅ変異を含むＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドである。

【００１６】

任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインを含むＧＤＦトラップは、ＧＤＦ８結合についてのK_dに対するアクチビン結合についてのK_dの比が、野生型リガンド結合性ドメインの比と比較して少なくとも２、５、１０倍または１００倍さえも大きい。任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインを含むＧＤＦトラップは、ＧＤＦ８／ＧＤＦ１１を阻害するためのIC_{50}値に対するアクチビンを阻害するためのIC_{50}値の比が、野生型ＡｃｔＲＩＩＢリガンド結合性ドメインと比較して少なくとも２、５、１０倍または１００倍さえも大きい。任意選択で、変化させたリガンド結合性ドメインを含むＧＤＦトラップは、アクチビンを阻害するためのIC_{50}値よりも少なくとも２、５、１０倍、または１００倍さえも小さいIC_{50}値でＧＤＦ８／ＧＤＦ１１を阻害する。これらのＧＤＦトラップは、免疫グロブリンＦｃドメイン（野生型または変異体のいずれか）を含む融合タンパク質であってもよい。特定の場合では、本主題の可溶性ＧＤＦトラップは、ＧＤＦ８および／またはＧＤＦ１１のアンタゴニスト（インヒビター）である。

【００１７】

以下などの、他のＧＤＦトラップが企図される。配列番号１または３９のＡｃｔＲＩＩＢ配列に由来する部分および第二のポリペプチド部分を含むＧＤＦトラップ融合タンパク質であって、ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２１～２９のいずれかから始まり（任意選択で、配列番号１または３９の２２～２５から始まり）、配列番号１または３９のアミノ酸１０９～１３４のいずれかで終わる配列に対応し、ＧＤＦトラップ融合タンパク質は、細胞ベースのアッセイでアクチビン、ミオスタチンおよび／またはＧＤＦ１１によるシグナル伝達を阻害する。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２０～２９のいずれかから始まり（任意選択で、配列番号１または３９の２２～２５から始まり）、配列番号１または３９のアミノ酸１０９～１３３のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり（任意選択で、配列番号１または３９の２２～２５から始まり）、配列番号１または３９のアミノ酸１０９～１３３のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２１～２４のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１０９～１３４のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１１８～１３３のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２１～２４のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１１８～１３４のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１２８～１３３のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１２８～１３３のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２１～２９のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１１８～１３４のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２０～２９のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１１８～１３３のいずれかで終わる配列に対応す

る、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１または３９のアミノ酸２１～２９のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１２８～１３４のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。ＡｃｔＲＩＩＢに由来する部分は、配列番号１のアミノ酸２０～２９のいずれかから始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１２８～１３３のいずれかで終わる配列に対応する、上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質。驚くべきことに、配列番号１または３９の２２～２５から始まる構築物は、ヒトＡｃｔＲＩＩＢの完全な細胞外ドメインを有するタンパク質よりも高い活性レベルを有する。好ましい実施形態では、ＧＤＦトラップ融合タンパク質は、配列番号１または３９のアミノ酸２５位から始まり、配列番号１または３９のアミノ酸１３１位で終わるアミノ酸配列を含むか、事実上それからなるか、またはそれからなる。別の好ましい実施形態では、ＧＤＦトラップポリペプチドは、配列番号７、２６、２８、２９、３２、３７または３８のアミノ酸配列からなるか、または事実上それからなる。上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質のいずれもを、ホモダイマーとして生成することができる。上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質のいずれも、ＦｃドメインなどのＩｇＧ重鎖からの定常領域を含む異種部分を有することができる。上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質のいずれも、配列番号１に対する１つまたは複数の追加のアミノ酸置換、欠失または挿入と任意選択で組み合わせて、配列番号１の７９位に対応する位置に酸性アミノ酸を含むことができる。

【００１８】

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

【００１９】

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

として生成することができる。上記のＧＤＦトラップ融合タンパク質のいずれも、ＦｃドメインなどのＩｇＧ重鎖からの定常領域を含む異種部分を有することができる。

【００２０】

特定の態様では、本開示は、ＧＤＦトラップポリペプチドをコードする核酸を提供する。単離されたポリヌクレオチドは、上述のような可溶性のＧＤＦトラップポリペプチドのコード配列を含み得る。例えば、単離された核酸は、１または複数の配列の差異を有するＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの細胞外ドメイン（例えば、リガンド結合ドメイン）を含むＧＤＦトラップをコードする配列、および、ＡｃｔＲＩＩの、膜貫通ドメインおよび／もしくは細胞質ドメインの一部もしくは全体をコードする配列を含み得るが、膜貫通ドメインもしくは細胞質ドメイン内、または、細胞外ドメインと膜貫通ドメインもしくは細胞質ドメインとの間に位置する終止コドンは除く。例えば、ＧＤＦトラップをコードする単離されたポリヌクレオチドは、１つまたは複数の変形を有する配列番号４などの完全長ＡｃｔＲＩＩＢポリヌクレオチド配列または部分的切断バージョンを含むことができ、前記単離されたポリヌクレオチドは、３’末端の少なくとも６００ヌクレオチド前に、さもなければ、ポリヌクレオチドの翻訳が、完全長ＡｃｔＲＩＩＢの切断部分に任意選択で融合される細胞外ドメインを生成するように置かれた転写終止コドンをさらに含む。本明細書中に開示される核酸は、発現のためのプロモーターに作動可能に連結され得、そして、本開示は、このような組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。好ましくは、細胞は、ＣＨＯ細胞のような哺乳動物細胞である。

【００２１】

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

【００２２】

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

【００２３】

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

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：
（項目１）
患者において赤血球レベルを高めるかまたは貧血を処置する方法であって、赤血球レベルを高めることまたは貧血を処置することを必要とする患者に、配列番号１のアミノ酸２９～１０９の配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの有効量を投与する工程を含み、前記ポリペプチドが、配列番号１の７９位に対応する位置に酸性アミノ酸を含む、方法。
（項目２）
前記酸性アミノ酸が、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる群より選択される、項目１に記載の方法。
（項目３）
前記ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸２９～１０９の配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、項目１に記載の方法。
（項目４）
前記ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸２５～１１８の配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、項目１に記載の方法。
（項目５）
前記ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸２５～１２８の配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、項目１に記載の方法。
（項目６）
前記ポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸２５～１３１の配列に少なくとも９７％同一であるアミノ酸配列を含む、項目１に記載の方法。
（項目７）
前記ポリペプチドが、配列番号７、２８、２９、３２、３７および３８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目１に記載の方法。
（項目８）
前記患者が腎臓障害に関連する貧血を有する、項目１から７のいずれかに記載の方法。
（項目９）
前記患者が慢性腎臓疾患に関連する貧血を有する、項目８に記載の方法。
（項目１０）
前記患者が化学療法処置に関連する貧血を有する、項目１から７のいずれかに記載の方法。
（項目１１）
前記化学療法処置がタキサンである、項目１０に記載の方法。
（項目１２）
前記患者が失血の結果としての貧血を有する、項目１から７のいずれかに記載の方法。
（項目１３）
配列番号２９のアミノ酸配列を含むポリペプチド。
（項目１４）
免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む、項目１３に記載のポリペプチド。
（項目１５）
Ｆｃドメインをさらに含む、項目１３に記載のポリペプチド。
（項目１６）
配列番号２８のアミノ酸配列を含む、項目１３に記載のポリペプチド。
（項目１７）
配列番号３２のアミノ酸配列を含むポリペプチド。
（項目１８）
免疫グロブリンの定常領域をさらに含む、項目１７に記載のポリペプチド。
（項目１９）
Ｆｃドメインをさらに含む、項目１７に記載のポリペプチド。

（項目２０）
配列番号７のアミノ酸配列を含む、項目１７に記載のポリペプチド。
（項目２１）
ＡｃｔＲＩＩＢに由来する前記ポリペプチドの部分が、配列番号２９のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を有する、項目１７に記載のポリペプチド。
（項目２２）
グリコシル化アミノ酸、ＰＥＧ化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、１つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基をさらに含む、項目１３から２１のいずれかに記載のポリペプチド。
（項目２３）
式Ａ－Ｂ－Ｃで示されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質であって、
Ｂは配列番号２９のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、
ＡおよびＣは、独立に０、１または１個超のアミノ酸であり、
ＡおよびＣは、Ｂと異種である、融合タンパク質。
（項目２４）
ホモダイマーを形成する、項目２３に記載の融合タンパク質。
（項目２５）
ＡまたはＣの少なくとも１つが、インビボ安定性、インビボ半減期、取込み／投与、組織局在化もしくは分布、タンパク質複合体の形成、および／または精製の１つまたは複数を増強するポリペプチド部分を含む、項目２３または２４に記載の融合タンパク質。
（項目２６）
ＡまたはＣの少なくとも１つが、ＩｇＧ重鎖に由来する定常領域を含む、項目２３または２４に記載の融合タンパク質。
（項目２７）
ＩｇＧ重鎖に由来する前記定常領域がＦｃドメインである、項目２６に記載の融合タンパク質。
（項目２８）
Ａ、ＣまたはＡおよびＣが、リンカーを用いてＢに融合される、項目２３に記載の融合タンパク質。
（項目２９）
前記リンカーがＧｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙを含む、項目２８に記載の融合タンパク質。
（項目３０）
グリコシル化アミノ酸、ＰＥＧ化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、１つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基を含む、項目２３から２９のいずれかに記載の融合タンパク質。
（項目３１）
Ｂが少なくとも１つの修飾されたアミノ酸残基を含む、項目３０に記載の融合タンパク質。
（項目３２）
項目１３から３１のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む医薬調製物。
（項目３３）
項目１３から３１のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸を含む培養細胞。
（項目３４）
前記細胞が哺乳動物の細胞である、項目３３に記載の培養細胞。
（項目３５）
前記細胞がＣＨＯ細胞である、項目３４に記載の培養細胞。
（項目３６）
前記核酸が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号１２、２５

、２７、３０、３１、３３、３４および３５からなる群より選択される核酸配列とハイブリダイズする、項目３３に記載の培養細胞。
（項目３７）
前記核酸が、配列番号１２、２５、２７、３０、３１、３３、３４および３５からなる群より選択される核酸配列に少なくとも９５％同一である、項目３３に記載の培養細胞。
（項目３８）
前記核酸が、配列番号１２、２５、２７、３０、３１、３３、３４および３５からなる群より選択される、項目３３に記載の培養細胞。
（項目３９）
ＡｃｔＲＩＩＢ由来のアミノ酸配列、リンカー配列および／または免疫グロブリン配列をコードする前記核酸の部分が、配列番号１２、２５、２７、３０、３１、３３、３４および３５からなる群より選択される核酸配列からなる、項目３３に記載の培養細胞。
（項目４０）
患者において赤血球レベルを高めるかまたは貧血を処置する方法であって、赤血球レベルを高めることまたは貧血を処置することを必要とする患者に改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの有効量を投与する工程を含み、前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸２９～１０９の配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含み、前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドが、対応する野生型ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの比よりも大きいＧＤＦ１１：アクチビン結合比を有する、方法。
（項目４１）
前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドが、配列番号１の７９位に対応する位置に酸性アミノ酸を含む、項目４０に記載の方法。
（項目４２）
前記患者がヒト患者である、項目４０に記載の方法。
（項目４３）
前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドが、対応する野生型ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの比よりも大きいＧＤＦ１１：アクチビンＡ結合比を有する、項目４０に記載の方法。
（項目４４）
前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドが、（ａ）配列番号１のアミノ酸２２～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１３３～１３４のいずれかで終わる配列、（ｂ）配列番号１のアミノ酸２１～２９のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１１８～１３４のいずれかで終わる配列、（ｃ）配列番号１のアミノ酸２１～２９のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１２８～１３４のいずれかで終わる配列、（ｄ）配列番号１のアミノ酸２１～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１０９～１３４のいずれかで終わる配列、（ｅ）配列番号１のアミノ酸２１～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１１８～１３４のいずれかで終わる配列、（ｆ）配列番号１のアミノ酸２１～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１２８～１３４のいずれかで終わる配列、（ｇ）配列番号１のアミノ酸２０～２９のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１０９～１３３のいずれかで終わる配列、（ｈ）配列番号１のアミノ酸２０～２９のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１１８～１３３のいずれかで終わる配列、（ｉ）配列番号１のアミノ酸２０～２９のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１２８～１３３のいずれかで終わる配列、（ｊ）配列番号１のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１０９～１３３のいずれかで終わる配列、（ｋ）配列番号１のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１１８～１３３のいずれかで終わる配列、（ｌ）配列番号１のアミノ酸２０～２４のいずれかから始まり、配列番号１のアミノ酸１２８～１３３のいずれかで終わる配列、および（ｍ）配列番号１のアミノ酸２０から始まり、配列番号１のアミノ酸１３４で終わる配列、からなる群より選択される配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、項目４０に記載の方法。
（項目４５）

前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドが、グリコシル化アミノ酸、ＰＥＧ化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合体化されたアミノ酸、および有機誘導体化剤に結合体化されたアミノ酸から選択される、１つまたは複数の修飾されたアミノ酸残基を含む、項目４０から４４のいずれかに記載の方法。

（項目４６）

赤血球レベルの増加が血中ヘモグロビンレベルの増加として測定される、項目４０から４４のいずれかに記載の方法。

（項目４７）

前記患者の骨格筋量の１５％未満の増加を引き起こす、項目４０から４４のいずれかに記載の方法。

（項目４８）

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

（項目４９）

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

（項目５０）

前記融合タンパク質が、

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

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

ｃ）配列番号７、１１、２８、２９、３２、３７および３８のアミノ酸配列

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

（項目５１）

前記改変体ＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃ融合タンパク質が、１５～３０日の血清半減期を有する、項目５０に記載の方法。

（項目５２）

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

（項目５３）

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

【図面の簡単な説明】

【００２４】

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

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

【図３】図３は、ＴＰＡリーダー配列（二重下線を付す）、ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２０～１３４、下線を付す）およびｈＦｃドメインを含む、ＧＤＦトラップＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃ（配列番号１１）の全アミノ酸配列を示す。配列決定によって成熟融合タンパク質のＮ末端残基であることが明らか

になったグリシンと同様に、ネイティブな配列の７９位において置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、目立たせている。
【図４－１】図４は、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号２５がセンス鎖に対応し、配列番号３３がアンチセンス鎖に対応する。ＴＰＡリーダー（ヌクレオチド１～６６）に二重下線を付し、ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（ヌクレオチド７６～４２０）に下線を付す。
【図４－２】図４は、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号２５がセンス鎖に対応し、配列番号３３がアンチセンス鎖に対応する。ＴＰＡリーダー（ヌクレオチド１～６６）に二重下線を付し、ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（ヌクレオチド７６～４２０）に下線を付す。
【図５】図５は、ＴＰＡリーダー（二重下線を付す）、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１、下線を付す）、およびｈＦｃドメインを含む、切断されたＧＤＦトラップＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの全アミノ酸配列を示す（配列番号２６）。配列決定によって成熟融合タンパク質のＮ末端残基であることが明らかになったグルタミン酸と同様に、ネイティブな配列の７９位において置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、目立たせている。
【図６－１】図６は、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号２７がセンス鎖に対応し、配列番号３４がアンチセンス鎖に対応する。ＴＰＡリーダー（ヌクレオチド１～６６）に二重下線を付し、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（ヌクレオチド７６～３９６）に下線を付す。ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１）のアミノ酸配列も示す。
【図６－２】図６は、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃをコードするヌクレオチド配列を示す。配列番号２７がセンス鎖に対応し、配列番号３４がアンチセンス鎖に対応する。ＴＰＡリーダー（ヌクレオチド１～６６）に二重下線を付し、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（ヌクレオチド７６～３９６）に下線を付す。ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１）のアミノ酸配列も示す。
【図７】図７は、リーダーを持たない切断されたＧＤＦトラップＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃのアミノ酸配列を示す（配列番号２８）。切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１）に下線を付す。配列決定によって成熟融合タンパク質のＮ末端残基であることが明らかになったグルタミン酸と同様に、ネイティブな配列の７９位において置換されたアスパラギン酸に二重下線を付し、目立たせている。
【図８】図８は、リーダー、ｈＦｃドメイン、およびリンカーを持たない切断されたＧＤＦトラップＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）のアミノ酸配列を示す（配列番号２９）。配列決定によって成熟融合タンパク質のＮ末端残基であることが明らかになったグルタミン酸と同様に、ネイティブな配列の７９位において置換されたアスパラギン酸に下線およびマーカーを付す。
【図９－１】図９は、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃをコードする代替ヌクレオチド配列を示す。配列番号３０がセンス鎖に対応し、配列番号３５がアンチセンス鎖に対応する。ＴＰＡリーダー（ヌクレオチド１～６６）に二重下線を付し、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（ヌクレオチド７６～３９６）に下線を付し、細胞外ドメインの野生型ヌクレオチド配列における置換に二重下線およびマーカーを付す（図６、配列番号２７と比較）。ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１）のアミノ酸配列も示す。
【図９－２】図９は、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃをコードする代替ヌクレオチド配列を示す。配列番号３０がセンス鎖に対応し、配列番号３５がアンチセンス鎖に対応する。ＴＰＡリーダー（ヌクレオチド１～６６）に二重下線を付し、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（ヌクレオチド７６～３９６）に下線を付し、細胞外ドメインの野生型ヌクレオチド配列における置換に二重下線およびマーカーを付す（図６、配列番号２７と比較）。ＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１

３１）のアミノ酸配列も示す。
【図１０】図１０は、図９に示した代替ヌクレオチド配列（配列番号３０）のヌクレオチド７６～３９６を示す（配列番号３１）。図９に示したものと同じヌクレオチド置換について、ここでも同様に下線を付し、目立たせている。配列番号３１は、Ｌ７９Ｄ置換を持つ切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１に対応する）、例えばＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）のみをコードする。
【図１１】図１１は、化学療法誘発性貧血のマウスモデルにおけるヘモグロビン濃度に対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を示す。データは、平均値±ＳＥＭである。＊＊、同時点でパクリタキセルに対してＰ＜０．０１。このＧＤＦトラップはパクリタキセルによる処置によって誘発された貧血を相殺した。
【図１２】図１２は、片側腎摘出された（ＮＥＰＨＸ）慢性腎疾患のマウスモデルにおける赤血球（ＲＢＣ）レベルに対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を示す。データは平均値±ＳＥＭである。＊＊＊、ベースラインに対してＰ＜０．００１。このＧＤＦトラップは、対照マウスにおいて観察された腎摘出誘発性貧血を逆転させた。
【図１３】図１３は、片側腎摘出された（ＮＥＰＨＸ）慢性腎疾患のマウスモデルにおける赤血球（ＲＢＣ）、ヘモグロビン（ＨＧＢ）、およびヘマトクリット（ＨＣＴ）のレベルに対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を示す。データは、４週間にわたる、ベースラインからの平均変化である（±ＳＥＭ）。＊ＮＥＰＨＸ対照に対してＰ＜０．０５、＊＊ＮＥＰＨＸ対照に対してＰ＜０．０１、＊＊＊ＮＥＰＨＸ対照に対してＰ＜０．００１。このＧＤＦトラップは、これらの赤血球パラメータをそれぞれ、腎臓がインタクトな（偽）マウスと同様の大きさまで増加させ、腎摘出に伴うこれらの赤血球パラメータの減退を妨げた。
【図１４】図１４は、急性失血によって誘発された貧血のラットモデルにおける赤血球（ＲＢＣ）レベルに対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を示す。－１日目に血液を除去し、０日目および３日目に投薬した。データは、平均値±ＳＥＭである。＊＊同時点でビヒクルに対してＰ＜０．０１、＊＊＊同時点でビヒクルに対してＰ＜０．００１。このＧＤＦトラップは、失血誘発性貧血からの回復の速度および程度を改善した。
【図１５】図１５は、カニクイザルにおける、赤血球濃度のベースラインからの絶対的な変化に対する、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃ（灰色）またはＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（黒色）を用いた処置の作用を示す。ＶＥＨ＝ビヒクル。データは平均値±ＳＥＭ。群当たりｎ＝４～８。
【図１６】図１６は、カニクイザルにおける、ヘマトクリットのベースラインからの絶対的な変化に対する、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃ（灰色）またはＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（黒色）を用いた処置の作用を示す。ＶＥＨ＝ビヒクル。データは平均値±ＳＥＭ。群当たりｎ＝４～８。
【図１７】図１７は、カニクイザルにおける、ヘモグロビン濃度のベースラインからの絶対的な変化に対する、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃ（灰色）またはＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（黒色）を用いた処置の作用を示す。ＶＥＨ＝ビヒクル。データは平均値±ＳＥＭ。群当たりｎ＝４～８。
【図１８】図１８は、カニクイザルにおける、循環網状赤血球濃度のベースラインからの絶対的な変化に対する、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃ（灰色）またはＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（黒色）を用いた処置の作用を示す。ＶＥＨ＝ビヒクル。データは平均値±ＳＥＭ。群当たりｎ＝４～８。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
（発明の詳細な説明）
（１．概要）
トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）スーパーファミリーは、共通の配列

エレメントと構造モチーフを共有する、種々の増殖因子を含む。これらのタンパク質は、脊椎動物および無脊椎動物の両方における広範な種々の細胞型に対して生物学的作用を発揮することが公知である。このスーパーファミリーのメンバーは、胚発生の間に、パターン形成および組織の特異化において重要な機能を果たし、そして、脂質生成、筋発生、軟骨形成、心臓発生、造血、神経発生および上皮細胞分化を含む種々の分化プロセスに影響を及ぼし得る。このファミリーは、２つの一般的な枝：ＢＭＰ／ＧＤＦの枝およびＴＧＦ－β／アクチビン／ＢＭＰ１０の枝、に分けられ、これらのメンバーは、多様な、しばしば相補的な作用を有する。ＴＧＦ－βファミリーのメンバーの活性を操作することによって、しばしば、生物において有意な生理学的変化を引き起こすことが可能である。例えば、ウシのＰｉｅｄｍｏｎｔｅｓｅおよびＢｅｌｇｉａｎ　Ｂｌｕｅ品種は、ＧＤＦ８（ミオスタチンとも呼ばれる）遺伝子に機能喪失変異を有しており、筋肉量の顕著な増加を引き起こしている。Ｇｒｏｂｅｔら、Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ．１９９７年、１７巻（１号）：７１～４頁。さらに、ヒトでは、ＧＤＦ８の不活性な対立遺伝子は、筋肉量の増加、および、報告によれば、非常に優れた強度と関連している。Ｓｃｈｕｅｌｋｅら、Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　２００４年、３５０巻：２６８２～８頁。

【００２６】

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

【００２７】

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

【００２８】

アクチビンは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーに属する二量体ポリペプチド増殖因子である。３つの主なアクチビン形態（Ａ、ＢおよびＡＢ）が存在し、これらは、２つの密接に関連するβサブユニットのホモ二量体／ヘテロ二量体（それぞれ、$\beta_A\beta_A$、$\beta_B\beta_B$および$\beta_A\beta_B$）である。ヒトゲノムはまた、アクチビンＣおよびアクチビンＥもコードしているが、これらは、主として肝臓で発現されており、そして、β_Cもしくはβ_Eを含

むヘテロ二量体形態もまた公知である。ＴＧＦ－βスーパーファミリーにおいて、アクチビンは、卵巣および胎盤の細胞におけるホルモン生成を刺激し得、神経細胞の生存を支援し得、細胞周期の進行に対して細胞型に依存して正もしくは負に影響を及ぼし得、そして、少なくとも両生類の胚において中胚葉分化を誘導し得る、独特かつ多機能の因子である（ＤｅＰａｏｌｏら、１９９１年、Ｐｒｏｃ Ｓｏｃ Ｅｐ Ｂｉｏｌ Ｍｅｄ．１９８巻：５００～５１２頁；Ｄｙｓｏｎら、１９９７年、Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ．７巻：８１～８４頁；Ｗｏｏｄｒｕｆｆ、１９９８年、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．５５巻：９５３～９６３頁）。さらに、刺激されたヒト単球性白血病細胞から単離された赤血球分化因子（ＥＤＦ）は、アクチビンＡと同一であることが分かった（Ｍｕｒａｔａら、１９８８年、ＰＮＡＳ、８５巻：２４３４頁）。アクチビンＡは、骨髄における赤血球生成を促進することが示唆されている。いくつかの組織では、アクチビンのシグナル伝達は、その関連するヘテロ二量体であるインヒビンによって拮抗される。例えば、下垂体からの卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）の放出の間に、アクチビンは、ＦＳＨの分泌および合成を促進するが、インヒビンは、ＦＳＨの分泌および合成を抑制する。アクチビンの生活性を調節し得、そして／または、アクチビンに結合し得る他のタンパク質としては、フォリスタチン（ＦＳ）、フォリスタチン関連タンパク質（ＦＳＲＰ）およびα$_2$－マクログロブリンが挙げられる。

【００２９】

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

【００３０】

増殖および分化因子８（ＧＤＦ８）は、ミオスタチンとしても公知である。ＧＤＦ８は、骨格筋量の負の調節因子である。ＧＤＦ８は、発生中および成体の骨格筋で高く発現される。トランスジェニックマウスでのＧＤＦ８ヌル変異は、骨格筋の著しい肥大および過形成を特徴とする（ＭｃＰｈｅｒｒｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９７年、３８７巻：８３～９０頁）。骨格筋量の類似した増加は、ウシ（Ａｓｈｍｏｒｅら、１９７４年、Ｇｒｏｗｔｈ、３８巻：５０１～５０７頁；ＳｗａｔｌａｎｄおよびＫｉｅｆｆｅｒ、Ｊ．Ａｎｉｍ．Ｓｃｉ．、１９９４年、３８巻：７５２～７５７頁；ＭｃＰｈｅｒｒｏｎおよびＬｅｅ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９９７年、９４巻：１２４５７～１２４６１頁およびＫａｍｂａｄｕｒら、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．、１９９７年、７巻：９１０～９１５頁）、および驚くべきことにヒト（Ｓｃｈｕｅｌｋｅら

、Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ、２００４年、３５０巻：２６８２～８頁）のＧＤＦ８の天然に存在する変異において明白である。研究は、ヒトのＨＩＶ感染に関連する筋肉消耗には、ＧＤＦ８タンパク質発現の増加が付随することも示している（Ｇｏｎｚａｌｅｚ－Ｃａｄａｖｉｄら、ＰＮＡＳ、１９９８年、９５巻：１４９３８～４３頁）。さらに、ＧＤＦ８は筋肉特異的酵素（例えば、クレアチンキナーゼ）の生成を調節すること、および筋芽細胞増殖を調節することができる（国際公開第００／４３７８１号）。ＧＤＦ８プロペプチドは、成熟したＧＤＦ８ドメイン二量体に非共有結合的に結合し、その生物活性を不活性化することができる（Ｍｉｙａｚｏｎｏら、（１９８８年）Ｊ． Ｂｉｏｌ． Ｃｈｅｍ．、２６３巻：６４０７～６４１５頁；Ｗａｋｅｆｉｅｌｄら（１９８８年）Ｊ． Ｂｉｏｌ． Ｃｈｅｍ．、２６３巻：７６４６～７６５４頁およびＢｒｏｗｎら（１９９０年）Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ、３巻：３５～４３頁）。ＧＤＦ８または構造的に関連するタンパク質に結合して、それらの生物活性を阻害する他のタンパク質には、フォリスタチン、および潜在的に、フォリスタチン関連のタンパク質が含まれる（Ｇａｍｅｒら（１９９９年）Ｄｅｖ． Ｂｉｏｌ．、２０８巻：２２２～２３２頁）。

【００３１】

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

【００３２】

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

【００３３】

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

ｔｒｉｃｓ）を指し、そのような変化が生じる機構に関しては中立であることが意図される。

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

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

【００３７】

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

【００３８】

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

【００３９】

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

【００４０】

用語「配列類似性」は、そのあらゆる文法的な形態において、共通する進化の起源を共

有している場合も共有していない場合もある、核酸もしくはアミノ酸配列間の同一性もしくは対応性の程度をいう。

【００４１】

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

【００４２】

（２．ＧＤＦトラップポリペプチド）

特定の態様では、本発明はＧＤＦトラップポリペプチド、例えば、可溶性の改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチド、例えば、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドのフラグメント、機能的改変体、および修飾された形態を含めたものに関する。特定の実施形態では、ＧＤＦトラップポリペプチドは、少なくとも１の、対応する野生型ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドと同様または同一の生物活性を有する。例えば、本発明のＧＤＦトラップポリペプチドは、ＡｃｔＲＩＩＢリガンドに結合し、その機能を阻害し得る（例えば、アクチビンＡ、アクチビンＡＢ、アクチビンＢ、Ｎｏｄａｌ、ＧＤＦ８、ＧＤＦ１１またはＢＭＰ７）。任意選択で、ＧＤＦトラップポリペプチドは赤血球レベルを増加させる。ＧＤＦトラップポリペプチドの例としては、１つまたは複数の配列の差異を有するヒトＡｃｔＲＩＩＢ前駆体ポリペプチド（配列番号１または３９）、および１つまたは複数の配列の差異を有する可溶性ヒトＡｃｔＲＩＩＢポリペプチド（例えば、配列番号２、３、７、１１、２６、２８、２９、３２、３７、３８、４０および４１）が挙げられる。ＧＤＦトラップは、例えばＧＤＦ１１および／またはミオスタチンを含めた他のＡｃｔＲＩＩＢリガンドと比較してアクチビンに対する親和性が減少したＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドを指す。

【００４３】

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

【００４４】

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

【００４５】

ヒトＡｃｔＲＩＩＢ前駆体タンパク質の配列は以下の通りである。

【００４６】
【化１】

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI（**配列番号1**）

【００４７】
シグナルペプチドに一重下線を付す。細胞外ドメインは太字で示し、そして、潜在的なＮ連結グリコシル化部位は四角で囲む。

【００４８】
６４位にアラニンを持つ形態も、以下の通り文献に報告されている。

【００４９】
【化２】

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI（**配列番号39**）

【００５０】
ヒトＡｃｔＲＩＩＢの可溶性（細胞外）の、プロセシング後のポリペプチド配列は以下の通りである。

【００５１】

【化３】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG

TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP

EAGGPEVTYEPPPTAPT （配列番号 2)

【００５２】

Ａ６４を持つ代替の形態は以下の通りである。

【００５３】

【化４】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG

TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP

EAGGPEVTYEPPPTAPT (配列番号 40)

【００５４】

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

【００５５】

【化５】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG

TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP

EA (配列番号 3)

【００５６】

Ａ６４を持つ代替の形態は以下の通りである。

【００５７】

【化６】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG

TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP

EA (配列番号 41)

【００５８】

一部の条件では、タンパク質はＮ末端に「ＳＧＲ．．．」配列を伴って生成され得る。ヒトＡｃｔＲＩＩＢ前駆体タンパク質をコードする核酸配列は以下の通りである（Ｇｅｎｂａｎｋエントリー ＮＭ＿００１１０６のヌクレオチド５～１５４３）（示した配列は６４位にアラニンを提供し、代わりにアルギニンを提供するように修飾され得る）。

【００５９】

【化７】

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC

【００６０】

【化８】

AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCTTCGTTGGA
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCCACCATTAAA
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCC
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA（配列番号　4）

【００６１】

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

【００６２】

【化９】

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT

GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA

GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC

ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT

ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT

【００６３】

【化１０】

CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA

GAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCA

CC (配列番号　　5)

【００６４】

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

【００６５】

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

【００６６】

Ａｔｔｉｓａｎｏら（Ｃｅｌｌ．１９９２年１月１０日；６８巻（１号）９７～１０８頁）は、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により、アクチビンに対する受容体の親和性が減少することを示した。配列番号１のアミノ酸２０～１１９を含有するＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃ融合タンパク質、「ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１１９）－Ｆｃ」は、プロリンノット領域および完全な膜近傍ドメインを含むＡｃｔＲＩ

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

【００６７】

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

【００６８】

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

【００６９】

本開示は、図１に示されるように、合成ＡｃｔＲＩＩＢ構造の分析結果を含み、これは

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

【００７０】

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

【００７１】

本開示は、さらなるＮ－連結グリコシル化部位（Ｎ－Ｘ－Ｓ／Ｔ）を加えることにより

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

【００７２】

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

【００７３】

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

【００７４】

特定の実施形態では、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの単離されたフラグメントは、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドをコードする核酸（例えば、配列番号４および５）の対応するフラグメントから組換えにより生成されるポリペプチドをスクリーニングすることによって得られ得る。さらに、フラグメントは、従来のメリフィールド固相ｆ－Ｍｏｃもしくはｔ

－Ｂｏｃ化学のような当該分野で公知の技術を用いて化学的に合成され得る。フラグメントは、（組換えにより、または、化学合成により）生成され得、そして、例えば、ＡｃｔＲＩＩＢタンパク質またはＡｃｔＲＩＩＢリガンドのアンタゴニスト（インヒビター）またはアゴニスト（アクチベーター）として機能し得るペプチジルフラグメントを同定するために試験され得る。

【００７５】

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

【００７６】

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

【００７７】

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

【００７８】

例えば、本開示は、アクチビンと比較してＧＤＦ８／ＧＤＦ１１に優先的に結合するＧＤＦトラップポリペプチドを提供する。このような選択的な改変体は、治療効果のために赤血球細胞レベルの非常に大きな増加が必要となり得、およびある程度の的外れの作用が許容され得る、重篤な疾患の処置のためにはあまり望ましくない可能性があるが、本開示は、さらに、的外れの作用を減少させることについてのこのようなペプチドの望ましさを確立する。例えば、ＡｃｔＲＩＩＢタンパク質のアミノ酸残基、例えばＥ３９、Ｋ５５、Ｙ６０、Ｋ７４、Ｗ７８、Ｄ８０、およびＦ１０１はリガンド結合ポケット内にあり、そ

のリガンド、例えばアクチビンおよびＧＤＦ８などへの結合を媒介する。したがって、本発明は、これらのアミノ酸残基に１つまたは複数の変異を含む、ＡｃｔＲＩＩＢ受容体の変更されたリガンド結合ドメイン（例えば、ＧＤＦ８結合ドメイン）を含むＧＤＦトラップを提供する。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、ＡｃｔＲＩＩＢ受容体の野生型のリガンド結合ドメインと比較して、ＧＤＦ８などのリガンドに対する選択性が増加されていることがあり得る。例示のように、これらの変異は、アクチビンを越える、ＧＤＦ８への変更されたリガンド結合ドメインの選択性を増加させる。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、ＧＤＦ８の結合についてのK_dに対するアクチビンの結合についてのK_dの比を有し、それは、野生型のリガンド結合ドメインに対する比と比較して少なくとも２倍、５倍、１０倍、または１００倍までも大きい。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、ＧＤＦ８の阻害についてのIC_{50}に対するアクチビンの阻害についてのIC_{50}の比を有し、それは、野生型のリガンド結合ドメインと比較して少なくとも２倍、５倍、１０倍、または１００倍までも大きい。任意選択で、変更されたリガンド結合ドメインは、アクチビンの阻害についてのIC_{50}の、少なくとも２分の１、５分の１、１０分の１、または１００分の１までも小さいIC_{50}でＧＤＦ８を阻害する。

【００７９】

特定の例として、ＡｃｔＩＩＢのリガンド結合ドメインの正荷電アミノ酸残基Ａｓｐ（Ｄ８０）は、アクチビンではなくＧＤＦ８に優先的に結合するＧＤＦトラップポリペプチドを生成するために異なるアミノ酸残基に変異され得る。Ｄ８０残基は、非荷電アミノ酸残基、負荷電アミノ酸残基、および疎水性アミノ酸残基からなる群より選択されるアミノ酸残基に変えられることが好ましい。さらなる特定の例として、疎水性残基、Ｌ７９は、ＧＤＦ１１の結合を保持する一方でアクチビンの結合を大きく低下させるために、酸性アミノ酸のアスパラギン酸またはグルタミン酸に変更され得る。当業者に認識されるように、記載された変異、改変体または修飾の大半は、核酸レベルで、または、いくつかの場合、翻訳後修飾または化学合成によって作製され得る。このような技法は当該分野で周知である。

【００８０】

特定の実施形態では、本発明は、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドのグリコシル化を変更するために、ＡｃｔＲＩＩＢに特異的な変異を有するＧＤＦトラップポリペプチドを企図する。ＧＤＦトラップポリペプチドのグリコシル化部位の例は、図１に例示される（例えば、下線を付したＮＸ（Ｓ／Ｔ）部位）。このような変異は、１または複数のグリコシル化部位（例えば、Ｏ－連結もしくはＮ－連結のグリコシル化部位）を導入もしくは排除するように選択され得る。アスパラギン連結グリコシル化認識部位は、一般に、トリペプチド配列、アスパラギン－Ｘ－スレオニン（ここで、「Ｘ」は任意のアミノ酸である）を含み、この配列は、適切な細胞のグリコシル化酵素によって特異的に認識される。変化はまた、（Ｏ－連結グリコシル化部位については）野生型ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの配列への、１または複数のセリンもしくはスレオニン残基の付加、または、１または複数のセリンもしくはスレオニン残基による置換によってなされ得る。グリコシル化認識部位の第１位もしくは第３位のアミノ酸の一方もしくは両方における種々のアミノ酸置換もしくは欠失（および／または、第２位におけるアミノ酸の欠失）は、修飾されたトリペプチド配列において非グリコシル化をもたらす。ＧＤＦトラップポリペプチドにおける糖質部分の数を増加させる別の手段は、ＧＤＦトラップポリペプチドへのグリコシドの化学的もしくは酵素的なカップリングによるものである。使用されるカップリング様式に依存して、糖は、（ａ）アルギニンおよびヒスチジン；（ｂ）遊離カルボキシル基；（ｃ）遊離スルフヒドリル基（例えば、システインのもの）；（ｄ）遊離ヒドロキシル基（例えば、セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンのもの）；（ｅ）芳香族残基（例えば、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンのもの）；または（ｆ）グルタミンのアミド基に付加され得る。これらの方法は、本明細書中に参考として援用されるＷＯ　８７／０５３３０ならびにＡｐｌｉｎおよびＷｒｉｓｔｏｎ（１９８１年）ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．　Ｒｅ

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

【００８１】

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

【００８２】

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

【００８３】

参照ＧＤＦトラップポリペプチドに対して、選択的効力を有する、組み合わせで得られる（ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌｌｙ－ｄｅｒｉｖｅｄ）改変体が作製され得る。このような改変体タンパク質は、組換えＤＮＡ構築物から発現されたとき、遺伝子治療のプロトコルにおいて使用され得る。同様に、変異誘発は、対応する修飾されていないＧＤＦトラップポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する改変体を生じ得る。例えば、変更されたタンパク質は、タンパク質分解、または、修飾されていないＧＤＦトラップポリペプチドの崩壊もしくは他の方法で不活性化をもたらす他のプロセスに対してより安定性であるかもしくは安定性が低いかのいずれかにされ得る。このような改変体およびこれを

コードする遺伝子は、ＧＤＦトラップポリペプチドの半減期を調節することによってＧＤＦトラップポリペプチドレベルを変更するために利用され得る。例えば、短い半減期は、より一過性の生物学的作用を生じ得、そして、誘導性の発現系の一部である場合、細胞内での組換えＧＤＦトラップポリペプチドレベルのより厳しい制御を可能にし得る。Ｆｃ融合タンパク質では、変異は、タンパク質の半減期を変更するために、リンカー（存在する場合）および／またはＦｃ部分において作製され得る。

【００８４】

特定の実施形態では、本発明のＧＤＦトラップポリペプチドは、さらに、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチド中に天然に存在する任意のものに加えて、翻訳後修飾を含み得る。このような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が挙げられるがこれらに限定されない。結果として、ＧＤＦトラップポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、多糖類もしくは単糖類およびホスフェイトのような非アミノ酸成分を含み得る。このような非アミノ酸成分の、ＧＤＦトラップポリペプチドの機能に対する影響は、他のＧＤＦトラップポリペプチド改変体について本明細書中に記載されるようにして試験され得る。ＧＤＦトラップポリペプチドの新生形態を切断することによってＧＤＦトラップポリペプチドが細胞内で生成される場合、翻訳後プロセシングもまた、このタンパク質の正確な折り畳みおよび／または機能にとって重要となり得る。様々な細胞（例えば、ＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＭＤＣＫ、２９３、ＷＩ３８、ＮＩＨ－３Ｔ３またはＨＥＫ２９３）が、このような翻訳後の活性のための特定の細胞機構および特徴的なメカニズムを有し、そして、ＧＤＦトラップポリペプチドの正確な修飾およびプロセシングを保証するように選択され得る。

【００８５】

特定の態様では、ＧＤＦトラップポリペプチドは、少なくともＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの一部分と１または複数の融合ドメインとを有する融合タンパク質を含む。このような融合ドメインの周知の例としては、ポリヒスチジン、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（例えば、Ｆｃ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、またはヒト血清アルブミンが挙げられるがこれらに限定されない。融合ドメインは、所望される特性を与えるように選択され得る。例えば、いくつかの融合ドメインが、アフィニティクロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。アフィニティ精製の目的では、グルタチオン－、アミラーゼ－、およびニッケル－もしくはコバルト－結合化樹脂のような、アフィニティクロマトグラフィーのための適切なマトリクスが使用される。このようなマトリクスの多くは、Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＧＳＴ精製システムおよび（ＨＩＳ$_6$）融合パートナーと共に有用なＱＩＡｅｘｐｒｅｓｓ^{TM}システム（Ｑｉａｇｅｎ）のような「キット」の形態で利用可能である。別の例としては、融合ドメインは、ＧＤＦトラップポリペプチドの検出を容易にするように選択され得る。このような検出ドメインの例としては、種々の蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ）、ならびに、「エピトープタグ」（これは、特定の抗体に利用可能な、通常は短いペプチド配列である）が挙げられる。特定のモノクローナル抗体に容易に利用可能な周知のエピトープタグとしては、ＦＬＡＧ、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（ＨＡ）およびｃ－ｍｙｃタグが挙げられる。いくつかの場合、融合ドメインは、関連のプロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによって、そこから組換えタンパク質を解放することを可能にする、第Ｘａ因子またはトロンビンのようなプロテアーゼ切断部位を有する。解放されたタンパク質は、次いで、その後のクロマトグラフィーによる分離によって、融合ドメインから単離され得る。特定の好ましい実施形態では、ＧＤＦトラップポリペプチドは、インビボでＧＤＦトラップポリペプチドを安定化させるドメイン（「安定化」ドメイン）と融合される。「安定化」とは、それが、崩壊の減少によるものであるか、腎臓によるクリアランスの減少によるものであるか、他の薬物動態作用によるものであるかとは無関係に、血清半減期を増加させる任意のものを意味する。免疫グロブリンのＦｃ部分との融合は、広範囲のタンパク質に対して所望の薬物動態特性を与えることが公知である。同様に、ヒト血清アルブミン

への融合は、所望の特性を与え得る。選択され得る融合ドメインの他のタイプとしては、多量体化（例えば、二量体化、四量体化）ドメインおよび機能的ドメイン（例えば、赤血球レベルのさらなる増加のような付加的な生物学的機能を与えるもの）が挙げられる。

【００８６】

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

【００８７】

【化１１】

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHEDPEVKFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

【００８８】

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

【００８９】

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

【００９０】

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

【００９１】

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

【００９２】

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

【００９３】

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

【００９４】

（３．ＧＤＦトラップポリペプチドをコードする核酸）

特定の態様では、本発明は、本明細書中に開示されるＧＤＦトラップポリペプチドのいずれかをコードする単離されたおよび／または組換えの核酸を提供する。配列番号４は、天然に存在するＡｃｔＲＩＩＢ前駆体ポリペプチドをコードし、一方配列番号５は、可溶性ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドをコードし、配列番号２５、２７、３０および３１は可溶性ＧＤＦトラップをコードする。本主題の核酸は、一本鎖もしくは二本鎖であり得る。このような核酸は、ＤＮＡ分子もしくはＲＮＡ分子であり得る。これらの核酸は、例えば、ＧＤＦトラップポリペプチドを作製するための方法において、または（例えば、遺伝子治

療アプローチにおいて）直接的な治療剤として使用され得る。

【００９５】

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

【００９６】

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

【００９７】

他の実施形態では、本発明の核酸はまた、配列番号５、２５、２７、３０または３１に指定されるヌクレオチド配列に対して高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、配列番号５、２５、２７、３０または３１の相補配列、あるいは、これらのフラグメントを含む。上述のように、当業者は、ＤＮＡのハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件が変更され得ることを容易に理解する。例えば、約４５℃における６．０×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）でのハイブリダイゼーションの後に、５０℃における２．０×ＳＳＣの洗浄を行い得る。例えば、洗浄工程における塩濃度は、５０℃における約２．０×ＳＳＣの低ストリンジェンシーから、５０℃における約０．２×ＳＳＣの高ストリンジェンシーまで選択され得る。さらに、洗浄工程における温度は、室温（約２２℃）の低ストリンジェンシー条件から、約６５℃の高ストリンジェンシー条件まで上昇され得る。温度と塩の両方が変更されても、温度または塩濃度が一定に保たれ、他の変数が変更されてもよい。一実施形態では、本発明は、室温における６×ＳＳＣとその後の室温で２×ＳＳＣでの洗浄の低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。

【００９８】

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

【００９９】

特定の実施形態では、本発明の組換え核酸は、発現構築物において１または複数の調節性ヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。調節性のヌクレオチド配列は、一般に、

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

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌中でのベクターの増殖を促進するための原核生物の配列と、真核生物細胞において発現される１または複数の真核生物の転写単位との

両方を含む。ｐｃＤＮＡＩ／ａｍｐ、ｐｃＤＮＡＩ／ｎｅｏ、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＳＶ２ｇｐｔ、ｐＳＶ２ｎｅｏ、ｐＳＶ２－ｄｈｆｒ、ｐＴｋ２、ｐＲＳＶｎｅｏ、ｐＭＳＧ、ｐＳＶＴ７、ｐｋｏ－ｎｅｏおよびｐＨｙｇ由来のベクターは、真核生物細胞のトランスフェクションに適切な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターのいくつかは、原核生物細胞および真核生物細胞の両方における複製および薬物耐性選択を容易にするために、細菌プラスミド（例えば、ｐＢＲ３２２）からの配列を用いて修飾される。あるいは、ウシパピローマウイルス（ＢＰＶ－１）またはエプスタイン－バーウイルス（ｐＨＥＢｏ、ｐＲＥＰ由来およびｐ２０５）のようなウイルスの誘導体が、真核生物細胞におけるタンパク質の一過的な発現のために使用され得る。他のウイルス（レトロウイルスを含む）発現系の例は、遺伝子治療送達系の説明において以下に見出され得る。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換において用いられる種々の方法は、当該分野で周知である。原核生物細胞および真核生物細胞の両方についての他の適切な発現系、ならびに、一般的な組換え手順については、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ Ｅｄ.、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、ＦｒｉｔｓｃｈおよびＭａｎｉａｔｉｓ編（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、１９８９年）第１６および１７章を参照のこと。いくつかの場合において、バキュロウイルス発現系を用いて組換えポリペプチドを発現させることが望ましくあり得る。このようなバキュロウイルス発現系の例としては、ｐＶＬ由来のベクター（例えば、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３およびｐＶＬ９４１）、ｐＡｃＵＷ由来のベクター（例えば、ｐＡｃＵＷｌ）およびｐＢｌｕｅＢａｃ由来のベクター（例えば、β－ｇａｌを含むｐＢｌｕｅＢａｃ ＩＩＩ）が挙げられる。

【０１０３】

好ましい実施形態では、ベクターは、ＣＨＯ細胞における本主題のＧＤＦトラップポリペプチドの生成のために設計される（例えば、Ｐｃｍｖ－Ｓｃｒｉｐｔベクター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，Ｃａｌｉｆ.）、ｐｃＤＮＡ４ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆ.）およびｐＣＩ－ｎｅｏベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃ））。明らかであるように、本主題の遺伝子構築物は、例えば、タンパク質（融合タンパク質または改変体タンパク質を含む）を生成するため、精製のために、培養物において増殖させた細胞において本主題のＧＤＦトラップポリペプチドの発現を引き起こすために使用され得る。

【０１０４】

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

【０１０５】

したがって、本発明はさらに、本主題のＧＤＦトラップポリペプチドを生成する方法に関する。例えば、ＧＤＦトラップポリペプチドをコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞は、ＧＤＦトラップポリペプチドの発現を起こすことが可能な適切な条件下で培養され得る。ＧＤＦトラップポリペプチドは、ＧＤＦトラップポリペプチドを含む細胞および培地の混合物から分泌および単離され得る。あるいは、ＧＤＦトラップポリペプチドは、細胞質または膜画分に保持され得、そして、細胞が回収、溶解され、そして、タンパク質が単離される。細胞培養物は、宿主細胞、培地および他の副産物を含む。細胞培養に適切な培地は、当該分野で周知である。本主題のＧＤＦトラップポリペプチドは、タンパク質の精製についての当該分野で公知の技術（イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、およびＧＤＦトラップポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体を用いた免疫親和性精製を含む）を用いて、細胞培養培地、宿主細胞またはこの両方から単離され得る。好ましい実施形態では、ＧＤＦトラ

ップポリペプチドは、その精製を促進するドメインを含む融合タンパク質である。
【０１０６】
別の実施形態では、精製用リーダー配列（例えば、組換えＧＤＦトラップポリペプチドの所望の部分のＮ末端に位置するポリ－（Ｈｉｓ）／エンテロキナーゼ切断部位の配列）をコードする融合遺伝子は、Ni^{2+}金属樹脂を用いる親和性クロマトグラフィーによる、発現された融合タンパク質の精製を可能にし得る。その後、精製用リーダー配列は、引き続いて、エンテロキナーゼでの処理によって除去され、精製ＧＤＦトラップポリペプチドを提供し得る（例えば、Ｈｏｃｈｕｌｉら、（１９８７年）Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　４１１巻：１７７頁；およびＪａｎｋｎｅｃｈｔら、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８８巻：８９７２頁を参照のこと）。
【０１０７】
融合遺伝子を作製するための技術は周知である。本質的には、異なるポリペプチド配列をコードする種々のＤＮＡフラグメントの接合は、ライゲーションのための平滑末端もしくはスタガード（ｓｔａｇｇｅｒｅｄ）末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じた粘着末端のフィルイン（ｆｉｌｌｉｎｇ－ｉｎ）、所望されない接合を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、および酵素によるライゲーション、を用いる従来の技術に従って行われる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む従来の技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、２つの連続した遺伝子フラグメント間の相補的なオーバーハング（ｏｖｅｒｈａｎｇ）を生じるアンカープライマーを用いて行われ得、これらのフラグメントは、その後、キメラ遺伝子配列を生じるようにアニーリングされ得る（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ：１９９２年を参照のこと）。
【０１０８】
（４．スクリーニングアッセイ）
特定の態様では、本発明は、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストである化合物（因子）を同定するための、本主題のＧＤＦトラップポリペプチド（例えば、可溶性の改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチド）の使用に関する。このスクリーニングによって同定された化合物は、インビボまたはインビトロでの、赤血球、ヘモグロビンおよび／または網状赤血球のレベルを調節する能力を評価するために試験され得る。これらの化合物は、例えば、動物モデルにおいて試験され得る。
【０１０９】
ＡｃｔＲＩＩＢのシグナル伝達を標的化することによって、赤血球またはヘモグロビンのレベルを増加させるための治療剤についてスクリーニングするための多数のアプローチが存在する。特定の実施形態では、選択された細胞株においてＡｃｔＲＩＩＢ媒介性の作用を混乱させる因子を同定するために、化合物のハイスループットスクリーニングが行われ得る。特定の実施形態では、アッセイは、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの、その結合パートナー、例えばＡｃｔＲＩＩＢリガンドなど（例えば、アクチビン、Ｎｏｄａｌ、ＧＤＦ８、ＧＤＦ１１またはＢＭＰ７）への結合を特異的に阻害または減少させる化合物をスクリーニングおよび同定するために行われ得る。あるいは、アッセイは、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドの、その結合パートナー、例えばＡｃｔＲＩＩＢリガンドなどへの結合を増強する化合物を同定するために使用され得る。さらなる実施形態では、化合物は、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドと相互作用するその能力によって同定され得る。
【０１１０】
種々のアッセイ形式が十分であり、そして、本開示を考慮すれば、本明細書中に明示的に記載されない形式は、本明細書中に記載されていないにもかかわらず、当業者によって理解される。本明細書中に記載されるように、本発明の試験化合物（因子）は、任意の組み合わせ化学の方法によって作製され得る。あるいは、本主題の化合物は、インビボまたはインビトロで合成された天然に存在する生体分子であり得る。組織増殖の調節因子として作用するその能力について試験される化合物（因子）は、例えば、細菌、酵母、植物ま

たは他の生物によって生成されても（例えば、天然の生成物）、化学的に生成されても（例えば、ペプチド模倣物を含む低分子）、組換えにより生成されてもよい。本発明によって企図される試験化合物としては、非ペプチジル有機分子、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、糖、ホルモンおよび核酸分子が挙げられる。特定の実施形態では、試験因子は、約２０００ダルトン未満の分子量を持つ小さな有機分子である。

【０１１１】

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

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドとその結合タンパク質との間の複合体の形成は、種々の技術によって検出され得る。例えば、複合体の形成の調節は、例えば、検出可能に標識されたタンパク質、例えば、放射標識（例えば、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃまたは^{3}Ｈ）、蛍光標識（例えば、ＦＩＴＣ）、または、酵素標識されたＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドまたは

その結合タンパク質を用いて、イムノアッセイによって、あるいは、クロマトグラフィーによる検出によって定量され得る。

【０１１５】

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

【０１１６】

さらに、本発明は、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を妨害または助長する因子を同定するための、「ツーハイブリッドアッセイ」としても公知である相互作用トラップアッセイの使用を企図する。例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓら（１９９３年）Ｃｅｌｌ ７２巻：２２３～２３２頁；Ｍａｄｕｒａら（１９９３年）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２６８巻：１２０４６～１２０５４頁；Ｂａｒｔｅｌら（１９９３年）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４巻：９２０～９２４頁；およびＩｗａｂｕｃｈｉら（１９９３年）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ８巻：１６９３～１６９６頁を参照のこと。特定の実施形態では、本発明は、ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチドとその結合タンパク質との間の相互作用を解離させる化合物（例えば、低分子またはペプチド）を同定するための、逆ツーハイブリッドシステムの使用を企図する。例えば、ＶｉｄａｌおよびＬｅｇｒａｉｎ（１９９９年）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２７巻：９１９～２９頁；ＶｉｄａｌおよびＬｅｇｒａｉｎ（１９９９年）Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １７巻：３７４～８１頁；ならびに米国特許第５，５２５，４９０号；同第５，９５５，２８０号；および同第５，９６５，３６８号を参照のこと。

【０１１７】

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

【０１１８】

（５．例示的な治療的用途）

特定の実施形態では、本発明のＧＤＦトラップポリペプチドは、げっ歯類および霊長類、特に、ヒト患者のような哺乳動物における赤血球のレベルを増加させるために使用され得る。特定の実施形態では、本発明は、治療上有効量のＧＤＦトラップポリペプチドを個体に投与することによって、処置または予防を必要とする個体における貧血を処置または予防する方法を提供する。これらの方法は、哺乳動物、特に、ヒトの治療的および予防的

な処置に使用され得る。

【０１１９】

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

【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

ＧＤＦトラップポリペプチドは、一般的に赤血球（ＲＢＣ）形態の変化をほとんど伴なわない、低増殖性骨髄の貧血の処置に適当である。低増殖性貧血には、以下のものが含まれる：１）慢性疾患の貧血、２）腎臓疾患の貧血、および３）代謝低下状態に関連する貧血。これらの型の各々では、内因性のエリスロポイエチンレベルは、観察される貧血の程度に対して不適切に低い。他の低増殖性貧血には、以下のものが含まれる：４）早期の鉄欠乏貧血、および５）骨髄損傷に起因する貧血。これらの型では、内因性のエリスロポイ

エチンレベルは、観察される貧血の程度に対して適切に上昇している。

【０１２３】

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

【０１２４】

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

【０１２５】

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

【０１２６】

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

【０１２７】
鉄欠乏性貧血は、中間段階として負の鉄均衡および鉄欠乏赤血球生成を含む、鉄欠乏増加の段階的進行の最終段階である。妊娠、不十分な食事、腸の吸収不良、急性または慢性の炎症および急性または慢性の血液喪失などの状態で例示されるように、鉄欠乏は、鉄要求の増加、鉄摂取の減少または鉄損失の増加から起こることがある。この型の軽度から中等度の貧血では、骨髄は低増殖性のままであり、ＲＢＣ形態はほとんど正常である。しかし、軽度の貧血でさえ、多少の小球性淡色性ＲＢＣを生じることがあり、重度の鉄欠乏貧血への移行には、骨髄の過剰増殖およびますます増加する小球性および淡色性のＲＢＣが付随する（Ａｄａｍｓｏｎ、２００８年、Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、第１７版；ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、６２８～６３４頁）。鉄欠乏性貧血のための適当な療法は、その原因および重症度によって決まり、経口用鉄処方物、非経口鉄処方物およびＲＢＣ輸血が主要な従来の選択肢である。ＧＤＦトラップポリペプチドは、慢性鉄欠乏性貧血を処置するために単独で、または特に多因子起源の貧血を処置するために従来の治療手法と一緒に、用い得る。

【０１２８】
低増殖性貧血は、炎症、感染またはがん進行の二次的な機能不全の代わりに、骨髄の一次機能不全または不全症から生じ得る。顕著な例は、がん化学療法薬またはがん放射線療法に起因する骨髄抑制である。臨床試験の広範な精査は、軽度の貧血が化学療法の後に１００％の患者で起こり得、より重度の貧血はそのような患者の最高８０％で起こり得ることを見出した（Ｇｒｏｏｐｍａｎら、１９９９年、Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ ９１巻：１６１６～１６３４頁）。骨髄抑制薬には、以下のものが含まれる：１）ナイトロジェンマスタード（例えば、メルファラン）およびニトロソウレア（例えば、ストレプトゾシン）などのアルキル化剤；２）葉酸拮抗薬（例えば、メトトレキセート）、プリン類似体（例えば、チオグアニン）およびピリミジン類似体（例えば、ゲムシタビン）などの代謝拮抗物質；３）アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン）などの細胞傷害抗生物質；４）キナーゼインヒビター（例えば、ゲフィチニブ）；５）タキサン（例えば、パクリタキセル）およびビンカアルカロイド（例えば、ビノレルビン）などの分裂抑制剤；６）モノクローナル抗体（例えば、リツキシマブ）；ならびに７）トポイソメラーゼインヒビター（例えば、トポテカンおよびエトポシド）。化学療法誘発貧血のマウスモデル（下記の実施例を参照）で実証されるように、ＧＤＦトラップポリペプチドは、化学療法剤および／または放射線療法に起因する貧血を処置するために用いることができる。

【０１２９】
ＧＤＦトラップポリペプチドは、小型（小球性）、特大（大赤血球性）、奇形または異常な色（淡色性）のＲＢＣを一部特徴とする、無秩序なＲＢＣ成熟の貧血の処置にも適当である。

【０１３０】
患者は、患者を標的とするヘモグロビンレベル（通常は、約１０ｇ／ｄｌと約１２．５ｇ／ｄｌとの間、代表的には約１１．０ｇ／ｄｌ（Ｊａｃｏｂｓら（２０００年）Ｎｅｐｈｒｏｌ Ｄｉａｌ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ １５巻、１５～１９頁もまた参照のこと））まで回復させることを意図した投薬レジメンで処置され得るが、より低い標的レベルでは、より少ない心臓血管系の副作用が引き起こされ得る。あるいは、ヘマトクリットレベル（細胞によって占有される血液サンプルの容積の割合）が、赤血球の状態の指標として使用され得る。健康な個体についてのヘマトクリットレベルは、成人男性について４１～５１％、そして、成人女性について３５～４５％の範囲である。標的ヘマトクリットレベルは、通常、約３０～３３％である。さらに、ヘモグロビン／ヘマトクリットレベルは、個々人で変動する。したがって、最適には、標的ヘモグロビン／ヘマトクリットレベルは、患者ごとに個別化され得る。

【０１３１】
本明細書中に開示されるＧＤＦトラップポリペプチドの赤血球レベルに対する迅速な作

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

【０１３２】

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

【０１３３】

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

【０１３４】

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

【０１３５】

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

【０１３６】

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

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

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

治療剤、例えば、血圧降下剤または鉄のサプリメントなどが投薬され得る。例えば、ＧＤＦトラップポリペプチドを用いて処置されている患者の血圧が上昇している場合、そのときは、ＧＤＦトラップポリペプチドを用いた投薬は同じレベルで継続され得、および処置レジメンに血圧降下剤が追加されるか、ＧＤＦトラップポリペプチドを用いた投薬は減らされ得（例えば、量および／または頻度について）、および処置レジメンに血液降下剤が追加されるか、または、ＧＤＦトラップポリペプチドを用いた投薬は終了され得、および患者は血圧降下剤を用いて処置され得る。

【０１４０】

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

【０１４１】

（６．薬学的組成物）

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

【０１４２】

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

【０１４３】

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

粒子径の維持によって、そして、界面活性剤の使用によって維持され得る。

【０１４４】

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

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

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

を用いて、軟充填ゼラチンカプセルおよび硬充填ゼラチンカプセル中の充填物として用いられ得る。

【０１４８】

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

【０１４９】

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

【０１５０】

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

【０１５１】

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

【０１５２】

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

【０１５３】

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

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

【０１５４】

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

【０１５５】

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

【０１５６】

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

【実施例】

【０１５７】

（実施例）

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

【０１５８】

（実施例１　ＧＤＦトラップの作製）

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

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

【０１５９】

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

【０１６０】

【化１２】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

【０１６１】

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

【０１６２】

【化１３】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE
PPPTAPT (配列番号　32)

【０１６３】

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

【０１６４】

【化１４】

(i) ミツバチメリチン　(HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号　8)

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

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

【０１６５】

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

【０１６６】

【化１５】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ

【０１６７】

【化１６】

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号　　11)

【０１６８】

このポリペプチドは、以下の核酸配列によってコードされる（配列番号１２）。

【０１６９】

【化１７】

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

【０１７０】

精製を、例えば、以下のうちの３またはそれ以上を任意の順序で含む一連のカラムクロマトグラフィー工程によって達成し得る：プロテインＡクロマトグラフィー、Ｑセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびカチオン交換クロマトグラフィー。精製は、ウイルス濾過およびバッファの交換で完了し得る。精製スキームの例では、細胞培養培地をプロテインＡカラムに通し、１５０ｍＭのトリス／ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）で洗浄し、次いで５０ｍＭのトリス／ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）で洗浄し、０．１Ｍのグリシン、ｐＨ３．０を用いて溶出する。ウイルス排除工程として、低ｐＨの溶出物を室温で３０分間保持する。次いで、溶出物を中和し、Ｑセファロースイオン交換カラムに通し、５０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、５０ｍＭのＮａＣｌで洗浄し、１５０ｍＭ～３００ｍＭのＮａＣｌ濃度を伴う５０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０中に溶出する。次いで、溶出物を５０ｍＭのトリス、ｐＨ８．０、１．１Ｍの硫酸アンモニウム中に移し変え、フェニルセファロースカラムに通し、洗浄し、１５０～３００ｍＭの硫酸アンモニウムを伴う５０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ８．０中に溶出する。溶出物を、使用のために透析および濾過する。

【０１７１】

追加のＧＤＦトラップ（ミオスタチンまたはＧＤＦ１１と比較してアクチビンＡの結合

の割合が減少するように修飾されたＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃ融合タンパク質）は、本明細書中に参考として援用される、ＰＣＴ／ＵＳ２００８／００１５０６およびＷＯ２００６／０１２６２７に記載されている。

【０１７２】

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

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

１日目：Ａ－２０４細胞を４８ウェルプレート中に分ける。

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

３日目：因子を加える（培地＋０．１％ＢＳＡ中に希釈）。インヒビターは、細胞への追加前に因子と一緒に１時間プレインキュベートする必要がある。６時間後、細胞をＰＢＳでリンスし、そして細胞を溶解する。

【０１７３】

この後にルシフェラーゼアッセイを行う。いかなるインヒビターも存在しない状況で、アクチビンＡは、１０倍のレポーター遺伝子発現の刺激、およびＥＤ５０～２ｎｇ／ｍｌを示した。ＧＤＦ－１１：１６倍の刺激、ＥＤ５０：約１．５ｎｇ／ｍｌ。

【０１７４】

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

【０１７５】

（実施例３　Ｎ末端およびＣ末端の切断によるＧＤＦ－１１の阻害）

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

【０１７６】

【表１】

Ｃ末端におけるＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃの切断：

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

【０１７７】

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

【０１７８】

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

【０１７９】

【表２】

Ｎ末端におけるＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃの切断：

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

【０１８０】

したがって、Ｎ末端からの２、３または４アミノ酸の切断は、完全長細胞外ドメインを持つバージョンよりも活性なタンパク質の生成につながる。追加の実験は、５アミノ酸が切断されたＡｃｔＲＩＩＢ（２５～１３１）－ｈＦｃが、切断されていない形態と等価な活性を有し、Ｎ末端における追加の欠失は引き続きタンパク質の活性を低下させることを示す。したがって、最適な構築物は、配列番号１のアミノ酸１３３～１３４の間で終わるＣ末端および配列番号１のアミノ酸２２～２４から始まるＮ末端を有する。アミノ酸２１または２５に対応するＮ末端は、ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１３４）－ｈＦｃ構築物と同様の活性をもたらす。これらの切断は、Ｌ７９ＤまたはＬ７９Ｅ改変体などのＧＤＦトラップにおいても使用され得る。

【０１８１】

（実施例４　ＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃ改変体、細胞ベースの活性）

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

【０１８２】

【表３】

可溶性ＡｃｔＲＩＩＢ－ＦｃのＧＤＦ１１およびアクチビンＡへの結合：

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

＋弱い活性（およそ１×１０$^{-6}$$K_I$）

＋＋中程度の活性（およそ１×１０$^{-7}$$K_I$）

＋＋＋良好な（野生型）活性（およそ１×１０$^{-8}$$K_I$）

＋＋＋＋野生型より強い活性

【０１８３】

いくつかの改変体を、ラットにおける血清半減期について評価した。ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１３４）－Ｆｃはおよそ７０時間の血清半減期を有する。ＡｃｔＲＩＩＢ（Ａ２４Ｎ　２０～１３４）－Ｆｃはおよそ１００～１５０時間の血清半減期を有する。Ａ２４Ｎ改変体は細胞ベースのアッセイ（上記）およびインビボアッセイ（下記）において、野生型分子と等価な活性を有する。長い半減期と相まって、これは、経時的に、Ａ２４Ｎ改変体が、タンパク質単位当たり、野生型分子よりも、大きな作用をもたらすことを意味する。Ａ２４Ｎ改変体、および、任意の、上記の試験された他の改変体を、Ｌ７９ＤまたはＬ７９Ｅ改変体などのＧＤＦトラップ分子と組み合わせることができる。

【０１８４】

（実施例５　ＧＤＦ－１１およびアクチビンＡの結合）

特定のＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃタンパク質およびＧＤＦトラップのリガンドへの結合をＢｉａＣｏｒｅ^{TM}アッセイにおいて試験した。

【０１８５】

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

【０１８６】

【表４】

ＩＩＢ改変体のリガンドの結合特異性

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

【０１８７】

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

。

【０１８８】

ＷＯ２００６／０１２６２７（その全体が参考として本明細書中に援用される、例えば５９～６０頁を参照されたい）に報告されているように、他の改変体を作製し、デバイスと結合させたリガンドを使用し、受容体を結合させたリガンドの上に流して試験した。注目すべきことに、Ｋ７４Ｙ、Ｋ７４Ｆ、Ｋ７４Ｉ（およびおそらく他のＫ７４における疎水性の置換、例えばＫ７４Ｌなど）、およびＤ８０Ｉは、野生型Ｋ７４分子と比較して、ＧＤＦ１１結合に対するアクチビンＡ結合の割合の減少を引き起こす。これらの改変体についてのデータの表を以下に再現する。

【０１８９】

【表５】

可溶性ＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃ改変体のＧＤＦ１１およびアクチビンＡへの結合（ＢｉａＣｏｒｅアッセイ）

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

*結合が観察されなかった

－－　＜１／５　ＷＴ結合

－　約１／２　ＷＴ結合

＋　ＷＴ

＋＋　＜２倍結合が増加した

＋＋＋　約５倍結合が増加した

＋＋＋＋　約１０倍結合が増加した

＋＋＋＋＋　約４０倍結合が増加した

【０１９０】

（実施例６　非ヒト霊長類においてＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃは赤血球生成を刺激する）

雄性および雌性のカニクイザルに、ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１３４）－ｈＦｃ（ＩｇＧ１）を、１カ月間、週一回、皮下注射により投与した。４８匹のカニクイザル（２４匹／性別）を、４つの処置群（６匹の動物／性別／群）のうちの１つに割り当て、そして、４週間にわたり、週一回（合計５用量）、ビヒクルまたは３ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇもしくは３０ｍｇ／ｋｇのＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃのいずれかの皮下注射を施した。評価したパラメータには、一般的な臨床病理学（血液学、臨床化学、凝固および尿検査）を含めた。ＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃは、処置した動物において、１５日目までに、平均の絶対的網状赤血球値の統計的に有意な上昇を引き起こした。３６日目までに、ＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃは、平均絶対的網状赤血球および赤血球分布幅の値の上昇、ならびに、平均血球ヘモグロビン濃度の低下を含む、いくつかの血液学的変化を引き起こした。全ての処置群および両方の性別が影響を受けた。これらの作用は、骨髄からの未成熟な網状赤血球の放出に対するＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃの正の作用と一致している。この作用は、処置した動物から薬物を洗い出した後に逆転した（研究の５６日目までに）。したがって、本発明者らは、ＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃが赤血球生成を刺激すると結論付ける。

【０１９１】

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

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

【０１９２】

（動物）

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

【０１９３】

（行った試験）

（ＣＢＣ／Ｄｉｆｆ計算）

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

【０１９４】

（クローン原性アッセイ）

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

【０１９５】

（成熟赤血球前駆細胞）
成熟赤血球系列のクローン原性前駆細胞（ＣＦＵ－Ｅ）を、組換えヒト（ｒｈ）エリスロポイエチン（３Ｕ／ｍＬ）を含有するメチルセルロースベース培地ＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３３３４中で培養した。

【０１９６】
（リンパ球前駆細胞）
リンパ球系列のクローン原性前駆細胞（ＣＦＵ－ｐｒｅ－Ｂ）を、ｒｈインターロイキン７（１０ｎｇ／ｍＬ）を含有するメチルセルロースベース培地ＭｅｔｈｏＣｕｌｔ（登録商標）３６３０中で培養した。

【０１９７】
（骨髄系前駆細胞および未成熟赤血球前駆細胞）
顆粒球－単球系列のクローン原性前駆細胞（ＣＦＵ－ＧＭ）、赤血球系列のクローン原性前駆細胞（ＢＦＵ－Ｅ）および多分化能系列のクローン原性前駆細胞（ＣＦＵ－ＧＥＭＭ）を、組換えマウス（ｒｍ）幹細胞因子（５０ｎｇ／ｍＬ）、ｒｈインターロイキン６（１０ｎｇ／ｍＬ）、ｒｍインターロイキン３（１０ｎｇ／ｍＬ）およびｒｈエリスロポイエチン（３Ｕ／ｍＬ）を含有するメチルセルロースベース培地ＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３４３４中で培養した。

【０１９８】
（方法）
マウスの大腿および脾臓を、標準のプロトコルによって処理した。簡単に述べると、２１ゲージの針および１ｃｃの注射器を使用して２％のウシ胎仔血清を含有するイスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｅｄｉａ）（ＩＭＤＭ２％ＦＢＳ）で大腿腔を洗い流すことによって骨髄を得た。７０μＭのフィルターを通して脾臓をつぶし、そのフィルターをＩＭＤＭ２％ＦＢＳですすぐことによって脾臓細胞を得た。次いで、Ｎｅｕｂａｕｅｒ計算チャンバーを使用して単一の細胞懸濁物について３％氷酢酸中での有核細胞の計算を行って、器官当たりの全細胞を算出することができるようにした。次いで、混入した赤血球を除去するために、全脾臓細胞を３倍量の塩化アンモニウム溶解緩衝液で希釈し、氷上で１０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、ＩＭＤＭ２％ＦＢＳに再懸濁させ、第２の細胞計算を行って溶解後の細胞の細胞濃度を決定した。

【０１９９】
細胞ストックを作製し、各メチルセルロースベース培地の処方物に加えて、各培地処方物中の各組織について最適なプレーティング（ｐｌａｔｉｎｇ）濃度を得た。骨髄細胞を、成熟赤血球前駆細胞を査定するためにＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３３３４中、皿当たり細胞1×10^{5}個をプレーティングし、リンパ球前駆細胞を査定するためにＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３６３０中、皿当たり細胞2×10^{5}個をプレーティングし、未成熟赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞を査定するためにＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３４３４中、皿当たり細胞3×10^{4}個をプレーティングした。脾臓細胞を、成熟赤血球前駆細胞を査定するためにＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３３３４中、皿当たり細胞4×10^{5}個をプレーティングし、リンパ球前駆細胞を査定するためにＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３６３０中、皿当たり細胞4×10^{5}個をプレーティングし、未成熟赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞を査定するためにＭｅｔｈｏＣｕｌｔＴＭ３４３４中、皿当たり細胞2×10^{5}個をプレーティングした。３連の皿にプレーティングした培養物を、３７℃、５％ＣＯ２で、訓練された職員によってコロニーの列挙および評価が行われるまでインキュベートした。成熟赤血球前駆細胞を２日間培養し、リンパ球前駆細胞を７日間培養し、成熟赤血球前駆細胞および骨髄系前駆細胞を１２日間培養した。

【０２００】
（分析）
クローン原性アッセイの３連の培養物ならびに全データセットについての対照群および処置群について平均＋／－１標準偏差を計算した。

【０２０１】
各組織におけるコロニー形成細胞（ＣＦＣ）の頻度を下記：
皿当たりのプレーティングされた細胞
皿当たりのスコア化した平均ＣＦＣ
の通り計算した。
【０２０２】
大腿または脾臓当たりの全ＣＦＣを下記：
スコア化された全ＣＦＣ×大腿または脾臓当たりの有核細胞数（ＲＢＣ溶解の後）
培養された有核細胞の数
の通り計算した。
【０２０３】
標準のｔ検定を行って、ＰＢＳ対照マウスと化合物で処置したマウスとの間で、細胞または造血前駆細胞の平均数に差異があるかどうかを査定した。コロニーの列挙の潜在的な主観性のために、０．０１未満のｐ値を有意であるとみなす。各群についての平均値（＋／－ＳＤ）を下記の表に示す。
【０２０４】
【表６】

表:血液学的パラメータ

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

【０２０５】
【表７】

表：大腿骨および脾臓からのＣＦＣ

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

*予備分析はＰ＜０．０５を示す。

【０２０６】
ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１３４）－ｍＦｃを用いたマウスの処置は、この研究の短期間の枠では、赤血球またはヘモグロビンの含有量の有意な増加をもたらさなかった。しかし、前駆細胞含有量に対する作用は顕著であった。大腿では、対照と処置群間で、有核細胞数または前駆細胞含量に差異はなかった。脾臓では、化合物で処置した群は、赤血球溶解前の有核細胞数および皿当たりの成熟赤血球前駆細胞（ＣＦＵ－Ｅ）コロニー数、脾臓当たりの頻度および全前駆細胞数に統計学的に有意な増加を経験した。さらに、骨髄系（ＣＦＵ－ＧＭ）、未成熟赤血球（ＢＦＵ－Ｅ）の数、および脾臓当たりの全前駆細胞数にも増加を認めた。したがって、より長期間の過程にわたって、ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１３４）－ｍＦｃ処置は、赤血球およびヘモグロビンの含有量の上昇をもたらし得ることを予

想する。

【０２０７】

（実施例８　ＧＤＦトラップは、インビボで赤血球レベルを増加させる）

１２週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃマウスを、２つの処置群のうちの１つに割り当てた（Ｎ＝１０）。マウスに、ビククルまたは改変体ＡｃｔＲＩＩＢポリペプチド（「ＧＤＦトラップ」）［ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃ］のいずれかを、４週間、週２回、１０ｍｇ／ｋｇを皮下注射（ＳＣ）により投薬した。研究の終了時に、全血を心臓穿刺によりＥＤＴＡ含有管に採取し、ＨＭ２血液分析器（Ａｂａｘｉｓ，Ｉｎｃ）を使用して細胞分布について分析した。

【０２０８】

【表８】

群の指定

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

【０２０９】

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

【０２１０】

【表９】

血液学的な結果

	RBC 10^{12}/L	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10.7 ± 0.1	14.8 ± 0.6	44.8 ± 0.4	17.0 ± 0.1
GDFトラップ	12.4 ± 0.4**	17.0 ± 0.7*	48.8 ± 1.8*	18.4 ± 0.2**

*=p<0.05、**= p<0.01

【０２１１】

（実施例９　ＧＤＦトラップは、インビボにおける赤血球レベル増加についてＡｃｔＲＩＩＢ－Ｆｃよりも優れている）

１９週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃマウスを、３つの群のうちの１つに無作為に割り当てた。マウスに、ビヒクル（１０ｍＭのトリス緩衝生理食塩水、ＴＢＳ）、野生型ＡｃｔＲＩＩＢ（２０～１３４）－ｍＦｃ、またはＧＤＦトラップＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃを、３週間、週に２回、皮下注射により投薬した。ベースライン、および投薬の３週間後に、血液を頬出血で採取し、血液分析器（ＨＭ２、Ａｂａｘ

ｉｓ，Ｉｎｃ．）を使用して細胞分布について分析した。

【０２１２】

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

【０２１３】

【表１０】

投薬の３週間後の血液学的な結果

	RBC (10^{12}/ml)	HCT %	HGB g/dL
TBS	11.06 ± 0.46	46.78 ± 1.9	15.7 ± 0.7
ActRIIB-mFc	11.64 ± 0.09	49.03 ± 0.3	16.5 ± 1.5
GDFトラップ	13.19 ± 0.2**	53.04 ±0.8**	18.4 ± 0.3**

**=p<0.01

【０２１４】

（実施例１０　切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを用いたＧＤＦトラップの作製）

実施例１に記載されるように、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃと呼ばれるＧＤＦトラップを、ＴＰＡリーダーの、ロイシンからアスパラギン酸への置換（配列番号１の残基７９において）を含有するＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメイン（配列番号１の残基２０～１３４）へのＮ末端融合、および最小限のリンカー（３つのグリシン残基）を用いたヒトＦｃドメインのＣ末端融合により作製した（図３）。この融合タンパク質に対応するヌクレオチド配列を図４に示す。

【０２１５】

ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃと呼ばれる、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップを、ＴＰＡリーダーの、ロイシンからアスパラギン酸への置換（配列番号１の残基７９において）を含有する切断された細胞外ドメイン（配列番号１の残基２５～１３１）へのＮ末端融合、および最小限のリンカー（３つのグリシン残基）を用いたヒトＦｃドメインのＣ末端融合により作製した（図５）。この融合タンパク質に対応するヌクレオチド配列を図６に示す。

【０２１６】

（実施例１１　二重に切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップによる選択的なリガンド結合）

ＧＤＦトラップおよび他のＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃタンパク質の、いくつかのリガンドに対する親和性を、Ｂｉａｃｏｒｅ^{TM}機器を用いてインビトロで評価した。結果を以下の表に要約する。k_{on}およびk_{off}の正確な決定を妨害した、複合体の非常に急速な会合と解離のため定常状態親和性フィットによりＫｄ値を得た。

【０２１７】

【表１１】

ＡｃｔＲＩＩＢ－ｈＦｃ改変体のリガンド選択性：

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

【０２１８】

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

【０２１９】

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

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

【０２２０】

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

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

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

【０２２１】

ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃで処置したマウスからの脾臓由来培養物は、ＣＦＵ－Ｅコロニーの数が対照マウスからの対応する培養物の２倍であったが（Ｐ＜０．０５）、一方、ＢＦＵ－Ｅコロニーの数はインビボの処置で有意に差異がなかった。骨髄培養物からのＣＦＵ－ＥまたはＢＦＵ－Ｅのコロニーの数も処置によって有意に異ならなかった。予想通りに、脾臓由来培養物におけるＣＦＵ－Ｅコロニーの数の増加は、安楽死時に、対照と比較してＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃで処置したマウスにおける赤血球レベル（１１．６％増加）、ヘモグロビン濃度（１２％増加）、およびヘマトクリットレベル（１１．６％増加）の非常に有意な（Ｐ＜０．００１）変化を伴った。これらの結果は、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップのインビボ投与が、赤血球レベルの増加に対するその全体的な作用の一部として、赤血球前駆体の増殖を刺激し得ることを示している。

【０２２２】

（実施例１４　切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップは、マウスにおける化学療法誘発性貧血を相殺する）

出願人は、微小管重合を遮断することによって細胞分裂を阻害するパクリタキセルに基づく化学療法誘発性貧血のマウスモデルにおいて、赤血球生成のパラメータに対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を調査した。雄性のＣ５７ＢＬ／６マウス（８週齢）を４つの処置のうちの１つに割り当てた：

１）パクリタキセル（２５ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）

２）ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（１０ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）

３）パクリタキセル＋ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ

４）ビヒクル（ＴＢＳ）。

【０２２３】

パクリタキセルは０日目に投与したが、一方、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃまたはビヒクルは０日目および３日目に投与した。ＣＢＣ分析のために、１日目、３日目、および５日目に別々のコホートから血液試料を採取し、処置群１～３（上記）についての結果を、所与の時点におけるビヒクルからの差異の割合として表した。パクリタキセルのみのコホートで、３日目におけるパクリタキセルの毒性による消耗が問題であった（ｎ＝１）；その他の場合は、時点当たり、処置当たりｎ＝３～５。ビヒクルと比較して、パクリタキセル単独では、５日目においてヘモグロビン濃度がほぼ１３％減少したが、一方、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの添加は、このパクリタキセルに誘発された減少を妨げた（図１１）。ヘマトクリットおよびＲＢＣレベルについても同様の作用を観察した。パクリタキセルの非存在下では、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃは、３日目および５日目において、ヘモグロビン濃度をビヒクルと比較して１０％増加させた（図１１）。したがって、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップは、化学療法誘発性貧血を相殺するために十分に赤血球レベルを増加させ得る。

【０２２４】

（実施例１５　切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップは、マウスにおける腎摘出誘発性貧血を逆転させる）

出願人は、腎摘出された慢性腎疾患マウスモデルにおける貧血に対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を調査した。雄性のＣ５７ＢＬ／６マウス（１１週齢）について、偽手術またはエリスロポエチン生成能を低下させるための片側腎摘出のいずれかを行った。手術後回復のためにマウスに１週間与え、次いでＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（１０ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．；条件当たりｎ＝１５）またはビヒクル（ＴＢＳ；条件当たりｎ＝１５）で週２回、全部で４週間処置した。投薬開始前および処置の４週間後に血液試料を採取した。ビヒクルで処置した腎摘出された

マウスは、４週間の処置期間にわたって赤血球数の有意な減少を示したが、一方、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃを用いた処置では、腎臓のエリスロポエチン生成能が低下したにもかかわらず、赤血球細胞レベルの減少を妨げただけでなく、ベースライン上に１７％増加させた（Ｐ＜０．００１）（図１２）。腎摘出されたマウスにおいて、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃは、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリットレベルにおいてもベースラインからの有意な増加を生じ、そして、注目すべきことに、これらの赤血球生成のパラメータそれぞれを、腎摘出された条件下で、偽手術の条件下とほぼ同程度まで刺激した（図１３）。したがって、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップは、慢性腎疾患モデルにおいて貧血を逆転させるために十分に赤血球レベルを増加させ得る。

【０２２５】

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

出願人は、急性失血によって誘発される貧血（急性出血後貧血）のラットモデルにおいて赤血球生成のパラメータに対するＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃの作用を調査した。雄性のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（およそ３００ｇ）に、供給メーカー（Ｈａｒｌａｎ）において長期にわたる頸静脈カテーテルを受けさせた。－１日目に、各ラットから、イソフルラン麻酔下でカテーテルを介して５分間にわたって全血液量の２０％を抜き取った。除去した血液量は、Ｌｅｅおよび共同研究者（Ｊ　Ｎｕｃｌ　Ｍｅｄ　２５巻：７２～７６頁、１９８５年）によって、１２０ｇを超える体重のラットに対して導かれた以下の関係：

全血液量（ｍｌ）＝０．０６２×体重（ｇ）＋０．００１２

に従って計算された全血液量についての値に基づいた。

【０２２６】

血液除去の時点で、カテーテルを介して等量のリン酸緩衝生理食塩水で置換した。０日目および３日目に、ラットをＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃ（１０ｍｇ／ｋｇ、ｓ．ｃ．；ｎ＝５）またはビヒクル（ＴＢＳ；ｎ＝５）で処置した。－１日目（ベースライン）、０日目、２日目、４日目、および６日目に、ＣＢＣ分析のための血液試料を、カテーテルを介して取り出した。

【０２２７】

対照のラットは、０日目までに、赤血球レベルのほぼ１５％の落下を伴い、２０％の失血に対して応答した。これらのレベルは、２日目および４日目においてベースラインよりも有意に低いままであり、６日目までに十分に回復しなかった（図１４）。ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃで処置したラットは、２０％の失血後にほぼ同一の赤血球レベルの低下を示したが、これらのラットは、その後２日目までにそのようなレベルにおける完全な回復、続いて４日目および６日目にさらなる上昇を示し、これは、対応する時点における、対照レベルを超える非常に有意な改善を示している（図１４）。ヘモグロビン濃度についても同様の結果を得た。これらの知見は、切断されたＡｃｔＲＩＩＢ細胞外ドメインを持つＧＤＦトラップが、急性出血によって引き起こされる貧血からの赤血球レベルの急速な回復をもたらし得ることを実証している。

【０２２８】

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

２つのＧＤＦトラップ、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃおよびＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃを、カニクイザルにおける赤血球生成を刺激するそれらの能力について評価した。サルを、１日目および８日目にＧＤＦトラップ（１０ｍｇ／ｋｇ；ｎ＝雄性４／雌性４）、またはビヒクル（ｎ＝雄性２／雌性２）で皮下に処置した。１日目（前処置ベースライン）、３日目、８日目、１５日目、２９日目、および４４日目に血液試料を採取し、赤血球レベル（図１５）、ヘマトクリット（図１６）、ヘモグロビンレベル（図１７）、および網状赤血球レベル（図１８）について分析

した。ビククルで処置したサルは、処置後の全ての時点で、繰り返しの血液試料採取の予想された影響である、赤血球、ヘマトクリット、およびヘモグロビンのレベルの低下を示した。対照的に、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃまたは ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃを用いた処置では、最初の処置後の時点（３日目）までにこれらのパラメータが増加し、この研究の継続期間中、実質的に上昇したレベルを持続した（図１５～１７）。重要なことに、ＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２０～１３４）－ｈＦｃまたはＡｃｔＲＩＩＢ（Ｌ７９Ｄ　２５～１３１）－ｈＦｃで処置したサルにおける網状赤血球レベルは、８日目、１５日目、および２９日目において、ビヒクルと比較して実質的に増加した（図１８）。この結果は、ＧＤＦトラップの処置が、赤血球前駆体の生成を増加させ、赤血球レベルの上昇をもたらすことを実証している。

【０２２９】

総合すると、これらのデータは、切断されたＧＤＦトラップ、ならびに完全長改変体を、ＧＤＦ１１の選択的アンタゴニストとして、およびインビボにおける赤血球形成を増加させるための潜在的な関連リガンドとして使用し得ることを実証している。

【０２３０】

（実施例１８　ＡｃｔＲＩＩＢ５から誘導されたＧＤＦトラップ）

ＡｃｔＩＩＢ膜貫通ドメインを含むエクソン４が異なるＣ末端配列で置き換わった、代替の、可溶性の形態のＡｃｔＲＩＩＢ（ＡｃｔＲＩＩＢ５と呼ばれる）が報告された（ＷＯ２００７／０５３７７５）。

【０２３１】

リーダーを持たないネイティブなヒトＡｃｔＲＩＩＢ５の配列は以下の通りである。

【０２３２】

【化１８】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE

(配列番号　36)

【０２３３】

ロイシンからアスパラギン酸への置換、または他の酸性の置換を、以下の配列を有する改変体ＡｃｔＲＩＩＢ５（Ｌ７９Ｄ）を構築するために、記載のようにネイティブな７９位（下線を付して強調）において行い得る。

【０２３４】

【化１９】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE

(配列番号　37)

【０２３５】

この改変体を、以下の配列を持つヒトＡｃｔＲＩＩＢ５（Ｌ７９Ｄ）－ｈＦｃ融合タンパク質を作製するために、ＴＧＧＧリンカーを用いてヒトＦｃに連結し得る。

【０２３６】

【化２０】

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL

FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP

PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 38)

【０２３７】

この構築物をＣＨＯ細胞において発現させ得る。

【０２３８】

（参考としての援用）

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

【０２３９】

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

【図１】

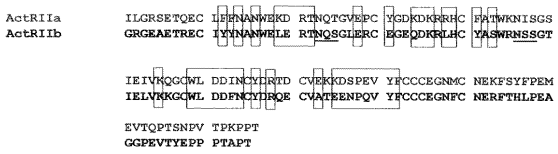


FIGURE 1

【図２】

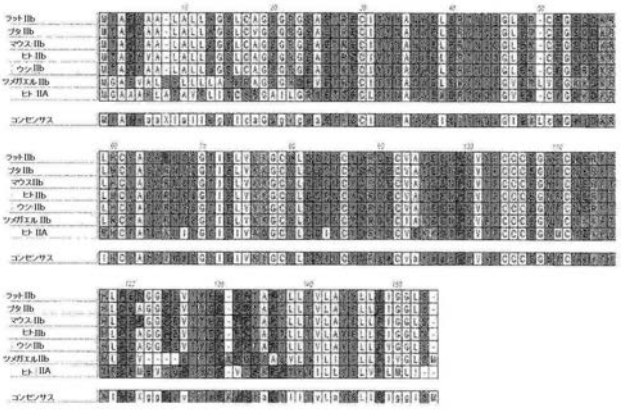


FIGURE 2

【図３】

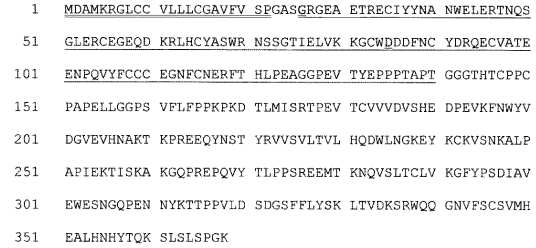


FIGURE 3

【図４－１】

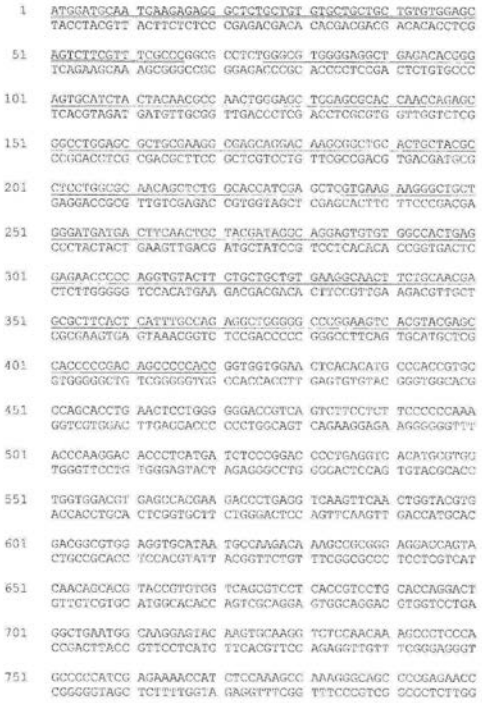


FIGURE 4

【図４－２】



FIGURE 4 続き

【図５】

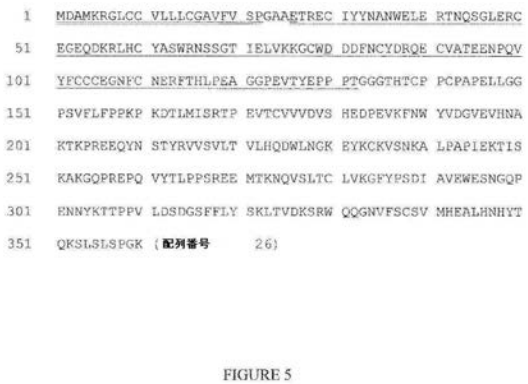


FIGURE 5

【図６－１】

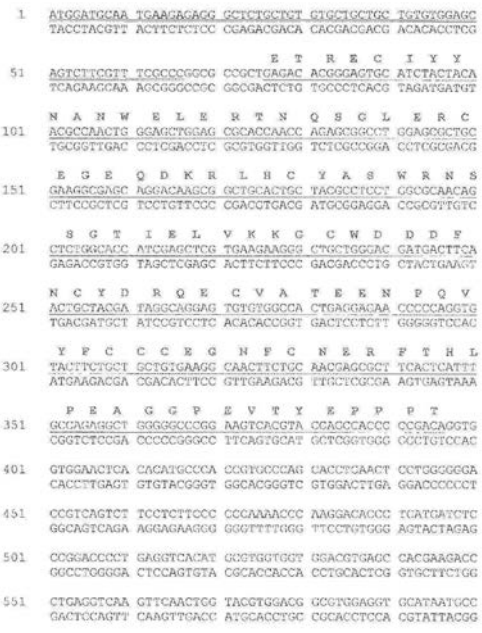


FIGURE 6

【図６－２】



FIGURE 6 続き

【図７】

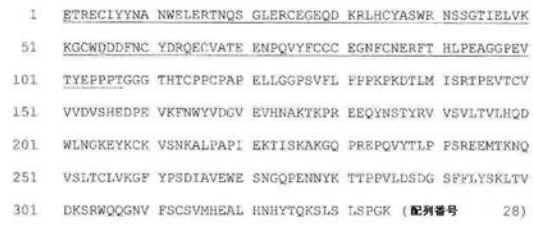


FIGURE 7

【図８】



FIGURE 8

【図９－１】

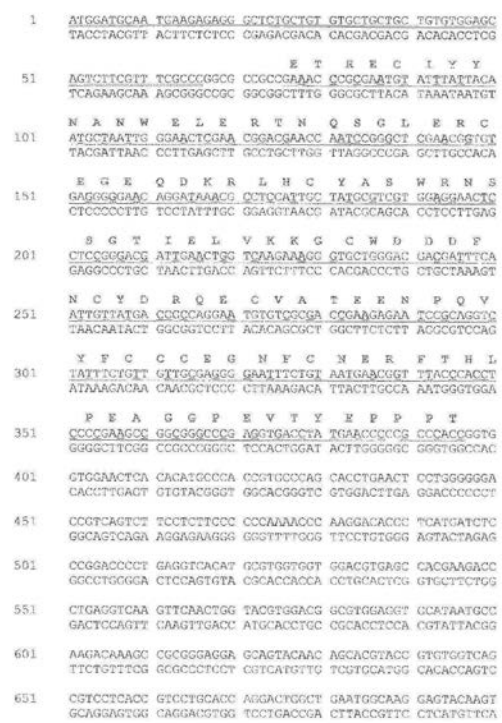


FIGURE 9

【図９－２】



FIGURE 9 続き

【図１０】

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC
AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT
GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG
AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACC (配列番号 31)

FIGURE 10

【図１１】

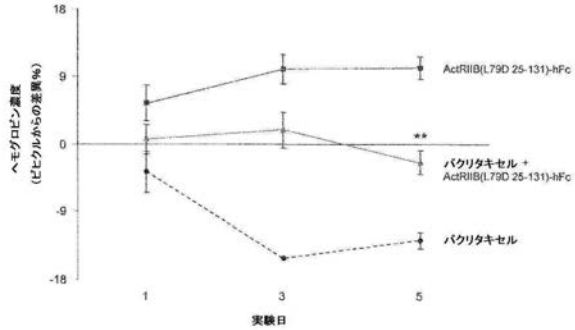


FIGURE 11

【図１２】

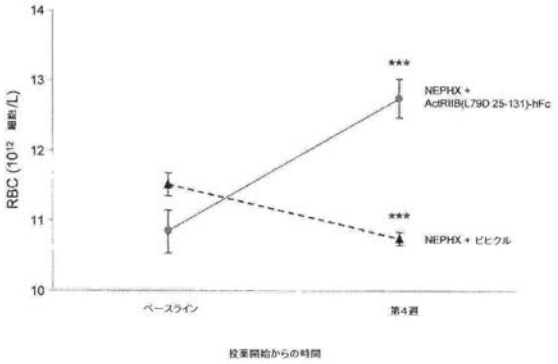


FIGURE 12

【図１３】

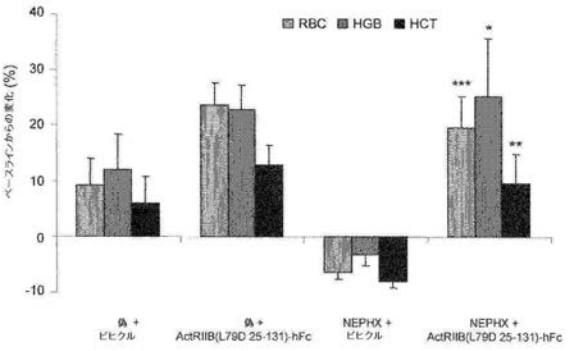


FIGURE 13

【図１４】

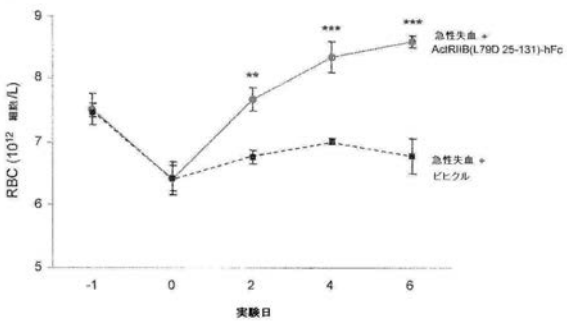


FIGURE 14

【図１５】

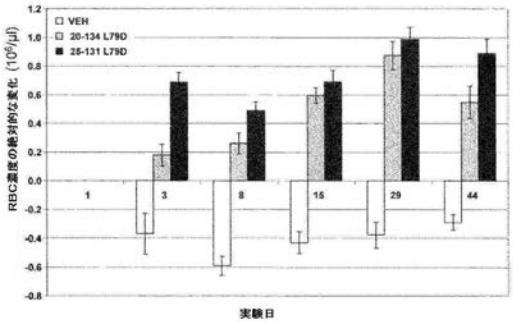


FIGURE 15

【図１６】

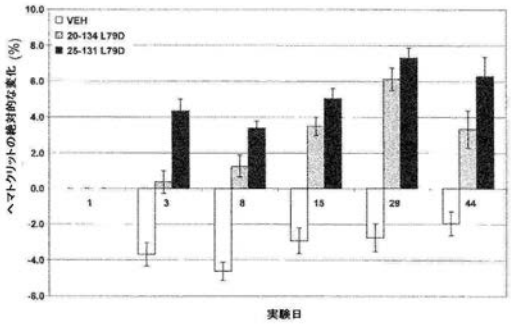


FIGURE 16

【図１７】

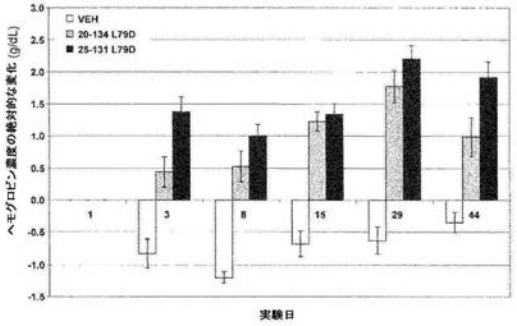


FIGURE 17

【図１８】

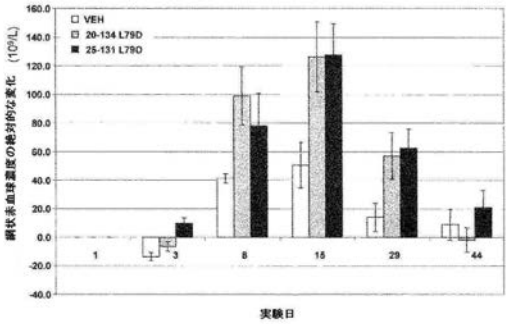


FIGURE 18

【配列表】
2017019860000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*14/705*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(72)発明者　ロバート　スコット　ピアソール
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１８０１，　ウォバーン，　バード　ストリート　２１
(72)発明者　ラビンドラ　クマール
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１７２０，　アクトン，　アーリントン　ストリート　４２１

Ｆターム(参考)　4C076 CC14 CC17 EE59 FF31 FF63
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA22 BA23 BA41 NA14 ZA551 ZA811 ZA941
4H045 AA30 BA09 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017019860000001.pdf