

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7669291号
(P7669291)

(45)発行日 令和7年4月28日(2025.4.28)

(24)登録日 令和7年4月18日(2025.4.18)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04
請求項の数 28 (全103頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-570756(P2021-570756)	(73)特許権者	517194542
(86)(22)出願日	令和2年5月29日(2020.5.29)		アクセロン ファーマ インコーポレーテッド
(65)公表番号	特表2022-534966(P2022-534966 A)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07065, ローウェイ, イースト リンカーン アベニュー 126
(43)公表日	令和4年8月4日(2022.8.4)	(74)代理人	110002572
(86)国際出願番号	PCT/US2020/035148		弁理士法人平木国際特許事務所
(87)国際公開番号	WO2020/243448	(72)発明者	クマール, ラビンドラ
(87)国際公開日	令和2年12月3日(2020.12.3)		アメリカ合衆国 01720 マサチューセッツ州, アクトン, アーリントン ストリート 421
審査請求日	令和5年5月29日(2023.5.29)	(72)発明者	ベルク, ジョナサン
(31)優先権主張番号	62/854,625		アメリカ合衆国 03766 ニューハンブシャー州, レバノン, ルーセント ド
(32)優先日	令和1年5月30日(2019.5.30)		最終頁に続く
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 A C T R I I 結合性タンパク質及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

アクチビン受容体II型(A c t R I I)結合性タンパク質であって、A c t R I I結合性タンパク質が、A c t R I Iに特異的に結合し、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2及びV L - C D R 3のC D Rのセットを含む抗体であり、

(i) V H - C D R 1が配列番号3のアミノ酸配列を有し、

(i i) V H - C D R 2が配列番号4のアミノ酸配列を有し、

(i i i) V H - C D R 3が配列番号5のアミノ酸配列を有し、

(i v) V L - C D R 1が配列番号13のアミノ酸配列を有し、

(v) V L - C D R 2が配列番号14のアミノ酸配列を有し、

(v i) V L - C D R 3が配列番号15のアミノ酸配列を有し、

かつ、前記タンパク質がA c t R I I B及びA c t R I I Aと結合する、A c t R I I結合性タンパク質。

【請求項2】

(i) 配列番号2に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV Hと、

(i i) 配列番号12に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L

を有するV HとV Lの対を含み、前記タンパク質がA c t R I I B及びA c t R I I Aと

結合する、請求項 1 に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 3】

前記 V H と V L の対が、配列番号 2 の V H 配列と配列番号 1 2 の V L 配列を有し、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合する、請求項 2 に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 4】

(i) 配列番号 2 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 1、1 2、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 1 2 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する V L 配列

10

を有する V H と V L の対を含み、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合する、請求項 1 に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質と、A c t R I I への結合に対して競合する、A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 6】

前記 A c t R I I 結合性タンパク質が、A c t R I I 活性に拮抗する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

20

【請求項 7】

前記結合性タンパク質が、

(a) A c t R I I B 及び/または A c t R I I A への結合に対してアクチビン A、アクチビン B、B M P 7、B M P 9、B M P 1 0、G D F 8 (ミオスタチン)、G D F 1 1、または N o d a l と競合する、

(b) A c t R I I B または A c t R I I A のリガンド (例えば、アクチビン A) の存在下で A c t R I I B 及び/または A c t R I I A を発現している細胞での 1 つ以上の S m a d のリン酸化を減少させる、

(c) A c t R I I B 及び/または A c t R I I A のリガンドの存在下で、A c t R I I B 及び/または A c t R I I A と、A L K 4 及び/または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び/または A L K 7 のリン酸化を減少させる、ならびに

30

(d) A c t R I I B 及び/または A c t R I I A に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上 (例えば、B I A C O R E (登録商標) 分析により決定した場合) の K_D で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または A c t R I I 結合性抗体断片である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 9】

40

前記 A c t R I I 結合性抗体断片が、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ' 2)断片、F v 断片、またはダイアボディからなる群から選択される、請求項 8 に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 10】

前記抗体がさらに、

(a) ヒト I g A 定常ドメイン、

(b) ヒト I g D 定常ドメイン、

(c) ヒト I g E 定常ドメイン、

(d) ヒト I g G 1 定常ドメイン、

(e) ヒト I g G 2 定常ドメイン、

50

- (f) ヒト I g G 3 定常ドメイン、
- (g) ヒト I g G 4 定常ドメイン、及び
- (h) ヒト I g M 定常ドメイン

からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 1 1】

前記抗体がさらに、

- (a) ヒト I g カッパ定常ドメイン、及び
- (b) ヒト I g ラムダ定常ドメイン

からなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 1 2】

前記抗体がさらに、ヒト I g G 1 重鎖定常ドメイン及びヒトラムダ軽鎖定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質をコードする、単離された核酸分子または核酸分子のセット。

【請求項 1 4】

c D N A である、請求項 1 3 に記載の単離された核酸分子または核酸分子のセット。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 または 1 4 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 3 もしくは 1 4 に記載の核酸分子、または請求項 1 5 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 1 7】

前記宿主細胞が哺乳類宿主細胞である、請求項 1 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 8】

前記宿主細胞が、N S 0 マウス骨髓腫細胞、P E R . C 6 (登録商標) ヒト細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である、請求項 1 7 に記載の哺乳類宿主細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質を作製する方法であって、請求項 1 6、1 7、または 1 8 に記載の宿主細胞を、前記 A c t R I I 結合性タンパク質を産生するための好適な条件下で培養することを含む、前記方法。

【請求項 2 0】

前記宿主細胞から分泌される A c t R I I 結合性タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 2】

標識基またはエフェクター基をさらに含む、請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記エフェクター基が、放射性同位体、放射性核種、毒素、治療剤及び化学療法剤から選択される、請求項 2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

医薬品として使用するための、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

A c t R I I 発現もしくは A c t R I I シグナル伝達上昇と関連する疾患もしくは状態を治療及び / または改善するための医薬品として使用するための、請求項 2 1 または 2 4

10

20

30

40

50

に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記疾患または状態が、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、筋肉消耗、線維性状態（肝臓、肺、血管または眼の線維性状態）、心筋線維症、特発性肺線維症、代謝性疾患、ⅠⅠ型糖尿病、肥満、炎症性疾患、自己免疫疾患、眼疾患、加齢黄斑変性、心血管疾患、うっ血性心不全、高血圧、肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、骨粗鬆症、神経筋疾患、変性疾患、創傷治癒、及びがんから選択されるメンバーである、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

前記医薬組成物が、単独で、または併用療法として投与される、請求項 2 5 または 2 6 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 2 8】

対象での A c t R I I 活性を低下させるための医薬品として使用するための、請求項 2 1 または 2 4 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本特許出願は、2 0 1 9 年 5 月 3 0 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 8 5 4 , 6 2 5 号に対する優先権を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2 0 2 0 年 4 月 1 4 日に作成された上記 A S C I I コピーは A P H - 0 0 9 2 5 _ S L . t x t という名前であり、サイズは 5 7 , 0 7 5 バイトである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

トランスフォーミング増殖因子 - ベータ (T G F - ベータ) ファミリーには、脊椎動物及び無脊椎動物の両方における多種多様な細胞型に対して生物学的作用を発揮することが知られている様々な増殖因子が含まれる。T G F - ベータファミリーのメンバーは、胚発生過程で、パターン形成及び組織の運命決定において重要な機能を果たし、脂肪生成、筋形成、軟骨形成、心発生、造血、神経発生、及び上皮細胞分化を含めた様々な分化過程に影響を及ぼし得る。ファミリーには、増殖分化因子 (G D F)、骨形成タンパク質 (B M P)、アクチビン及びインヒビンとして様々に記載されるタンパク質が含まれる。

30

【0 0 0 4】

T G F - ベータファミリーメンバーは、多段階プロセスが含まれる機序を介してシグナルを伝達し、そこでは、T G F - ベータファミリーメンバーは、細胞表面に発現されるⅠⅠ型セリン/トレオニンキナーゼ受容体と結合し、ⅠⅠ型受容体は、同族Ⅰ型受容体とヘテロ複合体を形成して、リン酸化によりⅠ型受容体を活性化させ、活性化されたⅠ型受容体は、細胞質から核へシグナルを伝達する S m a d タンパク質をリン酸化かつ活性化させ、核内の S m a d オリゴマーが D N A に結合し、転写因子と会合して標的遺伝子の発現を制御する。

40

【0 0 0 5】

ⅠⅠ型 T G F - ベータ受容体ファミリーの 2 つの関連するメンバーである A c t R I I B 及び A c t R I I A が、アクチビン A とアクチビン B、ならびに B M P 7、B M P 9、B M P 1 0、G D F 1、G D F 3、G D F 8 (ミオスタチン)、G D F 1 1、及び N o d a l 等の他の T G F - ベータファミリーメンバーに対するⅠⅠ型受容体として同定されている (Y a m a s h i t a e t a l . , J . C e l l B i o l . 1 3 0 : 2 1 7 - 2 2 6 (1 9 9 5)、L e e e t a l . , P N A S 9 8 : 9 3 0 6 - 9 3 1 1 (2 0 0

50

1)、Yeo et al., Mol. Cell 7:949-957(2001)、及び Oh et al., Genes Dev. 16:2749-54(2002))。ALK4及びALK7はそれぞれ、アクチビンA及びアクチビンBに対する主要なI型TGF-ベータ受容体ファミリーメンバー受容体である。

【0006】

TGF-ベータリガンド及び受容体ファミリーのメンバーの発現と活性の変化は、筋、骨、神経及び代謝の障害及び状態、ならびにがんを含めた、様々な障害及び状態と関連すると提案されている。追加のActRIIアンタゴニスト及びその使用は、ActRII及び/またはActRIIのリガンドと関連する疾患もしくは状態の診断と治療、予防及び/または改善に有用であろう。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、アクチビン受容体II型(ActRII)結合性タンパク質及びかかるActRII結合性タンパク質を使用する方法を提供する。特定の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIが1つ以上の同族ActRIIリガンド及び/または1つ以上の同族ActRI受容体に結合することを阻害もしくは阻止する能力がある。いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIがActRIIリガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、GDF1、GDF3、GDF8(ミオスタチン)、GDF11、BMP6、BMP7、BMP9、またはBMP10)に結合することを阻害または阻止する能力がある。本開示はまた、ActRII発現及び/またはActRII媒介性シグナル伝達上昇と関連する疾患もしくは状態の診断、もしくは治療、予防及び/または改善のためのActRII結合性タンパク質を使用する方法も提供する。そのような疾患または状態としては、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害;線維性状態;炎症性、自己免疫、心血管、肺、筋骨格、骨格、眼、神経、もしくは代謝性の疾患または状態;肥満;創傷治癒;及びがんが挙げられるが、これらに限定されない。

【0008】

いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合する。さらなる実施形態では、提供されるActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合し、(a)ActRIIBへの結合に対してActRIIリガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、GDF1、GDF3、GDF8(ミオスタチン)、GDF11、BMP6、BMP7、BMP9、またはBMP10)と競合する、(b)ActRIIBリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはGDF8(ミオスタチン))の存在下で、ActRIIBと、ALK4及び/またはALK7とを発現している細胞でのALK4及び/またはALK7のリン酸化を減少させる、(c)ActRIIBリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはGDF8)の存在下で、ActRIIBを発現している細胞でのSmad(例えば、Smad2及び/またはSmad3)のリン酸化を減少させる、及び(d)ActRIIBに、1nM以下かつ1pM以上のK_D(例えば、BIACORE(登録商標)分析により決定した場合)で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する。いくつかの実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質は、上記の特性のうち2つ、3つ、または4つを有する。いくつかの実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも2つまたは少なくとも3つを有する。さらなる実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質は、ActRIIBへの結合に対して、本明細書に開示されるActRIIB結合性のVHとVLの対を有する抗体と競合する。さらなる実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質は、抗ActRIIB抗体またはActRIIB結合性抗体断片である。

【0009】

いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIB及びActRIIAと特異的に結合する。さらなる実施形態では、提供されるActRII結合性タンパク質は、ActRIIB及びActRIIAと特異的に結合し、(a)ActRI

10

20

30

40

50

I B 及び / または A c t R I I A への結合に対して、A c t R I I リガンド（例えば、アクチビン A、アクチビン B、G D F 1、G D F 3、G D F 8（ミオスタチン）、G D F 1 1、B M P 6、B M P 7、B M P 9、または B M P 1 0）と競合する、（b）A c t R I I B 及び / または A c t R I I A のリガンド（例えば、アクチビン A 及び / または G D F 8（ミオスタチン））の存在下で、A c t R I I B 及び / または A c t R I I A と、A L K 4 及び / または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び / または A L K 7 のリン酸化を減少させる、（c）A c t R I I B 及び / または A c t R I I A のリガンド（例えば、アクチビン A 及び / または G D F 8）の存在下で、A c t R I I B 及び / または A c t R I I A を発現している細胞での S m a d（例えば、S m a d 2 及び / または S m a d 3）のリン酸化を減少させる、及び（d）A c t R I I B に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D （例えば、B I A C O R E（登録商標）分析により決定した場合）で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B 及び A c t R I I A 結合性のタンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B 及び A c t R I I A 結合性のタンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。さらなる実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及び A c t R I I A への結合に対して、本明細書に開示される A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合する V H と V L の対を有する抗体と競合する。さらなる実施形態では、A c t R I I B 及び A c t R I I A 結合性のタンパク質は、抗 A c t R I I B と A c t R I I B の抗体であるかまたは A c t R I I B 抗体断片及び A c t R I I B 結合抗体断片である。

10

20

【0010】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I A と特異的に結合する。さらなる実施形態では、提供される A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I A と特異的に結合し、（a）A c t R I I A への結合に対して A c t R I I リガンド（例えば、アクチビン A、アクチビン B、G D F 1、G D F 3、G D F 8（ミオスタチン）、G D F 1 1、B M P 6、B M P 7、B M P 9、または B M P 1 0）と競合する、（b）A c t R I I A リガンド（例えば、アクチビン A 及び / または G D F 8（ミオスタチン））の存在下で、A c t R I I A と、A L K 4 及び / または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び / または A L K 7 のリン酸化を減少させる、（c）A c t R I I A リガンド（例えば、アクチビン A 及び / または G D F 8）の存在下で、A c t R I I A を発現している細胞での S m a d（例えば、S m a d 2 及び / または S m a d 3）のリン酸化を減少させる、及び（d）A c t R I I A に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D （例えば、B I A C O R E（登録商標）分析により決定した場合）で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。さらなる実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、A c t R I I A への結合に対して、本明細書に開示される A c t R I I A 結合性の V H と V L の対を有する抗体と競合する。さらなる実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、抗 A c t R I I A 抗体または A c t R I I A 結合性抗体断片である。

30

40

【0011】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、相補性決定領域（C D R）のセット、すなわち、重鎖可変領域（V H）- C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、軽鎖可変領域（V L）- C D R 1、V L - C D R 2 及び V L - C D R 3 を含み、及び / または抗原結合領域（A B R）のセット、すなわち、重鎖可変領域（V H）- A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、軽鎖可変領域（V L）- A B R 1、V L - A B R 2 及び V L - A B R 3 を含み、かかる C D R 及び / または A B R は、表 1 に開示されている重鎖可変領域（V H）と軽鎖可変領域（V L）の対に存在する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、（a）配列番号 2 0、4 9、または 7 7 の V H 配列と、配列番号 3 0、3 9、5 9、6 7、または 8 5 の V L 配列であって、タンパク質が

50

A c t R I I Bと結合するもの、及び(b)配列番号2のV H配列と、配列番号12のアミノ酸配列を有するV Lであって、タンパク質がA c t R I I B及びアクチビン受容体I I A型(A c t R I I A)と結合するもの、からなる群から選択されるV HとV Lの対に存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、配列番号20のアミノ酸配列を有するV Hと配列番号30のアミノ酸配列を有するV Lに存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I Bと結合する。

【0013】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、配列番号20のアミノ酸配列を有するV Hと配列番号39のアミノ酸配列を有するV Lに存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I Bと結合する。

10

【0014】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、配列番号49のアミノ酸配列を有するV Hと配列番号59のアミノ酸配列を有するV Lに存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I Bと結合する。

【0015】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、配列番号20のアミノ酸配列を有するV Hと配列番号67のアミノ酸配列を有するV Lに存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I Bと結合する。

20

【0016】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、配列番号77のアミノ酸配列を有するV Hと配列番号85のアミノ酸配列を有するV Lに存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I Bと結合する。

【0017】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を有するV Hと配列番号12のアミノ酸配列を有するV Lに存在するC D R及び/またはA B Rのセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I A及びA c t R I I Bと結合する。

【0018】

追加の実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、A c t R I Iと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(a)(i)V H - C D R 1が配列番号21、50、または78のアミノ酸配列を有し、(ii)V H - C D R 2が配列番号22、51、または79のアミノ酸配列を有し、(iii)V H - C D R 3が配列番号23、52、または80のアミノ酸配列を有し、(iv)V L - C D R 1が配列番号31、40、60、68、または86のアミノ酸配列を有し、(v)V L - C D R 2が配列番号32、41、61、69、または87のアミノ酸配列を有し、かつ(vi)V L - C D R 3が配列番号33、42、62、70、または88のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質はA c t R I I Bと結合するか、または(b)(i)V H - C D R 1が配列番号3のアミノ酸配列を有し、(ii)V H - C D R 2が配列番号4のアミノ酸配列を有し、(iii)V H - C D R 3が配列番号5のアミノ酸配列を有し、(iv)V L - C D R 1が配列番号13のアミノ酸配列を有し、(v)V L - C D R 2が配列番号14のアミノ酸配列を有し、かつ(vi)V L - C D R 3が配列番号15のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと結合する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

30

40

【0019】

追加の実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結

50

合し、CDRのセット、すなわち、VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2、及びVL - CDR 3を含み、かかるCDRのセットは、CDRの参照セット、すなわち、(i) VH - CDR 1が配列番号21のアミノ酸配列を有し、(ii) VH - CDR 2が配列番号22のアミノ酸配列を有し、(iii) VH - CDR 3が配列番号23のアミノ酸配列を有し、(iv) VL - CDR 1が配列番号31のアミノ酸配列を有し、(v) VL - CDR 2が配列番号32のアミノ酸配列を有し、かつ(vi) VL - CDR 3が配列番号33のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。
【0020】

10

追加の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合し、CDRのセット、すなわち、VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2、及びVL - CDR 3を含み、かかるCDRのセットは、CDRの参照セット、すなわち、(i) VH - CDR 1が配列番号21のアミノ酸配列を有し、(ii) VH - CDR 2が配列番号22のアミノ酸配列を有し、(iii) VH - CDR 3が配列番号23のアミノ酸配列を有し、(iv) VL - CDR 1が配列番号40のアミノ酸配列を有し、(v) VL - CDR 2が配列番号41のアミノ酸配列を有し、かつ(vi) VL - CDR 3が配列番号42のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。
【0021】

20

追加の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合し、CDRのセット、すなわち、VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2、及びVL - CDR 3を含み、かかるCDRのセットは、CDRの参照セット、すなわち、(i) VH - CDR 1が配列番号50のアミノ酸配列を有し、(ii) VH - CDR 2が配列番号51のアミノ酸配列を有し、(iii) VH - CDR 3が配列番号52のアミノ酸配列を有し、(iv) VL - CDR 1が配列番号60のアミノ酸配列を有し、(v) VL - CDR 2が配列番号61のアミノ酸配列を有し、かつ(vi) VL - CDR 3が配列番号62のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。
【0022】

30

追加の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合し、CDRのセット、すなわち、VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2、及びVL - CDR 3を含み、かかるCDRのセットは、CDRの参照セット、すなわち、(i) VH - CDR 1が配列番号21のアミノ酸配列を有し、(ii) VH - CDR 2が配列番号22のアミノ酸配列を有し、(iii) VH - CDR 3が配列番号23のアミノ酸配列を有し、(iv) VL - CDR 1が配列番号68のアミノ酸配列を有し、(v) VL - CDR 2が配列番号69のアミノ酸配列を有し、かつ(vi) VL - CDR 3が配列番号70のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。
【0023】

40

追加の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合し、CDRのセット、すなわち、VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2、及びVL - CDR 3を含み、かかるCDRのセットは、CDRの参照セット、すなわち、(i) VH - CDR 1が配列番号78のアミノ酸配列を有し、(ii) VH - CDR 2が配列番号79のアミノ酸配列を有し、(iii) VH - CDR 3が配列番号80のアミノ酸配列を有し、(iv) VL - CDR 1が配列番号86のアミノ酸配列を有し、(v) VL - CDR 2が配列番号87のアミノ酸配列を有し、

50

かつ (v i) V L - C D R 3 が配列番号 8 8 のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくは 1 0 未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する。

【 0 0 2 4 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合し、C D R のセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及び V L - C D R 3 を含み、かかる C D R のセットは、C D R の参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2 が配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1 が配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2 が配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有し、かつ (v i) V L - C D R 3 が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくは 1 0 未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する。

10

【 0 0 2 5 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合し、A B R のセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及び V L - A B R 3 を含み、かかる A B R のセットは、A B R の参照セット、すなわち、(a) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4、5 3、または 8 1 のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5、5 4、5 5、または 8 2 のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6、5 6、5 7、または 8 3 のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1 が配列番号 3 4、4 3、6 3、7 1、または 8 9 のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2 が配列番号 3 5、4 4、6 4、7 2、または 9 0 のアミノ酸配列を有し、かつ (v i) V L - A B R 3 が配列番号 3 6、4 5、6 5、7 3、または 9 1 のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質は A c t R I I B と結合するか、または (b) (i) V H - A B R 1 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2 が配列番号 7、または 8 のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 9、または 1 0 のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1 が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2 が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有し、かつ (v i) V L - A B R 3 が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質は、A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくは 1 0 未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する。

20

30

【 0 0 2 6 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、A B R のセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及び V L - A B R 3 を含み、かかる A B R のセットは、A B R の参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1 が配列番号 3 4 のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2 が配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有し、かつ (v i) V L - A B R 3 が配列番号 3 6 のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくは 1 0 未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する。

40

【 0 0 2 7 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、A B R のセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及び V L - A B R 3 を含み、かかる A B R のセットは

50

、ＡＢＲの参照セット、すなわち、（ｉ）ＶＨ－ＡＢＲ１が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、（ｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ２が配列番号２５のアミノ酸配列を有し、（ｉｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ３が配列番号２６のアミノ酸配列を有し、（ｉｖ）ＶＬ－ＡＢＲ１が配列番号４３のアミノ酸配列を有し、（ｖ）ＶＬ－ＡＢＲ２が配列番号４４のアミノ酸配列を有し、かつ（ｖｉ）ＶＬ－ＡＢＲ３が配列番号４５のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、もしくは１０未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び／または挿入を有する。

【００２８】

追加の実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、ＡｃｔＲＩＩＢと特異的に結合し、ＡＢＲのセット、すなわち、ＶＨ－ＡＢＲ１、ＶＨ－ＡＢＲ２、ＶＨ－ＡＢＲ３、ＶＬ－ＡＢＲ１、ＶＬ－ＡＢＲ２、及びＶＬ－ＡＢＲ３を含み、かかるＡＢＲのセットは、ＡＢＲの参照セット、すなわち、（ｉ）ＶＨ－ＡＢＲ１が配列番号５３のアミノ酸配列を有し、（ｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ２が配列番号５４、または５５のアミノ酸配列を有し、（ｉｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ３が配列番号５６、または５７のアミノ酸配列を有し、（ｉｖ）ＶＬ－ＡＢＲ１が配列番号６３のアミノ酸配列を有し、（ｖ）ＶＬ－ＡＢＲ２が配列番号６４のアミノ酸配列を有し、かつ（ｖｉ）ＶＬ－ＡＢＲ３が配列番号６５のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、もしくは１０未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び／または挿入を有する。

【００２９】

追加の実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、ＡｃｔＲＩＩＢと特異的に結合し、ＡＢＲのセット、すなわち、ＶＨ－ＡＢＲ１、ＶＨ－ＡＢＲ２、ＶＨ－ＡＢＲ３、ＶＬ－ＡＢＲ１、ＶＬ－ＡＢＲ２、及びＶＬ－ＡＢＲ３を含み、かかるＡＢＲのセットは、ＡＢＲの参照セット、すなわち、（ｉ）ＶＨ－ＡＢＲ１が配列番号２４のアミノ酸配列を有し、（ｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ２が配列番号２５のアミノ酸配列を有し、（ｉｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ３が配列番号２６のアミノ酸配列を有し、（ｉｖ）ＶＬ－ＡＢＲ１が配列番号７１のアミノ酸配列を有し、（ｖ）ＶＬ－ＡＢＲ２が配列番号７２のアミノ酸配列を有し、かつ（ｖｉ）ＶＬ－ＡＢＲ３が配列番号７３のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、もしくは１０未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び／または挿入を有する。

【００３０】

追加の実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、ＡｃｔＲＩＩＢと特異的に結合し、ＡＢＲのセット、すなわち、ＶＨ－ＡＢＲ１、ＶＨ－ＡＢＲ２、ＶＨ－ＡＢＲ３、ＶＬ－ＡＢＲ１、ＶＬ－ＡＢＲ２、及びＶＬ－ＡＢＲ３を含み、かかるＡＢＲのセットは、ＡＢＲの参照セット、すなわち、（ｉ）ＶＨ－ＡＢＲ１が配列番号８１のアミノ酸配列を有し、（ｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ２が配列番号８２のアミノ酸配列を有し、（ｉｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ３が配列番号８３のアミノ酸配列を有し、（ｉｖ）ＶＬ－ＡＢＲ１が配列番号８９のアミノ酸配列を有し、（ｖ）ＶＬ－ＡＢＲ２が配列番号９０のアミノ酸配列を有し、かつ（ｖｉ）ＶＬ－ＡＢＲ３が配列番号９１のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、もしくは１０未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び／または挿入を有する。

【００３１】

追加の実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、ＡｃｔＲＩＩＢ及びＡｃｔＲＩＩＡと特異的に結合し、ＡＢＲのセット、すなわち、ＶＨ－ＡＢＲ１、ＶＨ－ＡＢＲ２、ＶＨ－ＡＢＲ３、ＶＬ－ＡＢＲ１、ＶＬ－ＡＢＲ２、及びＶＬ－ＡＢＲ３を含み、かかるＡＢＲのセットは、ＡＢＲの参照セット、すなわち、（ｉ）ＶＨ－ＡＢＲ１が配列番号６のアミノ酸配列を有し、（ｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ２が配列番号７、または８のアミノ酸配列を有し、（ｉｉｉ）ＶＨ－ＡＢＲ３が配列番号９、または１０のアミノ酸配列を有し、（ｉｖ）ＶＬ－ＡＢＲ１が配列番号１６のアミノ酸配列を有し、（ｖ）ＶＬ－ＡＢＲ２が配列番号１７のアミノ酸配列を有し、かつ（ｖｉ）ＶＬ－ＡＢＲ３が配列番号１８のアミ

ノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及びノまたは挿入を有する。

【0032】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合し、(a) (i) 配列番号20、49、または77に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するV H と、(i i) 配列番号30、39、59、67、または85に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するV L であって、タンパク質がA c t R I I B と結合するもの、(b) (i) 配列番号2に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、(i i) 配列番号12に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L であって、タンパク質がA c t R I I B 及びA c t R I I A と結合するもの、からなる群から選択されるV H とV L の対を含む。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号20に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、配列番号30に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L とを含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号20に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、配列番号39に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L とを含む。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号49に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、配列番号59に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L とを含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号20に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、配列番号67に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L とを含む。

30

【0037】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号77に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、配列番号85に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L とを含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及びA c t R I I A と特異的に結合し、配列番号2に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV H と、配列番号12に対して少なくとも90%、95%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するV L とを含む。

40

【0039】

さらなる実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、(a) A c t R I I への結合に対してA c t R I I リガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、G D F 1、G D F 3、G D F 8 (ミオスタチン)、G D F 11、B M P 6、B M P 7、B M P 9、またはB M P 10)と競合する、(b) A c t R I I リガンド(例えば、アクチビンAまたはG D F 8)の存在下で、A c t R I I を発現している細胞でのS m a d (例えば、S m

50

a d 2 及び / または S m a d 3) のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I リガンドの存在下で、A c t R I I と、A L K 4 及び / または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び / または A L K 7 のリン酸化を減少させる、及び (d) A c t R I I に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D (例えば、B I A C O R E (登録商標) 分析により決定した場合) で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。

【 0 0 4 0 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I への結合に対して、本明細書に開示される V H と V L の配列対を含む抗体と競合する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、本明細書に開示される A c t R I I 結合性タンパク質と同じエピトープに結合する。

10

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合する抗体である。追加の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I 結合性抗体断片である。いくつかの実施形態では、抗体は、F a b、F a b'、F (a b' ₂)、F v、ダイアボディ、D A R T、及び一本鎖抗体分子 (例えば、B i T E) からなる群から選択される抗体断片である。

20

【 0 0 4 2 】

A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸及び核酸のセットもまた提供される。核酸及び核酸のセットを含有する、ベクター及びベクターのセット、ならびに核酸及びベクターで形質転換された宿主細胞がさらに提供される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ハイブリドーマまたは N S 0 マウス骨髄腫細胞、P E R . C 6 (登録商標) ヒト細胞、もしくはチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞等の哺乳類宿主細胞である。A c t R I I 結合性タンパク質を産生する哺乳類宿主細胞及びハイブリドーマを含めた宿主細胞もまた提供される。

【 0 0 4 3 】

A c t R I I 結合性タンパク質を生産するための方法もまた提供される。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質を発現する能力がある宿主細胞を、かかるタンパク質を発現させるための好適な条件下で培養し、任意選択で、発現された A c t R I I 結合性タンパク質を単離することを含む。本明細書に開示される方法または当該技術分野で知られる他の方法を使用して調製及び / または単離される A c t R I I 結合性タンパク質もまた提供される。

30

【 0 0 4 4 】

A c t R I I 結合性タンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物がさらに提供される。いくつかの実施形態では、本開示は、A c t R I I 発現もしくは A c t R I I 媒介性シグナル伝達の上昇と関連する対象における状態を治療及び / または改善する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法により、対象での A c t R I I 媒介性シグナル伝達が低下する。また、医薬品の製造または調製における、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、抗 A c t R I I B 及び / または A c t R I I A 結合性の抗体) の使用も提供される。いくつかの実施形態では、医薬品は、A c t R I I 発現または A c t R I I 媒介性シグナル伝達の上昇と関連する対象の状態の治療及び / または改善のためのものである。追加の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される疾患または状態の治療用医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用を提供する。

40

【 0 0 4 5 】

提供される方法を使用して対象において治療及び / または改善され得る状態としては、

50

変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び／または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症（ＩＰＦ）等）；代謝性疾患（例えば、ＩＩ型糖尿病インスリン抵抗性、高血糖症、及び肥満）；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患（例えば、うっ血性心不全、及び高血圧）；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、例えば、骨粗鬆症等；神経疾患；神経筋疾患、変性疾患、創傷治癒；体重減少；及びがん（例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４６】

いくつかの実施形態では、開示の方法には、有効量のＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質を含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、単独で投与される。他の実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、併用療法として投与される。さらなる実施形態では、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質は、標準治療／治療法に対する併用療法として投与される。

【００４７】

ＡｃｔＲＩＩ活性（例えば、リガンド結合及び／またはシグナル伝達）を阻止するかまたは低下させる方法もまた提供される。いくつかの実施形態では、方法は、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質と、ＡｃｔＲＩＩを発現する細胞とを接触させることを含む。いくつかの例では、方法は、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質と、ＡｃｔＲＩＩを発現する細胞とを、ＡｃｔＲＩＩリガンド（例えば、アクチビンＡ）の存在下で接触させることを含む。いくつかの実施形態では、方法はインビボで実施される。他の実施形態では、方法はインビトロで実施される。いくつかの実施形態では、阻止されるかまたは低下するＡｃｔＲＩＩ活性は、ＡｃｔＲＩのリン酸化である。さらなる実施形態では、リン酸化ＡｃｔＲＩは、ＡＬＫ４及び／またはＡＬＫ７である。追加の実施形態では、阻止されるかまたは低下するＡｃｔＲＩＩ活性は、Ｓｍａｄ（例えば、Ｓｍａｄ２及び／またはＳｍａｄ３）のリン酸化である。いくつかの実施形態では、本開示は、対象におけるＡｃｔＲＩＩ活性を阻止するかまたは低下させる方法を提供し、有効量のＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象でのＡｃｔＲＩＩＡ活性を低下させる方法が提供され、これは、有効量のＡｃｔＲＩＩＡ結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象でのＡｃｔＲＩＩＢ活性を低下させる方法が提供され、これは、有効量のＡｃｔＲＩＩＢ結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【００４８】

また、ＡｃｔＲＩＩ発現及び／またはＡｃｔＲＩＩシグナル伝達の増大と関連する病的状態において、またはＡｃｔＲＩＩリガンドの活性を低下させるかもしくは阻害することにより治療及び／または改善され得る病的状態において、ＡｃｔＲＩＩ活性を阻止するかまたは低下させる方法も提供される。場合によっては、方法は、ＡｃｔＲＩＩまたはＡｃｔＲＩＩリガンドの発現が増加している対象にＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質を投与することを含む。いくつかの実施形態では、病的状態は、筋障害である。さらなる実施形態では、筋障害は、消耗性ジストロフィーまたは筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、病的状態は、肥満またはＩＩ型糖尿病等の代謝性状態である。いくつかの実施形態では、病的状態は、肺または肝臓の線維性状態である。追加の実施形態では、病的状態は、がんである。さらなる実施形態では、がんは、骨髄線維症、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、下垂体癌、乳癌、消化管癌、または癌腫である。追加の実施形態では、病的状態は、骨量減少誘導性がん（例えば、前立腺及び乳癌）である。いくつかの実施形態では、本開示は、がん治療誘導性の骨量減少と関連する病的状態におけるＡｃｔＲＩＩ活性を阻止するかまたは低下させる方法を提供する。

【００４９】

いくつかの態様では、本開示は、筋障害を治療及び／または改善する方法を提供する。場合によっては、方法は、筋障害を有する対象に、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質（例え

10

20

30

40

50

ば、抗 A c t R I I 抗体)を投与することを含む。筋障害、例えば、消耗性ジストロフィーもしくは筋ジストロフィーの治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。他の実施形態では、対象は、筋障害、例えば、消耗性ジストロフィーまたは筋ジストロフィーを発症するリスクがある。

【0050】

いくつかの態様では、本開示は、線維性状態を治療及び/または改善する方法を提供する。場合によっては、方法は、線維性状態を有する対象に、A c t R I I 結合性タンパク質(例えば、本明細書に記載される医薬組成物にしたもの)を投与することを含む。他の実施形態では、対象は、線維性状態を発症するリスクがある。いくつかの実施形態では、線維性状態は、慢性である。線維性状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

10

【0051】

いくつかの態様では、本開示は、対象での線維症を軽減させる方法を提供する。場合によっては、方法は、線維症を有する対象に、A c t R I I 結合性タンパク質(例えば、完全長 A c t R I I 抗体または A c t R I I 結合性抗体断片等の抗 A c t R I I 抗体、ならびにそのパリアント及び誘導体)を投与することを含む。いくつかの実施形態では、線維症は、肝線維症または肺線維症である。線維症の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

20

【0052】

別の態様では、本開示は、対象における線維症によって引き起こされる肝機能または肺機能の喪失を抑制する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質(例えば、完全長 A c t R I I 抗体及びその A c t R I I 結合性断片等の抗 A c t R I I 抗体)を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法により、対象における肝機能の喪失が抑制される。いくつかの実施形態では、方法により、対象における肺機能の喪失が抑制される。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本開示は、単離された組換え A c t R I I 結合性タンパク質を提供する。ある特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及び/または A c t R I I A と特異的に結合する。さらなる実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、抗 A c t R I I 抗体である。A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸、当該核酸を含有するベクター及び宿主細胞、ならびに A c t R I I 結合性タンパク質を作製及び使用する方法もまた提供される。提供される A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I の発現及び/またはシグナル伝達と関連する疾患及び状態の診断、治療、及び/または改善に使用される。そのような使用としては、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮または筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態(例えば、肝臓、肺、血管及び/または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症(I P F)等)；代謝性疾患(例えば、I I 型糖尿病及び肥満)；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患(例えば、うっ血性心不全、及び高血圧)；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、神経疾患、例えば、骨粗鬆症等；創傷治療；体重減少；及びがん(例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌)を、予防すること、及び/または改善することが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0054】

定義

別段定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術的及び科学的用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 20

50

02, CRC Press、The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press、及びOxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressでは、本開示で使用されている用語の多くに関する一般辞書を当業者に提供している。本明細書に記載されている見出しは、様々な態様についての限定ではなく、概して、明細書の参照により使用され得るものである。さらに、このすぐ後で定義される用語は、明細書を全体として参照することにより、さらに詳細に定義される。

【0055】

「a」、「an」、及び「the」という用語には、その用語が使用されている文脈で他の意味が明確に指示されない限り、複数の指示対象が含まれる。「a」（または「an」）という用語、ならびに「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」という用語は本明細書では同じ意味で使用される。さらに、本明細書で「及び/または」が使用される場合、2つ以上の指定されている特徴または構成要素について、一方が他方を伴う場合も伴わない場合も、それら各々が具体的に開示されていると解釈されるべきである。したがって、本明細書で「A及び/またはB」のような語句で使用される場合の「及び/または」という用語、「A及びB」、「AまたはB」、「A」（単独）、及び「B」（単独）が含まれることが意図される。同様に、「A、B、及び/またはC」のような語句で使用される場合の「及び/または」という用語は、A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）という態様の各々が包含されることが意図される。

【0056】

「含む（comprise）」という用語は一般に、含む（include）の意味として、すなわち、1つ以上の特徴または構成要素の存在を認めるという意味で使用される。場所を問わず、本明細書で態様が「含む（comprising）」という言葉を用いて記載されている場合、「からなる（consisting of）」及び/または「本質的に～からなる（consisting essentially of）」という用語で記載される他の類似の態様もまた提供される。

【0057】

明細書及び請求項を通じて数値との関連で使用される「約」及び「おおよそ」という用語は、当業者によく知られ、かつ許容され得る精度の区間を意味する。一般に、そのような精度の区間は $\pm 10\%$ である。あるいは、特に生物系では、「約」及び「おおよそ」という用語は、所与の値の1桁分以内、好ましくは5倍以下、より好ましくは2倍で以下である値を意味し得る。

【0058】

数範囲には、その範囲を定義している数が含まれる。

【0059】

ActRII結合性タンパク質とは、ActRII（すなわち、ActRIIB及び/またはActRIIA）に特異的に結合し、好ましくはActRIIの細胞外ドメインに結合するタンパク質を指す。

【0060】

「ActRIIアクチビン受容体II型、及び「ActRII」という用語は同じ意味で使用され、その用語が使用されている文脈で他の意味が明確に指示されない限り、アクチビン受容体IIA型（ActRIIA）及び/またはアクチビン受容体IIB型（ActRIIB）を指す。

【0061】

「アクチビン受容体IIA型」、「ActRIIA受容体」、及び「ActRIIA」という用語は本明細書では同じ意味で使用され、ActRIIA（文献中、ACVR2A、ActRIIA、ActRII、及びEC 2.7.11.30とも呼ばれる）を指す

10

20

30

40

50

。ヒトA c t R I I Aの参照配列は、参照配列番号N P _ 0 0 1 6 0 7 . 1で提供されている。提供されるA c t R I I A結合性タンパク質は、配列番号9 2のアミノ酸2 0 ~ 1 3 8に対応する、A c t R I I Aの細胞外ドメインと結合する。

【0 0 6 2】

「アクチビン受容体I I B型」、「A c t R I I B受容体」、及び「A c t R I I B」という用語は同じ意味で使用され、A c t R I I Bを指す（文献中、A C V R 2 B、A c t R I I B、H T X 4、E r b B 3受容体、及びE C 2 . 7 . 1 1 . 3 0とも呼ばれる）。ヒトA c t R I I Bの参照配列は、N C B I参照配列N P _ 0 0 1 0 9 7で提供されている。提供されるA c t R I I B結合性タンパク質は、配列番号9 3のアミノ酸1 9 ~ 1 3 0に対応するA c t R I I Bの細胞外ドメインと結合する。

10

【0 0 6 3】

A c t R I I結合性タンパク質（例えば、中和抗体）との関連において使用される場合の「競合する」という用語は、アッセイにより決定される抗原結合タンパク質間の競合であり、アッセイにおいて、被験抗原結合タンパク質（例えば、抗A c t R I I抗体またはそのA c t R I I結合性断片）が、参照抗原結合タンパク質（例えば、リガンド、または参照抗体）が共通の抗原（例えば、A c t R I I AもしくはA c t R I I Bの細胞外ドメインまたはその断片）に特異的に結合することを防ぐかまたは阻害することを意味する。多数の種類の競合結合アッセイ、例えば、固相ラジオイムノアッセイ（R I A）の直接法または間接法（例えば、M o l d e n h a u e r e t a l . , S c a n d . J . I m m u n o l . 3 2 : 7 7 - 8 2 (1 9 9 0) 及びM o r e l e t a l . , M o l e c . I m m u n o l . 2 5 : 7 - 1 5 (1 9 8 8) を参照のこと）、固相酵素免疫測定法（E I A）の直接法または間接法、固相ビオチン - アビジンE I Aの直接法（例えば、C h e u n g , e t a l . , V i r o l o g y 1 7 6 : 5 4 6 - 5 5 2 (1 9 9 0) 及びK i r k l a n d e t a l . , J . I m m u n o l . 1 3 7 : 3 6 1 4 - 3 6 1 9 (1 9 8 6) を参照のこと）、及びサンドイッチ競合アッセイ（例えば、S t a h l i e t a l . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 9 2 : 2 4 2 - 2 5 3 (1 9 8 3) を参照のこと）を使用することができる。典型的には、そのようなアッセイでは、固体表面または細胞に結合している精製抗原（これらのいずれかを担持）、非標識の被験抗原結合タンパク質及び標識した参照抗原結合タンパク質の使用を伴う。

20

【0 0 6 4】

競合的阻害は、被験抗原結合タンパク質の存在下で、固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定することができる。通常、被験抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイで同定される抗原結合タンパク質（競合する抗原結合タンパク質）としては参照A c t R I I結合性タンパク質と同一のエピトープに結合するA c t R I I結合性タンパク質、ならびに、立体障害が発生するように、参照A c t R I I結合性タンパク質が結合しているエピトープに十分に近位の隣接エピトープに結合するA c t R I I結合性タンパク質が含まれる。通常、競合するA c t R I I（例えば、A c t R I I AまたはA c t R I I B）結合タンパク質が過剰に存在する場合、参照A c t R I I結合性タンパク質A c t R I I（例えば、A c t R I I AまたはA c t R I I B）の特異的結合は少なくとも4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %または7 5 %阻害される。場合によっては、競合する抗原結合タンパク質は、参照A c t R I I結合性タンパク質の特異的結合を少なくとも8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 % 9 8 %、または9 9 %阻害する。

30

40

【0 0 6 5】

A c t R I Iタンパク質との関連において使用される場合の「エピトープ」という用語は、本開示のA c t R I I結合性タンパク質（例えば、抗体）への結合能のあるA c t R I I（例えば、ヒトA c t R I I A、ヒトA c t R I I B、マウスA c t R I I AまたはマウスA c t R I I A）タンパク質決定基を指す。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖のような化学的に活性な表面分子団からなり、通常、特定の三次元構造特性及び特定の電荷特性を有する。立体構造エピトープと非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下

50

で、前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。A c t R I I 結合性タンパク質が結合したA c t R I Iのエピトープは、当該技術分野で公知の技術を使用して容易に決定することができる。

【0066】

本明細書に開示される、抗A c t R I I結合性抗体及びそのA c t R I I結合性結合断片、バリエーション、または誘導体等の抗原結合タンパク質は、それらが認識するかまたは特異的に結合する抗原、例えば、標的ポリペプチドのエピトープ（複数可）もしくは部分（複数可）の点から表すかまたは特定することができる。例えば、本明細書に開示されるA c t R I I結合性タンパク質の抗原結合ドメインと特異的に相互作用するA c t R I Iの部分「エピトープ」である。エピトープは、連続アミノ酸、またはタンパク質の三次折り畳みにより並列している非連続アミノ酸のいずれからも形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒への曝露時に保持されるが、三次折り畳みにより形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒での処理時に失われる。エピトープ決定基には、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基またはスルホニル基等の化学的に活性な表面分子団が含まれ得、また特定の三次元構造特性、及び/または特定の電荷特性を有し得る。エピトープには典型的に、少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35のアミノ酸が固有の空間的コンホメーションで含まれる。エピトープは、当該技術分野で公知の方法を使用して日常的に決定することができる。

【0067】

「阻害する」、「阻止する」、「低下させる」、「減少させる」、「抑制する」、「拮抗する」、及び「中和する」という用語は同じ意味で使用され、活性の完全阻止を含めた、活性（例えば、A c t R I Iリガンドの結合及びA c t R I Iシグナル伝達）の統計学的に有意ないかなる減少も指す。例えば、「阻害」または「抑制」とは、対照と比較した、活性の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の減少を指し得る。

【0068】

いくつかの実施形態では、「減少」という用語は、抗体またはそのA c t R I I結合性断片等のA c t R I I結合性タンパク質が、A c t R I I及びI型受容体を発現する細胞と、アクチビンA等のA c t R I Iリガンドとの接触により誘導される1つ以上のS m a d（例えば、S m a d 2及び/またはS m a d 3）のリン酸化を、A c t R I I結合性タンパク質と接触しなかった細胞でのS m a dリン酸化の程度と比べて統計学的に有意に（例えば、p値が0.05以下）減少させる能力を指す場合がある。A c t R I I（例えば、A c t R I I B及び/またはA c t R I I A）を発現する細胞は、天然に存在する細胞または細胞株であり得、またはA c t R I I（例えば、A c t R I I B及び/またはA c t R I I A）をコードする核酸を宿主細胞内に導入することにより組換えで生産することもできる。いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質、例えば、A c t R I I抗体またはそのA c t R I I結合性断片は、本明細書に記載されるかまたは当該技術分野で知られる他の標準的技術及び条件を使用して、例えば、ウェスタンブロッティングと、その後の抗ホスホチロシン抗体を用いたプローブによるか、またはE L I S Aにより決定した場合、A c t R I Iリガンド媒介性の1つ以上のS m a d（例えば、S m a d 2及び/またはS m a d 3）のリン酸化を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%または約100%減少させる。

【0069】

いくつかの実施形態では、A c t R I I A結合性タンパク質は、本明細書に記載されるかまたは当該技術分野で知られる他の技術を使用して、例えば、ウェスタンブロッティングと、その後の抗ホスホチロシン抗体を用いたプローブによるか、またはE L I S A（例えば、P - S m a d E L I S A）もしくはS m a d依存的レポーター遺伝子アッセイにより決定した場合、A c t R I I Aリガンド（例えば、アクチビンA）媒介性の1つ以上のS m a d（例えば、S m a d 2及び/またはS m a d 3）のリン酸化を少なくとも10

%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%、または約100%減少させる。

【0070】

追加の実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質は、本明細書に記載されるかまたは当該技術分野で知られる他の標準的技術と条件を使用して、例えば、ウェスタンブロッティングと、その後の抗ホスホチロシン抗体を用いたプローブによるか、またはELISA（例えば、P-Smad ELISA）もしくはSmad依存的反応子アッセイにより決定した場合、ActRIIRリガンド（例えば、アクチビンAまたはGDF8）媒介性の1つ以上のSmad（例えば、Smad2及び/またはSmad3）のリン酸化を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%、または約100%減少させる。

10

【0071】

「増大させる」、「促進する」及び「アゴニスト」という用語は同じ意味で使用され、活性（例えば、ActRIIRリガンドの結合及び/またはActRIIRシグナル伝達）の統計学的に有意ないかなる増大も指す。例えば、「増大させる」または「促進する」とは、対照と比較した、活性の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の増大を指し得る。

【0072】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は本明細書では同じ意味で使用され、全（完全長）抗体及びその抗原結合性断片または一本鎖が含まれる。典型的な抗体は、ジスルフィド結合で相互に接続された少なくとも2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略す）及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、CH1、CH2、及びCH3という3つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略す）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、CLという1つのドメインで構成される。VH領域及びVL領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができ、フレームワーク領域（FW）と呼ばれる、より保存性の高い領域が散在する。各VH及びVLは、3つのCDR及び4つのFWで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へ向かってFW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4という順序で配列されている。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第1成分（C1q）を含めた宿主の組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。例示的抗体としては、典型的抗体、scFv、及びそれらの組み合わせが含まれ、その場合、例えば、scFvが、典型的抗体の重鎖及び/または軽鎖のいずれかのN末端もしくはC末端に共有結合で連結されている（例えば、ペプチド結合または化学的リンカーを介して）か、または典型的抗体の重鎖及び/または軽鎖内に介在する。

20

30

【0073】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、抗体が所望の結合活性を示す限り、無傷ポリクローナル抗体、無傷モノクローナル抗体、抗体断片（Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片等）、一本鎖Fv（scFv）の誘導体と変異体、二重特異性抗体等の多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューとそれぞれ呼ばれる重鎖定常ドメインの固有性に基づく5つの主要クラスの免疫グロブリン、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、またはそれらのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）のいずれでもあり得る。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なった、よく知られているサブユニット構造及び三次元立体配置を有する。抗体は、裸であるか、または毒素、放射性同位体等の他の分子に結合させたものでもよい。「IgG」という用語は、認識された免疫グロブリンガンマ遺伝子に実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを指す。ヒトでは

40

50

、このクラスはI g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4を含む。マウスでは、このクラスはI g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、及びI g G 3を含む。

【0074】

「A c t R I I 抗体」、「A c t R I I に結合する抗体」、または「抗A c t R I I 抗体」という用語は、その抗体が、治療剤または診断用試薬としてA c t R I I B 及び/またはA c t R I I A を標的とする際に有用であるよう十分な親和性で、A c t R I I (例えば、それぞれA c t R I I B 及び/またはA c t R I I A) と結合する能力がある抗体を指す。

【0075】

A c t R I I タンパク質との関連において使用される場合の「特異的に結合する」とは一般に、抗体等、ある結合性タンパク質が、A c t R I I (例えば、A c t R I I B 及び/またはA c t R I I A、好ましくはヒトA c t R I I A 及び/またはヒトA c t R I I B、好ましくはA c t R I I B 及び/またはA c t R I I A の細胞外ドメイン) に対して、その結合性タンパク質が、関連のない対照タンパク質に結合する場合よりも高い親和性で結合する能力を意味する。いくつかの実施形態では、対照タンパク質は、ニワトリ卵白リゾチームである。好ましくは結合性タンパク質は、少なくとも、対照タンパク質に対する親和性より100倍、500倍、または1000倍高い親和性でA c t R I I と結合する。好ましくは、結合性タンパク質は、当該技術分野で公知の結合アッセイを使用して測定した場合、ヒトA c t R I I に対する結合親和性が 1×10^{-7} M以下または 1×10^{-8} 以下である。いくつかの実施形態では、結合親和性は、ラジオイムノアッセイ(R I A) またはB I A C O R E (登録商標)(例えば、A c t R I I (例えば、A c t R I I B 及び/またはA c t R I I A) を分析対象物として、またA c t R I I 結合性タンパク質をリガンドとして使用するか、またはその逆で使用) を使用して測定される。

【0076】

いくつかの実施形態では、関連のない非A c t R I I タンパク質に対するA c t R I I 結合性タンパク質(例えば、抗A c t R I I 抗体)の結合の程度は、A c t R I I に対するそのA c t R I I 結合性タンパク質の結合の約10%未満であり、例えば、ラジオイムノアッセイ(R I A)、B I A C O R E (登録商標)(組換えA c t R I I を分析対象物として、またA c t R I I 結合性タンパク質をリガンドとして使用するか、またはその逆で使用)、結合平衡除外法(K I N E X A (登録商標))、または当該技術分野で公知の他の結合アッセイによって測定される。ある特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、解離定数(K_D)が1 μ M以下、100 n M以下、10 n M以下、1 n M以下、0.1 n M以下、10 p M以下、1 p M以下、または0.1 p M以下の、完全長抗体またはA c t R I I 結合性抗体断片である。

【0077】

「抗原結合性抗体断片」(例えば、「A c t R I I 結合性抗体断片」、「A c t R I I A 結合性抗体断片」及び「A c t R I I B 結合性抗体断片」という用語は、無傷抗体の抗原結合可変領域(例えば、C D R 3)の全部または一部を含有する断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行され得ることが知られている。抗体断片の例としては、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂断片、及びF v 断片、線状抗体、一本鎖抗体、ならびに1つ以上の抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示は、A c t R I I 結合性抗体断片であって、抗体断片が、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂断片、F v 断片、ダイアボディ、または一本鎖抗体分子であるものを提供する。

【0078】

F c 領域には、第1の定常領域免疫グロブリンドメイン以外の抗体定常領域を含むポリペプチドが含まれる。したがって、F c とは、I g A、I g D、及びI g G の後の2つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにI g E 及びI g M の後の3つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにこれらのドメインの柔軟性のあるヒンジN末端を指す。I g A 及びI g M の場合、F c にはJ鎖が含まれ得る。I g G の場合、F c は、免疫グロブ

10

20

30

40

50

リンドメインであるC y 2及びC y 3、ならびにC y 1とC y 2の間のヒンジを含む。F c領域の境界は様々であり得るが、ヒトI g Gの重鎖F c領域は通常そのカルボキシル末端に残基C 226またはP 230を含むと定義され、ここでの番号付けは、K a b a t (K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N I H , B e t h e s d a , M d . (1 9 9 1)) に記載されているE U インデックスに従って行われる。F cとは、単独でこの領域を指すか、または全抗体、抗体断片、もしくはF c融合タンパク質との関連においてこの領域を指し得る。E U インデックスで番号付けした場合の270位、272位、312位、315位、356位、及び358位等、これらに限定されない、いくつかの異なるF c位置にて多型が観察されており、そのため、提示配列と従来技術での配列との間にわずかな相違が存在する場合がある。

10

【0079】

「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原決定基またはエピトープの高度に特異的な認識及び結合に関与する均一な抗体集団を指す。これは、典型的には異なる抗原決定基に対して指向される異なる抗体が含まれたポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷及び完全長のモノクローナル抗体の両方、ならびに抗体部分を含む抗体断片(F a b、F a b'、F (a b') 2、及びF v等)、一本鎖(s c F v)変異体、及び融合タンパク質)、ならびに抗原認識部位を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、及びトランスジェニック動物等、これらに限定されない任意の数の方法で作製してよい。

20

【0080】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来している抗体を指す。典型的には、軽鎖及び重鎖の両方の可変領域は、抗原と結合する所望の特異性、親和性、及び/または能力を有する、哺乳類(例えば、マウス、ラット、ウサギ等)の1つの種に由来する抗体の可変領域に対応する一方、定常領域は、別の種(通常はヒト)での免疫応答誘発を回避するために、その種に由来する抗体の配列に相同である。

【0081】

「ヒト化抗体」という用語は、少ない、好ましくは最小限の非ヒト(例えば、マウス)配列を含有するよう操作されている、非ヒト(例えば、マウス)免疫グロブリンに由来する抗体を指す。典型的には、ヒト化抗体は、C D Rからの残基が、抗原と結合する所望の特異性、親和性、及び/または能力を有する非ヒト種(例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはハムスター)のC D Rからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリンである(J o n e s , N a t u r e 321:522-525(1986)、R i e c h m a n n , N a t u r e 332:323-327(1988)、V e r h o e y e n , S c i e n c e 239:1534-1536(1988))。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク領域(F W)残基が、抗原と結合する所望の特異性、親和性、及び/または能力を有する非ヒト種からの抗体における対応残基と置き換えられる。ヒト化抗体は、抗体の特異性、親和性、及び/または能力を精密化及び最適化するために、F vフレームワーク領域で、及び/または置き換えた非ヒト残基内のいずれにおいても、追加の残基の置換によりさらに修飾することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するすべてまたは実質的にすべてのC D R領域を含有するが、すべてまたは実質的にすべてのF R領域はヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のものである、少なくとも1つの可変ドメイン、典型的には2つもしくは3つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリンの定常領域または定常ドメイン、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域または定常ドメインの少なくとも一部も含み得る。ヒト化抗体を作製するために使用される方法の例は、米国特許第5,225,539号及び同第5,639,641号に記載されている。

30

40

【0082】

50

「ヒト抗体」という用語は、ヒトにより産生される抗体、または当該技術分野で公知の任意の技術を使用して作製された、ヒトにより産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。「ヒト抗体」という用語には、無傷（完全長）抗体、その断片、及び／または、少なくとも1つのヒトの重鎖及び／または軽鎖のポリペプチドを含む抗体、例えば、マウス軽鎖ポリペプチドとヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体等が含まれる。

【0083】

「アンタゴニスト」、「阻止」、または「中和」結合性タンパク質は、それが結合する A c t R I I B 及び／または A c t R I I A 等の抗原の活性を阻害するかまたは低下させるものである。いくつかの実施形態では、アンタゴニスト A c t R I I 結合性タンパク質は、アクチビン A 等の A c t R I I A リガンドによる A c t R I I A への結合を減少させるかまたは阻害する。いくつかの実施形態では、アンタゴニスト A c t R I I 結合性タンパク質は、アクチビン A 等の A c t R I I B リガンドによる A c t R I I B への結合を減少させるかまたは阻害する。ある特定の実施形態では、アンタゴニスト A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I の活性を実質的または完全に阻害する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 活性は、10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、または100%低下される。ある特定の実施形態では、アンタゴニスト A c t R I I 結合性タンパク質は、完全長抗体または A c t R I I A 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I A 抗体である。さらなる実施形態では、アンタゴニスト抗 A c t R I I A 抗体は、A c t R I I A の活性を少なくとも10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、または100%も阻害するかまたは低下させる。追加の実施形態では、アンタゴニスト A c t R I I 結合性タンパク質は、完全長抗体または A c t R I I B 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I B 抗体である。さらなる実施形態では、アンタゴニスト抗 A c t R I I B 抗体は、A c t R I I B の活性を少なくとも10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、または100%も阻害するかまたは低下させる。

【0084】

「結合親和性」とは一般に、ある分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との非共有結合による相互作用の総体的強度を指す。別段に示されていない限り、「結合親和性」とは、結合対のメンバー間（例えば、抗体と抗原）の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子 X の、そのパートナー Y に対する親和性は一般に、解離定数（ K_D ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含め、当該技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる、また本開示の目的に使用することができる。

【0085】

「効力」は、所与の強度の効果を生み出すのに必要な化合物の量に関して表される化合物の薬理学的活性の尺度である。これは、定義された生物学的効果・生物学的作用を達成するために必要な化合物の量を指し、必要な用量が少ないほど薬物は強力である。効力は通常、特に明記しない限り、 IC_{50} 値（nM）として表される。 IC_{50} は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I A または抗 A c t R I I B 抗体）の阻害濃度の中央値である。機能解析では、 IC_{50} は生体応答をその最大値の50%低下させる濃度である。リガンド-受容体結合試験では、 IC_{50} は、リガンド-受容体結合を最大特異的結合レベルの50%減少させる濃度である。 IC_{50} は、当該技術分野で公知の任意の数の手段により計算することができる。本明細書で提供される抗体または他の結合性タンパク質の効力の改善倍率は、参照抗 A c t R I I 抗体または他の A c t R I I 結合性タンパク質と比較した場合、少なくとも2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、160倍、170倍、または少なくとも180倍であり得る。

【0086】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」とは、ある特定の細胞傷害性細

10

20

30

40

50

胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌Igが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、続いて標的細胞を細胞毒で死滅させるのを可能にする、細胞傷害の一形態である。標的細胞の表面に指向された特定の高親和性IgG抗体は、細胞傷害性細胞を「武装」させるため、そのような死滅に絶対的に必要とされる。標的細胞の溶解は細胞外であり、細胞間の直接の接触を必要とし、補体の関与はない。抗体に加えて、ActRIIを持つ標的細胞に対する特異的結合能のある、Fc領域を含む他のタンパク質、特にFc融合タンパク質は、細胞媒介性細胞傷害をもたらすことができることが企図される。簡潔にするために、Fc融合タンパク質の活性に起因する細胞媒介性細胞傷害は、本明細書ではADCC活性とも呼ばれる。

10

【0087】

「単離された」、ActRII結合性タンパク質（例えば、ActRII抗体であり、これにはそのActRII結合性断片、バリエーション、及び誘導体が含まれる）、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、天然では見られない形態にあるタンパク質（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたタンパク質、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物には、それらがもはや天然で見られる形態ではなくなる程度まで精製されているものが含まれる。いくつかの実施形態では、単離されているタンパク質、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。単離されたタンパク質及び単離された核酸は、それらが天然に関連している物質、例えば、それらの天然環境、またはそれらがインビトロもしくはインビボで実施される組換えDNA技術によって調製される場合の調製環境（例えば、細胞培養）においてそれらと共に見出される他のポリペプチドもしくは核酸等を、含まないかまたは実質的に含まない。タンパク質及び核酸は、希釈剤またはアジュバントと共に製剤化され得、さらに実用的目的のために単離され得、例えば、タンパク質は、通常は、イムノアッセイでの使用のためのマイクロタイタープレートをコートするために使用される場合は、ゼラチンまたは他の担体と共に混合されるか、または診断もしくは治療に使用する場合は、薬学的に許容される担体もしくは希釈剤と共に混合される。

20

【0088】

「対象」、「個体」、「動物」、「患者」、及び「哺乳類」という用語は、診断、予後、または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳類の対象を指す。哺乳類の対象としては、特定の処置の対象レシピエントである、ヒト、非ヒト霊長類、飼育動物、家畜、げっ歯類等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0089】

「医薬組成物」という用語は、有効成分の生物学的活性が有効となり得るような形態にあり、かつ、組成物が投与されると考えられている対象にとって許容できないほどの毒性のある濃度でのいかなる追加構成成分も含有しない調製物を指す。そのような組成物は無菌であり得る。

【0090】

本明細書に開示されるような、ポリペプチド、例えば、抗体等の抗原結合タンパク質の「有効量」は、具体的に記述された目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、記述された目的に関連して、経験的に、日常的方法で決定することができる。「治療的有效量」という用語は、対象（例えば、ヒト等の哺乳類）の疾患もしくは状態を「治療」するのに有効であり、かつ、かかる疾患もしくは状態を有する対象に何らかの改善または利益をもたらす、ポリペプチド、例えば、抗体等の抗原結合タンパク質または他の薬物の量を指す。したがって、「治療的に有効な」量とは、ActRII媒介性の疾患もしくは状態の少なくとも1つの臨床的症状の、ある程度の軽減、緩和、及び/または減少をもたらす量である。本開示の方法によって治療することができる疾患または状態と関連する臨床症状はよく知られている。さらに、対象にある程度の利益がもたらされる限り、治療効果は完全または治癒的である必要はない。いくつかの実施形態では、「治療的に有効な」という用語は、それを必要とする患者においてActRII活性を低下させることができる

40

50

治療剤の量を指す。実際の投与量及び投与の速度と時間経過は、治療されるものの性質と重症度に応じて異なる。治療の処方、例えば、投与量の決定等は、一般医及び他の医師の責任の範囲内である。抗体及びその抗原結合性断片の適切な用量は一般に知られており、Leder mann et al., Int. J. Cancer 47:659-664 (1991)、Bagshawe et al., Ant. Immun. and Radio pharm. 4:915-922 (1991)を参照のこと。

【0091】

ActRII媒介性の疾患または状態を有する患者において特定の結果を達成するための「十分量」または「十分な量」とは、所望の効果、任意選択で治療効果を生み出すのに効果的である（すなわち、治療的有效量の投与による）治療剤（例えば、本明細書に開示

10

【0092】

「標識」という用語は、「標識された」部分が生成されるよう、抗ActRII抗体等の部分に直接または間接的に結合されている検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）であってよく、または酵素標識の場合、検出可能な基質化合物もしくは基質組成物の化学的变化を触媒してもよい。

【0093】

20

「治療すること」、もしくは「治療」、「治療する」または「改善すること」及び「改善する」という等の用語は、（a）診断された病的状態もしくは障害について、症状を治癒、減速、軽減させる、及び／または進行を停止させる、治療処置、ならびに（b）標的とする疾患もしくは状態の発症を予防及び／または遅くする、予防的（prophylactic）または予防的（preventative）措置の両方を指す。したがって、治療を必要とする対象には、すでに疾患または状態にある対象、疾患または状態を発症するリスクのある対象、疾患または状態が予防されるべき対象が含まれる。ある特定の実施形態では、対象が、例えば、疾患または状態と関連する症状の全体的、部分的、もしくは一過性の改善または消失を示す場合、その対象は、本明細書で提供される方法に従って首尾よく「治療」されている。いくつかの実施形態では、本開示は、疾患または不使用による筋肉消耗等の筋障害治療するための方法を提供する。追加の実施形態では、本開示は、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び／または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症（IPF）等）；代謝性疾患（例えば、II型糖尿病及び肥満）；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患（例えば、うっ血性心不全、及び高血圧）；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、神経疾患、例えば、骨粗鬆症等；創傷治癒；体重減少；及びがん（例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌）から選択される疾患または状態を治療するための方法を提供する。さらなる実施形態では、本開示は、上記の疾患または状態のうち1つ以上の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなActRII結合性タンパク質の使用を提供する。

30

40

【0094】

本明細書で使用される場合、「と組み合わせて」または「併用療法」とは、追加の療法（例えば、第2、第3、第4等）が、体内でさらに有効であるような投与の任意の形態を指す（例えば、複数の化合物が、対象において同時に有効であり、これには、それらの化合物の相乗効果が含まれ得る）。有効性は、血液、血清、または血漿中での薬剤の測定可能な濃度と相関しない場合がある。例えば、異なる治療用化合物は、同じ製剤にして投与することができ、別個の製剤にして、同時または順次に、異なるスケジュールで投与することもできる。したがって、そのような治療を受ける対象は、異なる治療法の併用効果による利益を得ることができる。本開示の1つ以上のActRII結合性タンパク質は、1

50

つ以上の他の追加薬剤及び／または支持療法と同時か、それより前か、またはその後に投与することができる。一般に、各治療剤は、その特定の薬剤について決定された用量及び／またはタイムスケジュールで投与される。レジメンで使用する特定の組み合わせでは、本開示のアンタゴニストと治療及び／または所望の転帰との適合性が考慮される。

【0095】

本開示の方法及び技術は一般に、別段に示されていない限り、公知の従来方法に従って、本開示全体を通して引用及び考察される様々な一般参考文献及びより詳細な参考文献に記載のように実施される。例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれる、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) 及び Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)、ならびに Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) を参照のこと。

【0096】

「がん」、「腫瘍」、「がん性」、及び「悪性」という用語は、典型的には無秩序な細胞増殖を特徴とする、哺乳類における生理学的状態を指すかまたは表す。がんの例としては、腺癌等の癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、消化管癌、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫、膀胱癌、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌 (hepatic carcinoma) 及び肝癌 (hepatoma) 等の肝癌 (liver cancer)、膀胱癌、乳癌 (ホルモンによる乳癌を含む；例えば、Innes et al., Br. J. Cancer 94: 1057 - 1065 (2006) を参照のこと)、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫 (多発性骨髄腫等)、唾液腺癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、頭頸部癌各種及び粘液を発生母地とするがん、例えば、粘液性卵巣癌、ならびに胆管癌 (肝臓) が挙げられる。特定の実施形態では、がんは、骨髄線維症、骨髄腫 (例えば、多発性骨髄腫)、または下垂体癌である。他の実施形態では、がんは、乳癌、消化管癌、または癌腫 (例えば、基底細胞癌及び扁平上皮癌) である。追加の実施形態では、がんは、骨量減少誘導性がんである。

【0097】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は同じ意味で使用され、単一の核酸及び複数の核酸を包含することが意図され、単離された核酸の分子またはコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA)、相補的DNA (cDNA)、またはプラスミドDNA (pDNA) を指す。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、通常のホスホジエステル結合または通常以外の結合 (例えば、ペプチド核酸 (PNA) で見られるようなアミド結合) を含む。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNA、cDNA、またはRNA断片を指す。核酸またはポリヌクレオチドに適用される場合、「単離された」という用語は、その天然環境から取り除かれている核酸分子、DNAまたはRNAを指し、例えば、ベクター内に含有された抗原結合タンパク質をコードする組換えポリヌクレオチドは、本開示の目的のために単離されていると見なされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞内に維持されているか、または他のポリヌクレオチドから (部分的または実質的に) 精製された溶液中の組換えポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子には、インビボまたはインビトロでの、本開示のポリヌクレオチドのRNA転写産物が含まれる。本開示による単離されたポリヌクレオチドまたは核酸にはさらに、合成により生成されたそのような分子が含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸にはプロモ

10

20

30

40

50

ーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、または転写終結シグナル等の調節エレメントが含まれ得る。

【0098】

「ベクター」という用語は、宿主細胞に、目的の1つ以上の遺伝子（複数可）または配列（複数可）を送達する能力、及び態様によっては、それらを発現する能力のあるコンストラクトを意味する。ベクターの例としては、ウイルスベクター、裸のDNAもしくはRNAの発現ベクター、プラスミド、コスミド、もしくはファージのベクター、カチオン性縮合剤と会合させたDNAもしくはRNAの発現ベクター、リボソームに封入したDNAもしくはRNAの発現ベクター、及びプロデューサー細胞等の特定の真核細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

【0099】

「宿主細胞」という用語は、組換え核酸を有するか、または有する能力がある、細胞または細胞集団を指す。宿主細胞は、原核生物のもの（例えば、*E. coli*）、または真核生物のものであり得る。宿主細胞は、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、または*Schizosaccharomyces pombe*等の酵母を含め、真菌細胞であり得る。宿主細胞はまた、昆虫細胞（例えば、*Sf-9*）または哺乳類細胞（例えば、HEK293F、CHO、COS-7、NIH-3T3、NS0、PER.C6（登録商標）、及びハイブリドーマ）等の様々な動物細胞のいずれでもあり得る。さらなる実施形態では、宿主細胞は、CHO-K、CHO-0 CHO-Lec10、CHO-Lec13、CHO-Lec1、CHO Pro⁺5、及びCHO dhfr⁻からなる群から選択されるCHO細胞である。特定の実施形態では、宿主細胞は、ハイブリドーマである。

20

【0100】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は本明細書では同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸ポリマーを指す。ポリマーは、直鎖でも分岐でもあり得、修飾アミノ酸を含むことができ、非アミノ酸により中断され得る。かかる用語はまた、自然に、または介入により修飾されているアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または他の任意の操作もしくは修飾、例えば、標識成分との結合等によって修飾されているものも包含する。この定義内には、例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の1つ以上の類似体及び当該技術分野で公知の他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。態様によっては、提供されるActRII結合性タンパク質は抗体に基づくため、ActRII結合性タンパク質は、一本鎖としても結合鎖としても生じ得ることが理解される。

30

【0101】

「組換え」ポリペプチド、タンパク質または抗体とは、組換えDNA技術により生産されたポリペプチド、タンパク質または抗体を指す。組換えにより生産された、宿主細胞で発現させたポリペプチド、タンパク質及び抗体は、本開示の目的のために単離されたと見なされ、任意の好適な技術によって分離、分画、または部分的もしくは実質的に精製されている、天然ポリペプチドまたは組換えポリペプチドも同様である。

【0102】

本開示にはまた、ポリペプチドの断片、バリエーション、または誘導体、及びそれらの任意の組み合わせも含まれる。ポリペプチド及びタンパク質に言及する場合の「断片」という用語には、参照ポリペプチドまたは参照タンパク質の特性のうち少なくともいくつかを保持する任意のポリペプチドまたはタンパク質が含まれる。ポリペプチドの断片としては、タンパク質分解断片、及び欠失断片が挙げられる。

40

【0103】

「バリエーション」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸修飾のために、親である抗体またはポリペプチドの配列とは異なる、抗体またはポリペプチドの配列を指す。抗体またはポリペプチドのバリエーションには、断片が含まれるほか、アミノ酸の置換、欠失、もしくは挿入のためにアミノ酸配列が改変されている、抗体またはポリペプチドも含まれる。バ

50

リアントは、天然に存在しても、または天然に存在しなくてもよい。天然には存在しないバリエーションは、当該技術分野で知られている変異誘発技術を使用して作製することができる。バリエーションポリペプチドは、保存的または非保存的なアミノ酸の置換、欠失もしくは付加を含むことができる。

【0104】

抗体またはポリペプチドに適用される場合の「誘導体」という用語は、天然の抗体またはポリペプチドでは見られない追加の特徴を示すように改変されている抗体またはポリペプチドを指す。「誘導体」抗体の一例は、第2のポリペプチドまたは別の分子（例えば、PEG等のポリマー、発色団、またはフルオロフォア）または原子（例えば、放射性同位体）との融合体もしくは複合体である。

10

【0105】

「アミノ酸置換」という用語は、親配列中に存在するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置き換えることを指す。アミノ酸は、例えば、化学的ペプチド合成によるかまたは公知の組換え法により親配列内で置換することができる。したがって、「X位での置換」への言及または「X位での置換」とは、X位に存在するアミノ酸残基の代替アミノ酸残基での置換を指す。いくつかの実施形態では、置換パターンは、スキーマAXYに従って表すことができ、ここで、Aは、天然ではX位に存在するアミノ酸残基に対応する一文字表記であり、Yは、置換アミノ酸残基である。他の実施形態では、置換パターンは、スキーマXYに従って表すことができ、ここで、Yは、天然ではX位に存在するアミノ酸残基を置換するアミノ酸残基に対応する一文字表記である。

20

【0106】

「保存的アミノ酸置換」は、そのアミノ酸残基が、類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられている置換である。類似側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは以前に定義されており、これには、塩基性側鎖（例えば、Lys、Arg、His）、酸性側鎖（例えば、Asp、Glu）、電荷を持たない極性側鎖（例えば、Gly、Asp、Gln、Ser、Thr、Tyr、Cys）、非極性側鎖（例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、Trp）、ベータ-分岐側鎖（例えば、Thr、Val、Ile）及び芳香族側鎖（例えば、Tyr、Phe、Trp、His）が含まれる。したがって、ポリペプチド内のあるアミノ酸残基が同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基に置き換えられている場合、その置換は保存的であると見なされる。他の実施形態では、一連のアミノ酸残基は、順序及び/または組成が異なる、構造的に類似する一連の側鎖ファミリーメンバーに保存的に置き換えることができる。

30

【0107】

非保存的置換としては、(a) 正電荷側鎖を有する残基（例えば、Arg、His、またはLys）が、負電荷残基（例えば、GluまたはAsp）の代替となるか、もしくはそれにより置換されているもの、(b) 親水性残基（例えば、SerまたはThr）が、疎水性残基（例えば、Ala、Leu、Ile、Phe、またはVal）の代替となるか、もしくはそれにより置換されているもの、(c) CysまたはProが、他の任意の残基の代替となるか、もしくはそれにより置換されているもの、または(d) かさ高い疎水性もしくは芳香族の側鎖を有する残基（例えば、Val、His、Ile、またはTrp）が、より小さい側鎖を有する残基（例えば、AlaまたはSer）もしくは側鎖のない残基（例えば、Gly）の代替となるか、もしくはそれにより置換されているものが挙げられる。

40

【0108】

他の置換は容易に特定することができる。例えば、アミノ酸のアラニンの場合、置換は、D-Ala、Gly、ベータ-Ala、L-Cys及びD-Cysのいずれか1つから行うことができる。リジンの場合、置き換えは、D-Lys、Arg、D-Arg、ホモ-Arg、Met、D-Met、オミチン(omitine)、またはD-オルニチンのいずれか1つであり得る。一般に、単離されたポリペプチドの特性の変更を誘導することが予測され得る、機能的に重要な領域での置換は、(a) 極性残基（例えば、Serま

50

たはThr)が、疎水性残基(例えば、Leu、Ile、Phe、またはAla)の代替となる(またはそれにより置換されている)もの、(b)Cys残基が、他の任意の残基の代替となる(またはそれにより置換されている)もの、(c)正電荷側鎖を有する残基(例えば、Lys、Arg、またはHis)が、負電荷側鎖を有する残基(例えば、GluまたはAsp)の代替となる(またはそれにより置換されている)もの;または(d)かさ高い側鎖を有する残基(例えば、Phe)が、そのような側鎖を有しないもの(例えば、Gly)の代替となる(またはそれにより置換されている)もの。前述の非保存的置換のうちの1つがタンパク質の機能特性を変化させ得る可能性はまた、タンパク質の機能的に重要な領域に関して置換の位置とも関連し、そのため、一部の非保存的置換は、生物学的特性に対する影響がほとんどないか、またはまったくない場合がある。

10

【0109】

「アミノ酸挿入」という用語は、親配列中に存在する2つのアミノ酸残基の間に新たなアミノ酸残基を導入することを指す。アミノ酸残基は、親配列内に、例えば、化学的ペプチド合成によるかまたは当該技術分野で公知の組換え法により挿入することができる。したがって、「X位とY位の間での挿入」または「KabattによるX位とY位の間での挿入」という表現では、X及びYは、アミノ酸残基の位置に対応し(例えば、システインアミノ酸残基の239位と240位の間での挿入)、かかる表現は、X位とY位の間でのアミノ酸残基の挿入を指し、また、核酸配列において、あるアミノ酸残基をコードするコドン、X位のアミノ酸残基をコードするコドンとY位のアミノ酸残基をコードするコドン間に挿入することも指す。

20

【0110】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの2つの配列間の「配列同一性パーセント」または「同一性パーセント」という用語は、2配列間の最適アラインメントのために導入しなければならない付加または欠失(すなわち、ギャップ)を考慮に入れた、比較枠全体にわたってそれらの配列が共有する同一の一致位置の数を指す。一致位置は、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸が標的配列と参照配列の両方で提示されている任意の位置である。ギャップはヌクレオチドでもアミノ酸でもないため、標的配列で提示されているギャップは数えない。同様に、参照配列からのヌクレオチドまたはアミノ酸ではなく、標的配列のヌクレオチドまたはアミノ酸を数えるため、参照配列で提示されているギャップは数えない。配列同一性のパーセンテージは、両方の配列内で同一のアミノ酸残基または核酸塩基が生じる位置の数を決定して一致位置の数を得、その一致位置の数を比較枠内の位置総数で除し、その結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることにより計算することができる。配列比較及び2配列間の同一性パーセントの決定は、容易に利用可能なソフトウェアプログラムを使用して達成することができる。好適なソフトウェアプログラムは、様々な提供元から入手可能であり、タンパク質配列とヌクレオチド配列の両方に利用可能である。配列同一性パーセントを決定するための好適なプログラムの1つは、米国政府のNational Center for Biotechnology InformationのBLASTウェブサイト(blast.ncbi.nlm.nih.gov)から入手可能なプログラムのBLASTパッケージの一部である、`bl2seq`である。BL2seqは、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムを使用して2配列間の比較を実行する。BLASTNは核酸配列を比較するために使用され、BLASTPはアミノ酸配列を比較するために使用される。他の好適なプログラムは、例えば、バイオインフォマティクスプログラムのEMBOSSパッケージの一部であるNeedle、Stretcher、Water、またはMatcherであり、www.ebi.ac.uk/Tools/psaでEuropean Bioinformatics Institute(EBI)から入手することもできる。

30

40

【0111】

CDRまたはCDRのセットを保持させるための構造は一般に、抗体の重鎖配列もしくは軽鎖配列またはその実質的部分のものであり、CDRまたはCDRのセットは、再構成された免疫グロブリン遺伝子によりコードされる天然に存在するVH抗体可変ドメイン及

50

びV L抗体可変ドメインのC D RまたはC D Rのセットに対応する位置に位置する。免疫グロブリン可変ドメイン及びそれらのC D Rの構造及び位置は、プログラムを使用して当業者により容易に決定され得、C h o t h i a、C h o t h i a +、及びK a b a t等の既知の可変ドメイン残基番号付けシステムが、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるK a b a t (K a b a t e t a l., S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t, 4 t h E d i t i o n, U. S. D H H S, 1987、及びインターネット上で利用可能なツール(例えば、bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.html、及びimmuno.bme.nwu.eduにて))への参照により日常的に決定することができる。

10

【0112】

C D Rはまた、他の足場、例えば、フィブロネクチン、シトクロムB、アルブミン(例えば、A L B U d A b (D o m a n t i s / G S K)及びA L B - K u n i t z (D y a x))、3個または6個のアミノ酸の構造不定反復配列(例えば、P A S y l a t i o n (登録商標)技術及びX T E N (登録商標)技術)、及びエラスチン様反復ドメインを含む配列(例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第61/442,106号を参照のこと)等により保持させることもできる。

【0113】

実質的に本明細書に記載されるC D Rアミノ酸配列は、ヒト可変ドメインまたはその実質的部分にC D Rとして保持させることができる。実質的に本明細書に記載されるH C D R 3配列は、本開示の実施形態を表し、これらの各々は、ヒト重鎖可変ドメインまたはその実質的部分にH C D R 3として保持され得る。

20

【0114】

本開示で使用される可変ドメインは、どの生殖細胞系列または再構成されたヒト可変ドメインからも取得することができ、また既知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成可変ドメインでもあり得る。C D R配列(例えば、C D R 3)は、組換えDNA技術を使用して、C D R (例えば、C D R 3)を欠く可変ドメインのレパートリー内に導入することができる。

【0115】

例えば、M a r k sら(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、B i o / T e c h n o l o g y 10:779-783(1992))は、抗体可変ドメインのレパートリーを生成する方法を提供しており、抗体可変ドメインでは、可変ドメイン領域の5'末端またはそれに隣接して指向されたコンセンサスプライマーを、ヒトV H遺伝子の第3のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと併用して、C D R 3を欠くV H可変ドメインのレパートリーを得ている。M a r k sらはさらに、このレパートリーを特定の抗体のC D R 3と組み合わせることができる方法について記載している。類似の技術を使用して、本開示のC D R 3由来配列を、C D R 3を欠くV HドメインまたはV Lドメインのレパートリーとシャッフルし、シャッフルして完成したV HドメインまたはV Lドメインを同族のV LドメインまたはV Hドメインと合わせて抗原結合タンパク質を得ることができる。その後、レパートリーを、国際出願公開第W O 92/01047号、またはそれに続く、K a y e t a l., (1996) P h a g e D i s p l a y o f P e p t i d e s a n d P r o t e i n s: A L a b o r a t o r y M a n u a l, S a n D i e g o: A c a d e m i c P r e s s等の大量の文献のいずれかのファージディスプレイ系等の好適な宿主系に提示させて、好適な抗原結合タンパク質が選択され得るようにすることができる。レパートリーは、別個の104以上のメンバーから、例えば、 $10^6 \sim 10^8$ 、または 10^{10} のメンバーからのいずれからもあり得る。他の好適な宿主系としては、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、T7ディスプレイ、及びリボソームディスプレイが挙げられる。リボソームディスプレイの概説については、いずれも本明細書で参照することによりその全体が本明細書に組み込まれるL o w e e t a l., C u r r . P h a r m . B i o t e c h . 517-527(2004)及び国際出願公開

30

40

50

第WO92/01047号を参照のこと。類似のシャッフリングまたはコンビナトリアル技術がStemmer（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるNature 370:389-391(1994)）によっても開示されており、 β -ラクタマーゼ遺伝子との関連における技術を記載しているが、その手法が抗体作製に使用され得ることが観察されている。

【0116】

「抗原結合性領域」または「ABR」という用語は、抗原(Ag)を認識して結合する抗体内部の残基であるパトープを指す。ABRまたはABRのセットは一般に、抗体の重鎖配列もしくは軽鎖配列またはその実質的部分のものであり、ABRまたはABRのセットは、再構成された免疫グロブリン遺伝子によりコードされる天然に存在するVH抗体可変ドメイン及びVL抗体可変ドメインのABRまたはABRのセットに対応する位置に位置する。免疫グロブリン可変ドメイン及びそれらのABRの構造及び位置は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、プログラム及び既知の可変ドメイン残基番号付けシステム及びインターネット上で利用可能なツールを使用して、当業者により容易に決定され得る（例えば、Kunik V., et al., Nucleic Acids Res. 2012 Jul; 40）。

【0117】

ActRII結合性タンパク質（例えば、抗ActRIIA抗体及び抗ActRIIB抗体）は、それが、ActRII（例えば、それぞれActRIIB及び/またはActRIIA）との参照分子の結合をある程度阻止する範囲でActRIIに結合する場合、ActRIIへの結合に対して参照分子と「競合する」と言われる。タンパク質が、ActRIIへの結合に対して競合し、そのためActRIIへの結合を互いに妨げる、阻止する、または「交差阻止する」能力は、例えば、競合ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴（SPR; BIAcore（登録商標）、Biosensor, Piscataway, N.J.）またはScatchard et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672(1949))により記載されている方法に従うものを含め、当該技術分野で公知の任意の標準的競合結合アッセイにより決定することができる。ActRII結合性タンパク質は、ActRIIに対する参照分子の結合を、例えば、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害すると言われ得る。いくつかの実施形態によれば、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIAに対する参照分子の結合を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害する。他の実施形態によれば、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBに対する参照分子の結合を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害する。

【0118】

ActRII結合性タンパク質

ActRIIと特異的に結合するタンパク質が提供される。「ActRII」という用語は、アクチビン受容体IIA型(ActRIIA)及び/またはアクチビン受容体IIB型(ActRIIB)を指す。

【0119】

本明細書で使用される場合、「ActRIIA」という用語は、任意の種からのアクチビン受容体IIA型タンパク質及びそのようなActRIIAタンパク質から変異誘発または他の修飾によって誘導されたバリエーションのファミリーを指す。本明細書でのActRIIAへの言及は、現在同定されている形態のいずれか1つへの言及であると理解される。ActRIIAファミリーのメンバーは一般に膜貫通タンパク質であり、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質セリン-トレオニンキナーゼドメインで構成される。ヒトActRIIAには、天然に存在する様々なアイソフォームがある。標準ヒトActRIIAアイソフォーム1前駆体タンパク質の配列(NCBI参照配列NP_001265508.1)は、以下のとおりである：

【化 1】

1 MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC
 61 FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
 121 EVTQPTSNPV TPKPPYNIL LYSLVPLMLI AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP
 181 PPSPLLGLK PLQLLEVkar GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG
 241 MKHENILQFI GAEKRGTSD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
 301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLACIAD FGLALKFEAG KSAGDTHGQV
 361 GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR CTAADGPVDE YMLPFEIEIG
 421 QHPSLEDMQE VVHKKKRPV LRDYWQKHAG MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT
 481 QMQRLTNIIT TEDITVVTM VTNVDFPPKE SSL

(配列番号 9 2)。

10

シグナルペプチドは一重下線で示され、細胞外ドメインは太字フォントで示されている。

【0120】

本明細書で使用される場合、「ActRIIB」という用語は、任意の種からのアクチビン受容体 IIB 型タンパク質及びそのような ActRIIB タンパク質から変異誘発または他の修飾によって誘導されたバリエーションのファミリーを指す。本明細書での ActRIIA への言及は、現在同定されている形態のいずれか 1 つへの言及であると理解される。ActRIIB ファミリーのメンバーは一般に膜貫通タンパク質であり、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質セリン - トレオニンキナーゼドメインで構成される。ヒト ActRIIB には、天然に存在する様々なアイソフォームがある。標準ヒト ActRIIB アイソフォーム 1 前駆体タンパク質の配列 (NCBI 参照配列 NP_001097.2) は、以下のとおりである：

20

【化 2】

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE GEQDKRLHCY
 61 ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG
 121 GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP
 181 PSPLVGLKPL QLLEIKARGR FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK
 241 HENLLQFIAA EKRGSNLEVE LWLLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELCHV AETMSRGLSY
 301 LHEDVPCWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK PPGDTHGQVG
 361 TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC KAADGPVDEY MLPFEIEIGQ
 421 HPSLEELQEV VVHKKMRPTI KDHWLKHPGL AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL
 481 IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV TNVDLPPKES SI

30

(配列番号 9 3)。

シグナルペプチドは一重下線で示され、細胞外ドメインは太字フォントで示されている。

【0121】

いくつかの実施形態では、ActRII 結合性タンパク質は、TGF-β 受容体ファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する ActRII 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で ActRII と結合する。ある特定の実施形態では、ActRII 結合性タンパク質は ActRII と結合し、解離定数 (K_D) が 1 μ M 未満、100 nM 未満、10 nM 未満、1 nM 未満、0.1 nM 未満、10 pM 未満、1 pM 未満、または 0.1 pM 未満である。いくつかの実施形態では、ActRII 結合性タンパク質は、ヒト ActRII に対する K_D が 1 μ M 以下かつ 0.1 pM 以上、100 μ M 以下かつ 0.1 pM 以上、または 100 μ M 以下かつ 1 pM 以上の範囲内である。

40

【0122】

いくつかの実施形態では、ActRII 結合性タンパク質 (例えば、抗 ActRII 抗体) が、参照 ActRII 結合性タンパク質 (例えば、抗 ActRII 抗体) による ActRII タンパク質への結合と競合/結合を阻止する能力を決定するために BIACOR

50

E（登録商標）分析が使用される。B I A C O R E（登録商標）装置（例えば、B I A C O R E（登録商標）3000）を、製造者の推奨事項に従って操作するさらなる態様では、A c t R I I - F c 融合タンパク質は、事前に結合させた抗 n i F c I g G により、C M 5 B I A C O R E（登録商標）チップに捕捉され、A c t R I I でコートされた表面が生成される。典型的には、200～800レゾナンスユニットのA c t R I I - F c（二量体）がチップに結合されると考えられる（測定可能なレベルの結合が容易に得られるが、使用される試験試薬の濃度により容易に飽和可能な量）。

【0123】

互いに競合／阻止する能力についての評価対象である2つのA c t R I I 結合性タンパク質（A*及びB*と称する）を、好適な緩衝液中で結合部位のモル比を1対1にして混合し、試験混合物を作製する。結合部位に基づいて濃度を計算する場合、A c t R I I 結合性タンパク質の分子量は、A c t R I I 結合性タンパク質の総分子量を、そのA c t R I I 結合性タンパク質上のA c t R I I 結合部位数で除したものであると想定する。試験混合物中の各A c t R I I 結合性タンパク質（すなわち、A*及びB*）の濃度は、B I A C O R E（登録商標）チップに捕捉されたA c t R I I - F c 分子上のそのA c t R I I 結合性タンパク質に対する結合部位が容易に飽和するよう十分に高くあるべきである。混合物中のA c t R I I 結合性タンパク質のA*及びB*は、（結合に基づいて）同じモル濃度であり、その濃度は典型的には（結合部位に基づいて）1.00～1.5マイクロモルであろう。A c t R I I 結合性タンパク質A*単独及びA c t R I I 結合性タンパク質B*単独を含有する別々の溶液もまた調製される。これらの溶液中のA c t R I I 結合性タンパク質A*及びA c t R I I 結合性タンパク質B*は、試験混合物中のように同じ緩衝液中で同じ濃度であるべきである。試験混合物をA c t R I I - F c でコートしたB I A C O R E（登録商標）チップ上に通し、結合総量を記録する。次いで、チップに結合したA c t R I I - F c を損傷することなく結合したA c t R I I 結合性タンパク質が除去されるようチップを処理する。典型的には、これは、チップを30mMのHClで60秒間処理することにより行われる。次いで、A c t R I I 結合性タンパク質A*単独の溶液を、A c t R I I - F c でコートした表面に通し、結合量を記録する。チップに結合したA c t R I I - F c を損傷することなく結合した抗体が除去されるようチップを再度処理する。次いで、A c t R I I 結合性タンパク質B*単独の溶液をA c t R I I - F c でコートした表面に通し、結合量を記録する。A c t R I I 結合性タンパク質A*とA c t R I I 結合性タンパク質B*の混合物の理論的最大結合を次に計算するが、これは、A c t R I I 表面を単独に通した際の各A c t R I I 結合性タンパク質の結合の和である。混合物の実際に記録された結合がこの理論的最大値より小さい場合は、2つのA c t R I I 結合性タンパク質は互いに競合／阻止しあっている。したがって、一般に、阻止性A c t R I I 結合性タンパク質は、上記B I A C O R E（登録商標）阻止アッセイにおいて、アッセイ中及び第2のA c t R I I 結合性タンパク質の存在下で、記録された結合が、組み合わせた2つのA c t R I I 結合性タンパク質の理論的最大結合（上記で定義したとおり）の80%～0.1%（例えば、80%未満～4%）、具体的には理論的最大結合の75%～0.1%（例えば、75%～4%）、より具体的には理論的最大結合の70%～0.1%（例えば、70%～4%）となるようにA c t R I I に結合するものである。

【0124】

上記のB I A C O R E（登録商標）アッセイは、抗A c t R I I 抗体等の2つA c t R I I 結合性タンパク質が、A c t R I I への結合に対して互いに競合／結合を阻止しあうかどうかを決定するために使用される例示的アッセイである。まれに、特定のA c t R I I 結合性タンパク質は、抗F c I g G を介してC M 5 B I A C O R E（登録商標）チップに結合されているA c t R I I - F c に結合しない場合がある（これは、F c へのA c t R I I の連結によってA c t R I I 上の関連結合部位が遮蔽または破壊されている場合に起こり得る）。そのような場合には、A c t R I I のタグ付きバージョン、例えば、C 末端にH i s タグを付けたA c t R I I を使用して阻止を決定することができる。この特定のフォーマットでは、抗H i s 抗体をB I A C O R E（登録商標）チップに結合させ、

その後、Hisタグ付きActRIIをチップ表面上に通し、抗His抗体により捕捉させることとなる。本質的には上記のように交差阻止分析が行われるが、ただし、各チップ再生サイクルの後、抗His抗体でコートされた表面に再び新たなHisタグ付きActRIIをロードすることとなる。さらに、そのような阻止分析には他の様々な既知のタグとタグ結合性タンパク質の組み合わせを使用することができる（例えば、HAタグと抗HA抗体；FLAGタグと抗FLAG抗体；ビオチンタグとストレプトアビジン）。以下に、ActRII結合性タンパク質が、ActRIIに対する参照ActRII結合性タンパク質の結合を阻止するのか、または阻止する能力があるのかどうかを決定するためのELISAアッセイを概説する。

【0125】

いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質（例えば、抗ActRII抗体）が、ActRIIタンパク質への結合に対して参照ActRII結合性タンパク質（例えば、抗ActRII抗体またはActRIIリガンド）と競合する能力を決定するためにELISAが使用される。そのようなアッセイの一般原理は、参照ActRII結合性タンパク質（例えば、抗ActRII抗体）をELISAプレートのウェルにコートすることである。過剰量の潜在的に阻止性の第2の被験ActRII結合性タンパク質を溶液中加入する（すなわち、ELISAプレートには結合していない）。次いで、限られた量のActRII（または別法としてActRII-Fc）をウェルに加える。コートされた参照ActRII結合性タンパク質と溶液中の被験ActRII結合性タンパク質は、限られた数のActRII（またはActRII-Fc）分子の結合に対して競合する。プレートを洗浄して、コートされた参照ActRII結合性タンパク質が結合していないActRIIを除去し、また、液相の被験ActRII結合性タンパク質、及び液相の被験ActRII結合性タンパク質とActRIIとの間で形成された複合体も除去する。次いで、結合したActRIIの量を、適切なActRII検出試薬を使用して測定する。コートされた参照ActRII結合性タンパク質のActRIIへの結合を阻止することができる溶液中の被験ActRII結合性タンパク質は、コートされた参照ActRII結合性タンパク質が第2の液相の被験ActRII結合性タンパク質の非存在下で結合することができるActRII分子の数と比べて、コートされた参照ActRII結合性タンパク質が結合することができるActRII分子の数の減少を引き起こすことができる。アッセイのバックグラウンドシグナルは、コートされた参照ActRII結合性タンパク質、液相の被験ActRII結合性タンパク質、ActRII緩衝液のみ（すなわち、ActRIIなし）及びActRII検出試薬を含むウェルで得られるシグナルと定義される。アッセイの陽性対照シグナルは、コートされた参照ActRII結合性タンパク質、液相の被験ActRII結合性タンパク質緩衝液のみ（すなわち、液相被験ActRII結合性タンパク質なし）、ActRII及びActRII検出試薬を含むウェルで得られるシグナルと定義される。ELISAアッセイは、バックグラウンドシグナルの少なくとも3倍の陽性対照シグナルが得られるように実行される。方法上のアーチファクトの対照として、交差阻止アッセイを上述の形式で実行しても、またその逆で、コートされた抗体として被験ActRII結合性タンパク質を用い、液相抗体として参照ActRII結合性タンパク質を用いて実行してもよい。

【0126】

いくつかの実施形態では、レポーター遺伝子アッセイは、ActRII結合性タンパク質（例えば、抗ActRII抗体）が、ActRII（例えば、ActRIIB）を中和する能力を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、レポーター遺伝子アッセイは、ActRII結合性タンパク質（例えば、抗ActRII抗体）がActRII（例えば、ActRIIB）活性を中和する能力を決定するために、組換えA204細胞を使用して実施される。このアッセイは、(CAGA)12モチーフを含有するpGL3(CAGA)12プラスミド（例えば、その各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれるDennler et al., EMBO 17:3091-3100(1998)）及び米国特許第8,765,385号を参照のこと）及び導入効率を確認するためのR

10

20

30

40

50

e n i U a レポータープラスミド (p R L C M V) を導入したヒト横紋筋肉腫細胞株に基づく。C A G A 1 2 モチーフは、T G F - ベータ応答性遺伝子 (P A I - 1 遺伝子) に存在するので、このベクターは、S m a d 2 及び S m a d 3 を介してシグナル伝達する因子に一般に使用するものである。このアッセイを使用して候補タンパク質の A c t R I I B 結合活性を測定することに関しては、A 2 0 4 細胞株は主に A c t R I I B よりむしろ A c t R I I A を発現することから、A c t R I I B を中和する潜在的能力について抗体を直接試験することは不可能である。その代わりに、被験 A c t R I I タンパク質結合候補が、A c t R I I B と A c t R I I A の両方に高親和性で結合することができるリガンド (アクチピン A または G D F 1 1 等) による内在性 A c t R I I A の活性化に対する可溶性融合タンパク質 A c t R I I B - F c の抑制効果を中和する能力を検出するよう、このアッセイを設計する。したがって、このアッセイでは、A c t R I I B 結合性が中和している場合、A c t R I I B - F c の存在にもかかわらずリガンド媒介性の A c t R I I A 活性化が起こる。

10

【 0 1 2 7 】

アッセイの第 1 日目、A 2 0 4 細胞 (A T C C H T B - 8 2) を、ウェルあたり 1.0×10^5 細胞で 48 ウェルプレートに入れる。第 2 日目、 $10 \mu\text{g}$ の p G L 3 (C A G A) 1 2 、 $1 \mu\text{g}$ の p R L C M V 、 $30 \mu\text{l}$ の F u g e n e 6 (R o c h e D i a g n o s t i c s) 、及び $970 \mu\text{l}$ の O p t i M E M (I n v i t r o g e n) を含有する溶液を 30 分間プレインキュベートしてからマッコイ増殖培地に加え、それを、播種した細胞に加え ($500 \mu\text{l}$ / ウェル) 室温で一晩のインキュベーションに供する。第 3 日目、培地を除去し、細胞を、下記のように調製したリガンドと阻害剤の混合物と共に 37 で 6 時間インキュベートする。

20

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態によれば、抗 A c t R I I 抗体等の A c t R I I 結合性タンパク質の中和能力を評価し、それにより、被験タンパク質の系列希釈を 48 ウェルプレートに $200 \mu\text{l}$ の体積のアッセイ緩衝液 (マッコイ培地 + 0 . 1 % B S A) で作製する。候補タンパク質の A c t R I I B 活性中和能を評価するアッセイの場合、その後、等容量の A c t R I I B - F c ($200 \mu\text{g} / \text{ml}$) 含有アッセイ緩衝液を加える。被験溶液を 37 で 30 分間インキュベートし、次いで、 $400 \mu\text{l}$ のアクチピン A ($10 \text{ng} / \text{ml}$) を全ウェルに加え、この混合物のうち $350 \mu\text{l}$ を A 2 0 4 細胞の 48 ウェルプレートの各ウェルに加える。各濃度の被験タンパク質を 2 連で試験する。候補タンパク質の A c t R I I B 活性中和能を評価するアッセイの場合、A c t R I I B - F c の最終濃度は $50 \text{ng} / \text{ml}$ である (これは、アクチピン A の最終濃度が $5 \text{ng} / \text{ml}$ の場合のこのアクチピン A シグナル伝達阻害剤の I C ₅₀ である) 。被験溶液との 6 時間のインキュベーション後、細胞を、0 . 1 % B S A を含有するリン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、次いで受動的溶解バッファー (P r o m e g a E 1 9 4 1) で溶解し、- 7 0 で一晩保存する。第 4 日目及び最終日、穏やかに振盪しながらプレートを室温まで温める。細胞ライセートを化学発光プレート (96 ウェル) に 2 連で移し、D u a l - L u c i f e r a s e R e p o r t e r A s s a y システム (P r o m e g a E 1 9 8 0) 製試薬を用いてルミノメーターで分析し、正規化ルシフェラーゼ活性を決定する。

30

40

【 0 1 2 9 】

A c t R I I B シグナル伝達に依存する薬力学的パラメータは、A c t R I I B を中和して治療的利益を提供することができる結合性タンパク質を同定するために、A c t R I I B 結合性タンパク質のインビボ試験のエンドポイントとして測定され得る。A c t R I I B 中和結合物質は、ビヒクルで処置された動物と比較して、そのような薬力学的パラメータの統計学的に有意な変化を生じさせることができるものと定義される。そのようなインビボ試験は、任意の好適な哺乳類 (例えば、マウス、ラット、またはサル) で実施することができる。

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、T G F - ベータ受容体フ

50

ファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する $ActRII$ 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で $ActRIIA$ と結合する。追加の実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、 TGF -ベータ受容体ファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する $ActRII$ 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で $ActRIIA$ と結合する。ある特定の実施形態では、 $ActRIIA$ 結合性タンパク質は $ActRIIA$ と結合し、解離定数 (K_D) が $1\mu M$ 未満、 $100nM$ 未満、 $10nM$ 未満、 $1nM$ 未満、 $0.1nM$ 未満、 $10pM$ 未満、 $1pM$ 未満、または $0.1pM$ 未満である。いくつかの実施形態では、 $ActRIIA$ 結合性タンパク質は、ヒト $ActRIIA$ に対する K_D が $1\mu M$ 以下かつ $0.1pM$ 以上、 $100\mu M$ 以下かつ $0.1pM$ 以上、または $100\mu M$ 以下かつ $1pM$ 以上の範囲内である。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、 TGF -ベータファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する $ActRII$ 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で $ActRIIB$ と結合する。追加の実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、 TGF -ベータ受容体ファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する $ActRII$ 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で $ActRIIB$ と結合する。ある特定の実施形態では、 $ActRIIB$ 結合性タンパク質は $ActRIIB$ と結合し、解離定数 (K_D) が $1\mu M$ 未満、 $100nM$ 未満、 $10nM$ 未満、 $1nM$ 未満、 $0.1nM$ 未満、 $10pM$ 未満、 $1pM$ 未満、または $0.1pM$ 未満である。いくつかの実施形態では、 $ActRIIB$ 結合性タンパク質は、ヒト $ActRIIB$ に対する K_D が $1\mu M$ 以下かつ $0.1pM$ 以上、 $100\mu M$ 以下かつ $0.1pM$ 以上、または $100\mu M$ 以下かつ $1pM$ 以上の範囲内である。

20

【0132】

いくつかの実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、 TGF -ベータファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する $ActRII$ 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で $ActRIIB$ 及び $ActRIIA$ と結合する。追加の実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、 TGF -ベータ受容体ファミリーメンバーではない対照タンパク質に対する $ActRII$ 結合性タンパク質の親和性より少なくとも 100 倍、500 倍、または 1000 倍大きい親和性で $ActRIIB$ 及び $ActRIIA$ と結合する。ある特定の実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は $ActRIIB$ 及び $ActRIIA$ と結合し、解離定数 (K_D) が $1\mu M$ 未満、 $100nM$ 未満、 $10nM$ 未満、 $1nM$ 未満、 $0.1nM$ 未満、 $10pM$ 未満、 $1pM$ 未満、または $0.1pM$ 未満である。いくつかの実施形態では、 $ActRIIA$ - 及び $ActRIIB$ 結合性タンパク質は、ヒト $ActRIIB$ 及び $ActRIIA$ に対する K_D が $1\mu M$ 以下かつ $0.1pM$ 以上、 $100\mu M$ 以下かつ $0.1pM$ 以上、または $100\mu M$ 以下かつ $1pM$ 以上の範囲内である。

30

【0133】

いくつかの実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、 $ActRII$ と特異的に結合する抗体である。追加の実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質は、完全長抗 $ActRIIA$ 抗体または完全長抗 $ActRIIB$ 抗体である。追加の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、またはその $ActRII$ 結合性抗体断片である。追加の実施形態では、抗体は、 $ActRIIB$ 及び / または $ActRIIA$ と特異的に結合する。

40

【0134】

いくつかの実施形態では、 $ActRII$ 結合性タンパク質 (例えば、抗 $ActRII$ 抗体及び $ActRII$ 結合性抗体断片) は、種を超えて $ActRII$ 分子に結合することができる。

【0135】

50

ヒトA c t R I I Aの成熟A c t R I I A細胞外ドメイン（配列番号92のアミノ酸20～138）は、マウスA c t R I I Aオルソログ（参照P27038）のそれとは、2つの保存されたアミノ酸置換（すなわち、K19R及びV72I）のみが異なっている。追加の実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、ヒトA c t R I I A（hA c t R I I A）及びマウスA c t R I I A（murA c t R I I A）に結合することができる。ある特定の実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、抗A c t R I I A抗体（例えば、完全長A c t R I I A抗体及びA c t R I I A結合性抗体断片、ならびにそのバリエーションと誘導体）は、A c t R I I A（例えば、hA c t R I I AまたはmurA c t R I I A）に特異的に結合することができ、B I A C O R E（登録商標）またはK I N E X A（登録商標）で決定した場合に解離定数または K_D が 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、または 10^{-10} M未満である。さらなる実施形態では、抗A c t R I I A抗体は、A c t R I I Aに1 nM未満の K_D で結合する（例えば、B I A C O R E（登録商標）分析により決定した場合）。さらなる実施形態では、抗A c t R I I A抗体は、A c t R I I Aに、1 nMの1桁分以内または1 nMの2桁分以内の K_D で結合する。いくつかの実施形態では、A c t R I I A結合性タンパク質は、ヒトA c t R I I Aに対する K_D が $1 \mu M$ 以下かつ $0.1 pM$ 以上、 $100 \mu M$ 以下かつ $0.1 pM$ 以上、または $100 \mu M$ 以下かつ $1 pM$ 以上の範囲内である。

【0136】

ヒトA c t R I I Bの成熟細胞外ドメイン（配列番号93のアミノ酸19～130）は、マウスA c t R I I Bオルソログ（NCBI参照配列NP031423）の対応する配列とは1つのアミノ酸置換（すなわち、A95P）が異なっている。ある特定の実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、B I A C O R E（登録商標）またはK I N E X A（登録商標）で決定した場合に 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、もしくは 10^{-10} M未満の解離定数または K_D でA c t R I I B（例えば、hA c t R I I B及びmurA c t R I I B）と特異的に結合する抗A c t R I I B抗体（例えば、完全長A c t R I I B抗体及びA c t R I I B結合性抗体断片、ならびにそのバリエーションと誘導体）である。さらなる実施形態では、抗A c t R I I B抗体は、B I A C O R E（登録商標）またはK I N E X A（登録商標）分析で決定した場合に1 nM未満の K_D でA c t R I I Bに結合する。さらなる実施形態では、抗A c t R I I B抗体は、1 nMの1桁分以内または1 nMの2桁分以内の K_D でA c t R I I Bと結合する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B結合性タンパク質は、ヒトA c t R I I Bに対する K_D が $1 \mu M$ 以下かつ $0.1 pM$ 以上、 $100 \mu M$ 以下かつ $0.1 pM$ 以上、または1 nM以下かつ $1 pM$ 以上の範囲内である。

【0137】

いくつかの実施形態では、抗A c t R I I抗体は、A c t R I I結合性抗体断片である。いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性抗体断片は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v断片、ダイアボディ、または一本鎖抗体分子である。追加の実施形態では、A c t R I I抗体は、F d、一本鎖F v (s c F v)、ジスルフィド結合したF v、V - N A Rドメイン、I g N a r、細胞内抗体、I g G Δ C H 2、ミニボディ、F (a b')₃、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、単ドメイン抗体、D V D - I g、F c a b、m A b²、(s c F v)₂、s c F v - F cまたはビス - s c F vである。

【0138】

追加の実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、V H及びV Lが含まれている抗体である。いくつかの実施形態では、抗A c t R I I抗体にはさらに、重鎖定常領域またはその断片が含まれている。いくつかの実施形態では、抗体は、(a)ヒトI g A定常領域、またはその断片、(b)ヒトI g D定常領域、またはその断片、(c)ヒトI g E定常ドメイン、またはその断片、(d)ヒトI g G 1定常領域、またはその断片、(e)ヒトI g G 2定常領域、またはその断片、(f)ヒトI g G 3定常領域、またはその断片、(g)ヒトI g G 4定常領域、またはその断片、及び(h)ヒトI g M定常領域、またはその断片からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常領域を含む。ある特定の实

10

20

30

40

50

施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、重鎖定常領域またはその断片、例えば、ヒト I g G 定常領域またはその断片を含む。さらなる実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、エフェクター機能及び/または半減期が変化しているかもしくは変化するよう変異させてある重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【0139】

特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、エフェクター機能を低下させる変異を含有している I g G 1 重鎖定常領域を含む抗体である（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、I d u s o g i e e t a l . , J . I m m u n o l . 1 6 6 : 2 5 7 1 - 2 5 7 5 (2 0 0 1) 、 S a z i n s k y e t a l . , P N A S U S A 1 0 5 : 2 0 1 6 7 - 2 0 1 7 2 (2 0 0 8) 、 D a v i s e t a l . , J . R h e u m a t o l . 3 4 : 2 2 0 4 - 2 2 1 0 (2 0 0 7) 、 B o l t e t a l . , E u r . J . I m m u n o l . 2 3 : 4 0 3 - 4 1 1 (1 9 9 3) 、 A l e g r e e t a l . , T r a n s p l a n t a t i o n 5 7 : 1 5 3 7 - 1 5 4 3 (1 9 9 4) 、 X u e t a l . , C e l l I m m u n o l . 2 0 0 : 1 6 - 2 6 (2 0 0 0) 、 C o l e e t a l . , T r a n s p l a n t a t i o n 6 8 : 5 6 3 - 5 7 1 (1 9 9 9) 、 H u t c h i n s e t a l . , P N A S U S A 9 2 : 1 1 9 8 0 - 1 1 9 8 4 (1 9 9 5) 、 R e d d y e t a l . , J . I m m u n o l . 1 6 4 : 1 9 2 5 - 1 9 3 3 (2 0 0 0) ; W O 9 7 / 1 1 9 7 1 、及び W O 0 7 / 1 0 6 5 8 5 ; 米国出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 4 8 1 6 7 A 1 号 ; M c E a r c h e r n e t a l . , B l o o d 1 0 9 : 1 1 8 5 - 1 1 9 2 (2 0 0 7) 、 S t r o h l , C u r r . O p . B i o t e c h n o l . 2 0 : 6 8 5 - 6 9 1 (2 0 0 9) 、及び K u m a g a i e t a l . , J . C l i n . P h a r m a c o l . 4 7 : 1 4 8 9 - 1 4 9 7 (2 0 0 7) を参照のこと）。

【0140】

いくつかの実施形態では、重鎖定常領域またはその断片には、野生型 I g G 定常ドメインに対する 1 つ以上のアミノ酸置換が含まれ、その修飾された I g G は、野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の半減期と比較して A D C C が低下している。A D C C を低下させる提供抗体内に含有される F c 配列操作修飾の例としては、I g G 1 - K 3 2 6 W 、 E 3 3 3 S ; I g G 2 - E 3 3 3 S ; I g G 1 - N 2 9 7 A ; I g G 1 - L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A ; I g G 2 - V 2 3 4 A 、 G 2 3 7 A ; I g G 4 - L 2 3 5 A 、 G 2 3 7 A 、 E 3 1 8 A ; I g G 4 - S 2 2 8 P 、 L 2 3 6 E ; I g G 2 - E U 配列の 1 1 8 ~ 2 6 0 ; I g G 4 - E U 配列の 2 6 1 ~ 4 4 7 ; I g G 2 - H 2 6 8 Q 、 V 3 0 9 L 、 A 3 3 0 S 、 A 3 3 1 S ; I g G 1 - C 2 2 0 S 、 C 2 2 6 S 、 C 2 2 9 S 、 P 2 3 8 S ; I g G 1 - C 2 2 6 S 、 C 2 2 9 S 、 E 2 3 3 P 、 L 2 3 4 V 、 L 2 3 5 A ; 及び I g G 1 - L 2 3 4 F 、 L 2 3 5 E 、 P 3 3 1 S に対応する 1 つ以上の修飾が挙げられ、位置の番号付けは K a b a t の場合同様、E U インデックスに従っている。

【0141】

ある特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、C D C 活性が低下しているかまたは低下するよう変異させてある重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、C D C 活性を低下させる変異を含有している I g G 1 重鎖定常領域を含む抗体である（例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、W O 9 7 / 1 1 9 7 1 及び W O 0 7 / 1 0 6 5 8 5 、米国出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 4 8 1 6 7 A 1 号、M c E a r c h e r n e t a l . , B l o o d 1 0 9 : 1 1 8 5 - 1 1 9 2 (2 0 0 7) 、H a y d e n - L e d b e t t e r e t a l . , C l i n . C a n c e r 1 5 : 2 7 3 9 - 2 7 4 6 (2 0 0 9) 、L a z a r e t a l . , P N A S U S A 1 0 3 : 4 0 0 5 - 4 0 1 0 (2 0 0 6) 、B r u c k h e i m e r e t a l . , N e o p l a s i a 1 1 : 5 0 9 - 5 1 7 (2 0 0 9) 、S t r o h l , C u r r . O p . B i o t e c h n o l . 2 0 : 6 8 5 - 6 9 1 (2 0 0 9) 、及び S a z i n s k y e t a l . , P N A S U S A 1 0 5 : 2 0 1 6 7 - 2 0 1 7 2 (2 0 0 8) を参照のこと）。C D C を低下させる抗 A c t R I I 抗体内に含有さ

10

20

30

40

50

れるFc配列操作修飾の例としては、IgG1-S239D、A330L、I332E；IgG2-EU配列の118～260；IgG4-EU配列の261～447；IgG2-H268Q、V309L、A330S、A331S；IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A；IgG1-L234F、L235E、P331S；及びIgG1-C226S、P230Sに対応する1つ以上の修飾が挙げられる。
【0142】

さらなる実施形態では、重鎖定常領域またはその断片には、野生型IgG定常ドメインに対する1つ以上のアミノ酸置換が含まれ、その修飾されたIgGは、野生型IgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して半減期が長い。例えば、IgG定常ドメインは、251～257位、285～290位、308～314位、385～389位、及び428～436位におけるアミノ酸残基の1つ以上のアミノ酸置換を含有することができ、ここで、アミノ酸位置の番号付けは、Kabattに記載されているEUインデックスに従って行われる。ある特定の実施形態では、IgG定常ドメインは、Kabatt位置252位のアミノ酸のTyr、Phe、Trp、もしくはThrによる置換；Kabatt位置254位のアミノ酸のThrによる置換；Kabatt位置256位のアミノ酸のSer、Arg、Gln、Glu、Asp、もしくはThrによる置換；Kabatt位置257位のアミノ酸のLeuによる置換；Kabatt位置309位のアミノ酸のProによる置換；Kabatt位置311位のアミノ酸のSerによる置換；Kabatt位置428位のアミノ酸のThr、Leu、Phe、もしくはSerによる置換；Kabatt位置433位のアミノ酸のArg、Ser、Iso、Pro、もしくはGlnによる置換；またはKabatt位置434位のアミノ酸のTrp、Met、Ser、His、Phe、もしくはTyrによる置換のうちの1つ以上を含有することができる。具体的には、IgG定常ドメインは、Kabatt位置252位のアミノ酸のTyrによる置換、Kabatt位置254位のアミノ酸のThrによる置換、及びKabatt位置256位のアミノ酸のGluによる置換を含め、野生型ヒトIgG定常ドメインに対するアミノ酸置換を含有することができる。

【0143】

追加の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、軽鎖免疫グロブリン定常領域を含む抗体である。さらなる実施形態では、抗体は、ヒトIgG定常領域またはヒトIgラムダ定常領域を含む。

【0144】

本開示は、アクチビン受容体II型(ActRII)結合性タンパク質及びかかるActRII結合性タンパク質を使用する方法を提供する。特定の実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIが1つ以上の同族ActRIIリガンド及び/または1つ以上の同族ActRI受容体に結合することを阻害もしくは阻止する能力がある。いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIがActRIIリガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、GDF1、GDF3、GDF8(ミオスタチン)、GDF11、BMP6、BMP7、BMP9、またはBMP10)に結合することを阻害または阻止する能力がある。本開示はまた、ActRII発現及び/またはActRII媒介性シグナル伝達上昇と関連する疾患もしくは状態の診断、もしくは治療、予防及び/または改善のためのActRII結合性タンパク質を使用する方法も提供する。そのような疾患または状態としては、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態；炎症性、自己免疫、心血管、肺、筋骨格、骨格、眼、神経、もしくは代謝性の疾患または状態；肥満；創傷治癒；及びがんが挙げられるが、これらに限定されない。

【0145】

いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合する。さらなる実施形態では、提供されるActRII結合性タンパク質は、ActRIIBと特異的に結合し、(a)ActRIIBへの結合に対してActRIIリガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、GDF1、GDF3、GDF8(ミオスタ

10

20

30

40

50

チン)、G D F 1 1、B M P 6、B M P 7、B M P 9、またはB M P 1 0)と競合する、
(b) A c t R I I Bリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8(ミオスタチン))の存在下で、A c t R I I Bと、A L K 4及び/またはA L K 7とを発現している細胞でのA L K 4及び/またはA L K 7のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I Bリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8)の存在下で、A c t R I I Bを発現している細胞でのS m a d(例えば、S m a d 2及び/またはS m a d 3)のリン酸化を減少させる、及び(d) A c t R I I Bに、1 n M以下かつ1 p M以上のK_D(例えば、B I A C O R E(登録商標)分析により決定した場合)で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B結合性タンパク質は、上記の特性のうち2つ、3つ、または4つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも2つまたは少なくとも3つを有する。さらなる実施形態では、A c t R I I B結合性タンパク質は、A c t R I I Bへの結合に対して、本明細書に開示されるA c t R I I B結合性のV HとV Lの対を有する抗体と競合する。さらなる実施形態では、A c t R I I B結合性タンパク質は、抗A c t R I I B抗体またはA c t R I I B結合性抗体断片である。

【0146】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと特異的に結合する。さらなる実施形態では、提供されるA c t R I I結合性タンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと特異的に結合し、(a) A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aへの結合に対して、A c t R I Iリガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、G D F 1、G D F 3、G D F 8(ミオスタチン)、G D F 1 1、B M P 6、B M P 7、B M P 9、またはB M P 1 0)と競合する、(b) A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aのリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8(ミオスタチン))の存在下で、A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aと、A L K 4及び/またはA L K 7とを発現している細胞でのA L K 4及び/またはA L K 7のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aのリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8)の存在下で、A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aを発現している細胞でのS m a d(例えば、S m a d 2及び/またはS m a d 3)のリン酸化を減少させる、及び(d) A c t R I I Bに、1 n M以下かつ1 p M以上のK_D(例えば、B I A C O R E(登録商標)分析により決定した場合)で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B及びA c t R I I A結合性のタンパク質は、上記の特性のうち2つ、3つ、または4つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I B及びA c t R I I A結合性のタンパク質は、上記の特性のうち少なくとも2つまたは少なくとも3つを有する。さらなる実施形態では、A c t R I I B結合性タンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aへの結合に対して、本明細書に開示されるA c t R I I B及びA c t R I I Aと結合するV HとV Lの対を有する抗体と競合する。さらなる実施形態では、A c t R I I B及びA c t R I I A結合性のタンパク質は、抗A c t R I I BとA c t R I I Bの抗体であるかまたはA c t R I I B抗体断片及びA c t R I I B結合抗体断片である。

【0147】

いくつかの実施形態では、A c t R I I結合性タンパク質は、A c t R I I Aと特異的に結合する。さらなる実施形態では、提供されるA c t R I I結合性タンパク質は、A c t R I I Aと特異的に結合し、(a) A c t R I I Aへの結合に対してA c t R I Iリガンド(例えば、アクチビンA、アクチビンB、G D F 1、G D F 3、G D F 8(ミオスタチン)、G D F 1 1、B M P 6、B M P 7、B M P 9、またはB M P 1 0)と競合する、(b) A c t R I I Aリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8(ミオスタチン))の存在下で、A c t R I I Aと、A L K 4及び/またはA L K 7とを発現している細胞でのA L K 4及び/またはA L K 7のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I Aリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8)の存在下で、A c t R I I Aを発現している細胞でのS m a d(例えば、S m a d 2及び/またはS m a d 3)のリン

10

20

30

40

50

酸化を減少させる、及び (d) A c t R I I A に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D (例えば、B I A C O R E (登録商標) 分析により決定した場合) で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。さらなる実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、A c t R I I A への結合に対して、本明細書に開示される A c t R I I A 結合性の V H と V L の対を有する抗体と競合する。さらなる実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、抗 A c t R I I A 抗体または A c t R I I A 結合性抗体断片である。
【0148】

10

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、相補性決定領域 (C D R) のセット、すなわち、重鎖可変領域 (V H) - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、軽鎖可変領域 (V L) - C D R 1、V L - C D R 2 及び V L - C D R 3 を含み、及び/または抗原結合領域 (A B R) のセット、すなわち、重鎖可変領域 (V H) - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、軽鎖可変領域 (V L) - A B R 1、V L - A B R 2 及び V L - A B R 3 を含み、かかる C D R 及び/または A B R は、表 1 に開示されている重鎖可変領域 (V H) と軽鎖可変領域 (V L) の対に存在する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、(a) 配列番号 20、49、または 77 の V H 配列と、配列番号 30、39、59、67、または 85 の V L 配列であって、タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、及び (b) 配列番号 2 の V H 配列と、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する V L であって、タンパク質が A c t R I I B 及びアクチビン受容体 I I A 型 (A c t R I I A) と結合するもの、からなる群から選択される V H と V L の対に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含む。

20

【0149】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する V H と配列番号 30 のアミノ酸配列を有する V L に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I B と結合する。

【0150】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する V H と配列番号 39 のアミノ酸配列を有する V L に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I B と結合する。

30

【0151】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、配列番号 49 のアミノ酸配列を有する V H と配列番号 59 のアミノ酸配列を有する V L に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I B と結合する。

【0152】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する V H と配列番号 67 のアミノ酸配列を有する V L に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I B と結合する。

【0153】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、配列番号 77 のアミノ酸配列を有する V H と配列番号 85 のアミノ酸配列を有する V L に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I B と結合する。

40

【0154】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する V H と配列番号 12 のアミノ酸配列を有する V L に存在する C D R 及び/または A B R のセットを含み、かかるタンパク質は、A c t R I I A 及び A c t R I I B と結合する。

【0155】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合

50

し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(a) (i) V H - C D R 1が配列番号2 1、5 0、または7 8のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号2 2、5 1、または7 9のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号2 3、5 2、または8 0のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号3 1、4 0、6 0、6 8、または8 6のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号3 2、4 1、6 1、6 9、または8 7のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号3 3、4 2、6 2、7 0、または8 8のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質はA c t R I I Bと結合するか、または(b) (i) V H - C D R 1が配列番号3のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号4のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号5のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号1 3のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号1 4のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号1 5のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと結合する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、1 0、もしくは1 0未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

10

【 0 1 5 6 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1が配列番号2 1のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号2 2のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号2 3のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号3 1のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号3 2のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号3 3のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、1 0、もしくは1 0未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

20

【 0 1 5 7 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1が配列番号2 1のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号2 2のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号2 3のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号4 0のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号4 1のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号4 2のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、1 0、もしくは1 0未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

30

【 0 1 5 8 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1が配列番号5 0のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号5 1のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号5 2のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号6 0のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号6 1のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号6 2のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、1 0、もしくは1 0未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

40

50

【 0 1 5 9 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1が配列番号21のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号22のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号23のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号68のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号69のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号70のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

10

【 0 1 6 0 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1が配列番号78のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号79のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号80のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号86のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号87のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号88のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

20

【 0 1 6 1 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと特異的に結合し、C D Rのセット、すなわち、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L - C D R 1、V L - C D R 2、及びV L - C D R 3を含み、かかるC D Rのセットは、C D Rの参照セット、すなわち、(i) V H - C D R 1が配列番号3のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - C D R 2が配列番号4のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - C D R 3が配列番号5のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - C D R 1が配列番号13のアミノ酸配列を有し、(v) V L - C D R 2が配列番号14のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - C D R 3が配列番号15のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

30

【 0 1 6 2 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I Iと特異的に結合し、A B Rのセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及びV L - A B R 3を含み、かかるA B Rのセットは、A B Rの参照セット、すなわち、(a) (i) V H - A B R 1が配列番号24、53、または81のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2が配列番号25、54、55、または82のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3が配列番号26、56、57、または83のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1が配列番号34、43、63、71、または89のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2が配列番号35、44、64、72、または90のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - A B R 3が配列番号36、45、65、73、または91のアミノ酸配列を有し、かかるタンパク質はA c t R I I Bと結合するか、または(b) (i) V H - A B R 1が配列番号6のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2が配列番号7、または8のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3が配列番号9、または10のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1が配列番号16のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2が配列番号17のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - A B R 3が配列番号18のアミノ酸配列を

40

50

有し、かかるタンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと結合する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

【0163】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、A B Rのセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及びV L - A B R 3を含み、かかるA B Rのセットは、A B Rの参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1が配列番号24のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2が配列番号25のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3が配列番号26のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1が配列番号34のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2が配列番号35のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - A B R 3が配列番号36のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

10

【0164】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、A B Rのセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及びV L - A B R 3を含み、かかるA B Rのセットは、A B Rの参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1が配列番号24のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2が配列番号25のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3が配列番号26のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1が配列番号43のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2が配列番号44のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - A B R 3が配列番号45のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

20

【0165】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、A B Rのセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及びV L - A B R 3を含み、かかるA B Rのセットは、A B Rの参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1が配列番号53のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2が配列番号54、または55のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3が配列番号56、または57のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1が配列番号63のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2が配列番号64のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - A B R 3が配列番号65のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

30

【0166】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I Bと特異的に結合し、A B Rのセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及びV L - A B R 3を含み、かかるA B Rのセットは、A B Rの参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1が配列番号24のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2が配列番号25のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3が配列番号26のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1が配列番号71のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2が配列番号72のアミノ酸配列を有し、かつ(v i) V L - A B R 3が配列番号73のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくは10未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び/または挿入を有する。

40

【0167】

50

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、A B R のセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及び V L - A B R 3 を含み、かかる A B R のセットは、A B R の参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1 が配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2 が配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 8 3 のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1 が配列番号 8 9 のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2 が配列番号 9 0 のアミノ酸配列を有し、かつ (v i) V L - A B R 3 が配列番号 9 1 のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくは 1 0 未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する。

10

【 0 1 6 8 】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合し、A B R のセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、V L - A B R 1、V L - A B R 2、及び V L - A B R 3 を含み、かかる A B R のセットは、A B R の参照セット、すなわち、(i) V H - A B R 1 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、(i i) V H - A B R 2 が配列番号 7、または 8 のアミノ酸配列を有し、(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 9、または 1 0 のアミノ酸配列を有し、(i v) V L - A B R 1 が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有し、(v) V L - A B R 2 が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有し、かつ (v i) V L - A B R 3 が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する、というセットと同一であるか、あるいはそこから合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、もしくは 1 0 未満の、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する。

20

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合し、(a) (i) 配列番号 2 0、4 9、または 7 7 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を有する V H と、(i i) 配列番号 3 0、3 9、5 9、6 7、または 8 5 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を有する V L であって、タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、(b) (i) 配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V H と、(i i) 配列番号 1 2 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V L であって、タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、からなる群から選択される V H と V L の対を含む。

30

【 0 1 7 0 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V H と、配列番号 3 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V L とを含む。

【 0 1 7 1 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V H と、配列番号 3 9 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V L とを含む。

40

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号 4 9 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V H と、配列番号 5 9 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する V L とを含む。

【 0 1 7 3 】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的

50

に結合し、配列番号 20 に対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する V H と、配列番号 67 に対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する V L とを含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、配列番号 77 に対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する V H と、配列番号 85 に対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する V L とを含む。

【0175】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合し、配列番号 2 に対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する V H と、配列番号 12 に対して少なくとも 90%、95%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する V L とを含む。

【0176】

さらなる実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、(a) A c t R I I への結合に対して A c t R I I リガンド (例えば、アクチビン A、アクチビン B、G D F 1、G D F 3、G D F 8 (ミオスタチン)、G D F 11、B M P 6、B M P 7、B M P 9、または B M P 10) と競合する、(b) A c t R I I リガンド (例えば、アクチビン A または G D F 8) の存在下で、A c t R I I を発現している細胞での S m a d (例えば、S m a d 2 及び / または S m a d 3) のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I リガンドの存在下で、A c t R I I と、A L K 4 及び / または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び / または A L K 7 のリン酸化を減少させる、及び (d) A c t R I I に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D (例えば、B I A C O R E (登録商標) 分析により決定した場合) で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。

【0177】

追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I への結合に対して、本明細書に開示される V H と V L の配列対を含む抗体と競合する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、本明細書に開示される A c t R I I 結合性タンパク質と同じエピトープに結合する。

【0178】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、抗 A c t R I I は、A c t R I I B 及び / または A c t R I I A と特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗 A c t R I I 抗体は、マウス抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、多重特異性抗体、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、抗 A c t R I I 抗体は、F v 断片、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、F a b ' 断片、d s F v 断片、s c F v 断片、または s c (F v)₂ 断片である。

【0179】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I (例えば、A c t R I I A 及び / または A c t R I I B) と特異的に結合し、A c t R I I リガンド (例えば、G D F 8 (ミオスタチン) 及び / またはアクチビン) の活性を阻止する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I (例えば) と特異的に結合し、A c t R I I リガンド (例えば、G D F 8 (ミオスタチン) 及び / またはアクチビン) の活性と関連する筋形成阻害または脂肪形成増大を低下させる。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I と特異的に結合し、筋障害または代謝障害と関連する 1 つ以上の状態を治療または改善する。いくつかの実施形態では、筋障害は、疾患または不使用による筋肉消耗である。いくつかの実施形態では、代謝障

10

20

30

40

50

害は、糖尿病、肥満、高血糖症、または骨量減少である。

【0180】

特定の実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I B 抗体または抗 A c t R I I B 及び A c t R I I A 抗体）は、G D F 8（ミオスタチン）が A c t R I I B と結合すること、または G D F 8 媒介性 A c t R I I B S m a d シグナル伝達を、阻害するかまたは減少させる。別の実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、筋形成阻害または脂肪形成増大を低下させる。いくつかの実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、A c t R I I B と結合し、筋障害または代謝障害と関連する 1 つ以上の状態を阻害するかまたは減少させる。いくつかの実施形態では、筋障害は、疾患または不使用による筋肉消耗である。いくつかの実施形態では、代謝障害は、糖尿病、肥満、高血糖症、または骨量減少である。対象の筋量と筋力を増加させる。

10

【0181】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I B 抗体及び抗 A c t R I I A 抗体）により A c t R I I（例えば、A c t R I I B 及び / または A c t R I I A）活性を阻止することで、筋肉消耗等の筋障害と関連する 1 つ以上の状態が阻害されるかまたは減少する。さらなる実施形態では、A c t R I I を阻止することで、疾患または不使用による筋肉消耗と関連する 1 つ以上の状態が阻害されるかまたは減少する。特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I B 抗体または抗 A c t R I I B 及び A c t R I I A 抗体）は、G D F 8 による A c t R I I B への結合を阻害するかまたは減少させる。別の実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、S m a d 依存性経路による筋分化の阻害を阻害するかまたは低下させる。

20

【0182】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、A c t R I I B リガンド媒介性の活性を阻止する。G D F - 8 等のいくつかの A c t R I I B リガンドは、骨格筋組織の負の調節因子であることが知られており、ミオスタチンシグナル伝達は、筋量をもたらすことが知られている。A c t R I I B リガンド媒介性シグナル伝達はまた、筋特異的酵素（例えば、クレアチンキナーゼ）の産生を調節し、筋原細胞増殖を刺激し、脂肪細胞への前駆脂肪細胞の分化を調節することができる。ミオスタチン活性増大は、筋肉消耗障害、不活動による筋肉量減少、ならびに糖尿病、肥満、高血糖症、及び骨量減少を含む代謝障害と関連している。A c t R I I B リガンド媒介性活性の増大はまた、加齢に関連する脂肪と筋肉の比の増加、及び加齢関連筋萎縮と関連している。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、いくつかの A c t R I I B リガンドの活性と関連する筋形成阻害または脂肪形成増大を低下させる。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B と特異的に結合し、筋障害または代謝障害と関連する 1 つ以上の状態を治療または改善する。いくつかの実施形態では、筋障害は、疾患または不使用による筋肉消耗である。いくつかの実施形態では、代謝障害は、糖尿病、肥満、高血糖症、または骨量減少である。A c t R I I B リガンド媒介性活性は、本明細書に記載される方法等、当該技術分野で認められている方法を使用して決定することができる。

30

40

【0183】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I B 抗体及び抗 A c t R I I A 抗体）により A c t R I I（例えば、A c t R I I B 及び / または A c t R I I A）活性を阻止することで、線維症と関連する 1 つ以上の状態が軽減される。特定の実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質は、A c t R I I B 媒介性の線維性病変の発症、体重減少もしくは他の臨床症状、及び / または線維性状態の発症と関連する生体分子発現変化（例えば、m R N A またはタンパク質の発現）を阻害するかまたは減少させる。特定の実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質は、A c t R I I A 媒介性の線維性病変の発症、体重減少もしくは他の臨床症状、及び / または線維性状態の発症と関連する生体分子発現変化（例えば、m R N A またはタ

50

ンパク質の発現)を阻害するかまたは減少させる。

【0184】

上記のように、A c t R I I と結合するV H アミノ酸配列及び/またはV L アミノ酸配列を含有する抗A c t R I I 抗体(例えば、完全長A c t R I I B 抗体及びA c t R I I 結合性抗体断片、ならびにそのバリエーションと誘導体)は、本明細書に記載される配列に対する配列同一性が少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%であり得る。いくつかの実施形態では、A c t R I I と結合するV H アミノ酸配列(複数可)及び/またはV L アミノ酸配列(複数可)は、本明細書に記載される配列に対して8、7、6、5、4、3、2、1のアミノ酸の付加、置換(例えば、保存的置換)または欠失を含む。追加の実施形態では、A c t R I I と結合する、V H 及び/またはV L アミノ酸配列は、本明細書に記載される配列に対して1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくはそれ以上のアミノ酸の付加、置換(例えば、保存的置換)または欠失を含む。V H 領域もしくはV L 領域に対する類似性が特定のパーセントであるV H 領域及びV L 領域、あるいは1つ以上の置換、欠失及び/または挿入(例えば、保存的置換)を有するV H 領域及びV L 領域を含有する抗A c t R I I 抗体は、本明細書に記載されるV H 領域及び/またはV L 領域をコードする核酸分子の変異誘発(例えば、部位特異的またはP C R 媒介性変異誘発)、それに続く、コードされた改変抗体をA c t R I I への結合について試験すること、及び任意選択で、本明細書に記載される機能解析を使用するかまたは保持された機能を試験するために日常的に変更可能な当該技術分野で公知のアッセイを使用して、保持された機能について試験することにより得ることができる。

【0185】

h A c t R I I B、mur A c t R I I B に対する抗A c t R I I B 抗体(例えば、完全長A c t R I I B 抗体及びA c t R I I 結合性抗体断片、ならびにそのバリエーションと誘導体)等のA c t R I I 結合性タンパク質の親和性または結合力は、当該技術分野で公知の任意の好適な方法、例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着測定法(E L I S A)、もしくはラジオイムノアッセイ(R I A)、または動態(例えば、B I A C O R E (登録商標)またはK I N E X A (登録商標)分析)を使用して実験的に決定することができる。直接結合アッセイ及び競合結合アッセイのフォーマットを容易に使用することができる。(例えば、Berzofsky et al., "Antibody - Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N. Y. (1984)、Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N. Y. (1992)、及び本明細書に記載される方法を参照のこと)。特定の抗体 - 抗原相互作用の測定される親和性は、異なる条件(例えば、塩濃度、pH、温度)で測定した場合は異なり得る。したがって、親和性及び他のA c t R I I の結合性のパラメータ(例えば、 K_D または K_d 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、A c t R I I 結合性タンパク質及びA c t R I I の標準液を用いて行われ、また測定は、本明細書に記載されるかまたは当該技術分野で知られる他の標準化された条件と方法を使用して実施される。

【0186】

本開示はさらに、本明細書に記載される抗A c t R I I B 抗体及び/または抗A c t R I I A 抗体等のA c t R I I 結合性タンパク質を提供し、その場合、A c t R I I 結合性タンパク質は、異種物質に結合されている。ある特定の実施形態では、異種物質は、抗菌剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答調節物質、医薬剤、リンホカイン、異種抗体もしくは抗体断片、検出可能な標識、またはポリエチレングリコール(P E G)である。ヘテロ複合体A c t R I I 結合性タンパク質は、本明細書の他の箇所より詳しく考察される。

【0187】

ある特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、抗A c t R I I 抗体ではない。タンパク質標的に高親和性で結合する非抗体ポリペプチドを同定及び生成するため

の様々な方法が当該技術分野で公知である。例えば、その各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Skerra, Curr. Opin. Biotech. 18: 295-304 (2007)、Hosse et al., Protein Science 15: 14-27 (2006)、Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol. 17: 653-658 (2006)、Nygren, FEBS J. 275: 2668-2676 (2008)、及びSkerra, FEBS J. 275: 2677-2683 (2008)を参照のこと。いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質を同定/生成するためにファージディスプレイ技術を使用することができる。いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質は、VASPポリペプチド、トリ胛臓ポリペプチド(aPP)、テトラネクチン(CTLD3に基づく)、アフィリン(γB-クリスタリン/ユビキチンに基づく)、ノッチン、SH3ドメイン、PDZドメイン、テンダミスタット、トランスフェリン、コンセンサスアンキリン反復ドメイン(例えば、DARPin)、リボカリンタンパク質フォールド(例えば、アンチカリン及びデュオカリン(Duocalin))、タンパク質エピトープミメティック(PEM)、マキシボディ/アビマー、ドメイン抗体フィブロネクチンドメイン(例えば、10 Fn3、例えば、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国出願公開第2003/0170753号及び同第20090155275号を参照のこと)、プロテインAのドメイン(例えば、アフィボディ)、及びチオレドキシンからなる群から選択される種類に基づくタンパク質足場を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で提供される抗ActRIIA抗体と、ActRIIAとの結合に対して競合するActRIIA結合性タンパク質(例えば、完全長抗ActRIIA抗体及びActRIIA結合性抗体断片等の、抗ActRIIA抗体)を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で提供されるActRII結合性タンパク質と同じActRIIAのエピトープに結合するActRII結合性タンパク質を提供する。

【0189】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で提供される抗ActRIIB抗体と、ActRIIBとの結合に対して競合するActRIIB結合性タンパク質(例えば、完全長抗ActRIIB抗体及びActRIIB結合性抗体断片等の、抗ActRIIB抗体)を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で提供されるActRIIB結合性タンパク質と同じActRIIBのエピトープに結合するActRIIB結合性タンパク質を提供する。被験ActRII結合性タンパク質が、例えば、配列番号40のVH配列と配列番号9のVL配列、または配列番号119のVH配列と配列番号91のVL配列を含む抗体等の参照結合性タンパク質のActRIIBへの結合を阻害する能力は、被験ActRII結合性タンパク質がActRIIBへの結合に対して参照抗体と競合することができることを実証している。そのようなActRIIB結合性タンパク質は、非限定的理論に従って、それが競合するActRIIB参照抗体と同じかまたは関連する(例えば、構造的に同様であるかまたは空間的に近位の)ActRIIB上のエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質は、配列番号40のVH配列と配列番号9のVL配列を含む抗体と同じActRIIB上のエピトープに結合する。

【0190】

ActRIIB及びActRIIA等のActRII受容体は、ActRIの共受容体(例えば、Alk4及びAlk7)をリン酸化すること、及びSmad(例えば、Smad2及び/またはSmad3)のリン酸化を介してシグナル伝達を行うことが知られている。いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質(例えば、抗ActRIIB抗体及び抗ActRIIA抗体)は、ActRII媒介性の、その同族ActRI受容体のリン酸化を減少させることができる。いくつかの実施形態では、ActRIIB結合性タンパク質(例えば、抗ActRIIB抗体)は、ActRIIB媒介性の、ALK4

及び／または A L K 7 のリン酸化を減少させることができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I A 抗体）は、A c t R I I A 媒介性の、A L K 4 及び／または A L K 7 のリン酸化を減少させることができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I 2 発現細胞での A c t R I I 媒介性の S m a d（例えば、S m a d 2 及び／または S m a d 3）のリン酸化を阻害することができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I B 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I B 抗体）は、A c t R I I B を発現している細胞での A c t R I I B 媒介性の S m a d（例えば、S m a d 2 及び／または S m a d 3）のリン酸化を減少させることができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I A 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I A 抗体）は、A c t R I I A を発現している細胞での A c t R I I A 媒介性の S m a d（例えば、S m a d 2 及び／または S m a d 3）のリン酸化を減少させることができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I 受容体発現細胞は、ヒトのものである。

10

【0191】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、（a）A c t R I I A 及び／または A c t R I I B への結合に対してアクチビン A と競合する、（b）A c t R I I A 及び／または A c t R I I B リガンド（例えば、アクチビン A）の存在下で A c t R I I A 及び／または A c t R I I B を発現している細胞での S m a d（例えば、S m a d 2 及び／または S m a d 3）のリン酸化を減少させる、（c）A c t R I I B 及び／または A c t R I I A のリガンドの存在下で、A c t R I I A 及び／または A c t R I I B と、A L K 4 及び／または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び／または A L K 7 のリン酸化を減少させる、及び（d）A c t R I I A 及び／または A c t R I I B に、B I A C O R E（登録商標）または K I N E X A（登録商標）により決定される 1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D で結合する、という特性から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。

20

【0192】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I 抗体）は、細胞ベースのアッセイを使用して測定した場合、A c t R I I を発現している細胞での、A c t R I I 媒介性の A c t R I 受容体（例えば、A L K 4 及び／または A L K 7）のリン酸化、または S m a d（例えば、S m a d 2 及び／または S m a d 3）のリン酸化を抑制する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、細胞ベースのアッセイを使用して測定した場合、A c t R I I 媒介性のリン酸化を、500 p M 未満、350 p M 未満、250 p M 未満、150 p M 未満、100 p M 未満、75 p M 未満、60 p M 未満、50 p M 未満、40 p M 未満、30 p M 未満、20 p M 未満、15 p M 未満、10 p M 未満、または 5 p M 未満の IC_{50} で抑制する。

30

【0193】

A c t R I I 結合性タンパク質の調製

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I（例えば、A c t R I I B 及び A c t R I I A）の細胞外ドメインと結合する。さらなる実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、完全長抗 A c t R I I A 抗体及び完全長抗 A c t R I I B 抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I A 抗体及び／または抗 A c t R I I B 抗体、ならびにそのバリエーション、及び誘導体である。

40

【0194】

A c t R I I 結合性タンパク質は、既知の技術を使用して容易に調製することができる。モノクローナル抗 A c t R I I（例えば、A c t R I I B 及び A c t R I I A）抗体は、ハイブリドーマ法、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 - 497 (1975) により記載されているものを含め、当該技術分野で公知の技術を使用して調製することができる。ハイブリドーマ法を使用して、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が、リンパ球による、免疫抗原に特異的に結合する抗体の産生を誘発するよう、上記のように免疫化される。リンパ球は、インビトロで免

50

疫化することができる。免疫化の後、リンパ球を単離し、好適な骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を形成した後、それらを選択して、融合していないリンパ球及び骨髓腫細胞から離すことができる。免疫沈降法、免疫ブロット法によるかまたはインビトロでの結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A））により決定される、h A c t R I I B及びh A c t R I I A等のA c t R I Iに対して特異的に指向されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、その後、標準的方法（例えば、G o d i n g , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e , A c a d e m i c P r e s s , 1 9 8 6を参照のこと）を使用したインビトロ培養または動物の腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。その後、モノクローナル抗体を、上記のポリクローナル抗体の場合のように培地または腹水液から精製することができる。

10

【0195】

提供されるモノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載のような組換えDNA法を使用して作製することもでき、ここで、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、その抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅させるオリゴヌクレオチドプライマーを使用したR T - P C R等により、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から単離され、それらの配列を、既知の手順を使用して決定する。次いで、その後、重鎖及び軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを適切な発現ベクター内にクローニングし、これらを、他の場合には免疫グロブリンタンパク質を産生しないE . c o l i細胞、シミアンC O S細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、P e r . C 6細胞、または骨髓腫細胞（例えば、N S 0細胞）等の宿主細胞に導入すると、宿主細胞によりモノクローナル抗体が生成される。組換え抗A c t R I Iモノクローナル抗体はまた、既知の技術を使用して、所望の種のC D Rを発現するファージディスプレイライブラリーから容易に単離することができる（例えば、M c C a f f e r t y e t a l . , N a t u r e 3 4 8 : 5 5 2 - 5 5 4 (1 9 9 0)、C l a c k s o n e t a l . , N a t u r e 3 5 2 : 6 2 4 - 6 2 8 (1 9 9 1)、及び M a r k s e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 2 2 : 5 8 1 - 5 9 7 (1 9 9 1)を参照のこと）。

20

【0196】

抗A c t R I I抗体は、任意選択で、A c t R I I抗原（例えば、A c t R I I B及びA c t R I I A）に対する高親和性及び他の好ましい生物学的特性を示すよう、ヒト化、表面再構成（r e s u r f a c e d）、及び操作することができる。例えば、ヒト化（またはヒト）抗A c t R I I抗体、は、A c t R I Iに対する親和性増大等の所望の抗体特性が得られるよう、一般的に利用可能な三次元免疫グロブリンモデリング、ならびにフレームワーク（F W）残基、コンセンサス配列、及び生殖細胞系列配列を選択するための既知の手順を使用して、容易に設計及び調製することができる。

30

【0197】

親和性成熟戦略及び鎖シャッフリング戦略は当該技術分野で公知であり、高親和性抗A c t R I I（例えば、抗A c t R I I A及び／または抗A c t R I I B）抗体ならびに本明細書に開示されるA c t R I I結合性タンパク質の誘導体及びバリエーションを作製するために利用することができる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるM a r k s e t a l . , B i o / T e c h n o l o g y 1 0 : 7 7 9 - 7 8 3 (1 9 9 2)を参照のこと。高親和性抗A c t R I I（例えば、抗A c t R I I A及び／または抗A c t R I I B）抗体ならびに本明細書に開示されるA c t R I I結合性タンパク質の誘導体及びバリエーションを作製するための追加戦略は、可変ドメイン全体の内部に変異を生成するために1つ以上の選択されたV H遺伝子及び／またはV L遺伝子のランダム変異誘発を使用して、本開示のC D R由来配列を保持する新規のV H領域またはV L領域を生成することである。エラープローンP C Rを使用するそのような技術は、G r a mらにより記載されている（P N A S U S A 8 9 : 3 5 7 6 - 3 5 8 0 (1 9 9 2)）。いくつかの実施形態では、V H C D R及び／またはV L C D Rのセット内で1つもしくは2つのアミノ酸置換が行われる。さらなる戦略では、本明細書に開示される抗A c t R I I抗体をコ

40

50

ードするVH遺伝子またはVL遺伝子のCDR領域に対する直接変異誘発を使用した。そのような技術の例は、Barbasら(PNAS USA 91:3809-3813(1994))及びSchierら(J. Mol. Biol. 263:551-567(1996))により開示されている。

【0198】

本開示の抗ActRII抗体のヒト化、表面再構成(resurfacing)または操作は、既知の任意の方法を使用して実施することができ、その方法としては、それぞれ参照することにより本明細書に全体が組み込まれる、Jones et al., Nature 321:522(1986)、Riechmann et al., Nature 332:323(1988)、Verhoeyen et al., Science 239:1534(1988)、Sims et al., J. Immunol. 151:2296(1993)、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901(1987)、Carter et al., PNAS USA 89:4285(1992)、Presta et al., J. Immunol. 151:2623(1993)、米国特許第5,639,641号、同第5,723,323号、同第5,976,862号、同第5,824,514号、同第5,817,483号、同第5,814,476号、同第5,763,192号、同第5,723,323号、同第5,766,886号、同第5,714,352号、同第6,204,023号、同第6,180,370号、同第5,693,762号、同第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,225,539号、同第4,816,567号、同第7,557,189号、同第7,538,195号、及び同第7,342,110号、国際出願第PCT/US98/16280号、同第PCT/US96/18978号、同第PCT/US91/09630号、同第PCT/US91/05939号、同第PCT/US94/01234号、同第PCT/GB89/01334号、同第PCT/GB91/01134号、同第PCT/GB92/01755号、国際出願公開第WO90/14443号、同第WO90/14424号、同第WO90/14430号、及び欧州特許公開第EP229246号に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。同様に、望ましい特徴を示すActRII抗体を容易に選択するために既知のアッセイが利用可能である(例えば、ActRIIへの結合親和性を決定するためのアッセイ、本明細書に記載されるBIACORE(登録商標)を用いたヒトActRII結合性タンパク質競合結合アッセイ等の交差阻止アッセイ)。

【0199】

非ヒトもしくはヒト抗体を操作、ヒト化または表面再構成(resurfacing)するための方法もまた使用することができ、当該技術分野で公知である。ヒト化、表面再構成(resurfaced)または同様の操作が行われた抗体は、非ヒト、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類または他の哺乳類であるがこれらに限定されない供給源からの1つ以上のアミノ酸残基を有し得る。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と呼ばれることの多い、典型的には既知のヒト配列の「移入」可変、定常または他のドメインから取得される残基により置き換えられる。そのような移入された配列を、当該技術分野で公知のように、免疫原性を低下させるため、あるいは結合、親和性、会合速度、解離速度、結合力、特異性、半減期、もしくは他の任意の好適な特性を抑制、増強または修飾するために使用することができる。好ましくは、非ヒトまたはヒトのCDR配列の一部または全部が維持されるが、可変領域と定常領域の非ヒト配列は、ヒトのアミノ酸または他のアミノ酸と置き換えることができる。

【0200】

完全長抗ActRIIAまたは抗ActRIIB抗体等のActRII結合性タンパク質をコードする核酸(複数可)はさらに、代替抗体作製のために、組換えDNA技術を使用するいくつかの異なる方法で修飾することができる。いくつかの実施形態では、例えば、マウスモノクローナル抗体の、軽鎖及び重鎖の定常ドメインをコードする核酸(複数可)は、(a)キメラ抗体を作製するために、例えばヒト抗体の、コード領域の代替となる

か、または(b)融合抗体を作製するために、非免疫グロブリンをコードする核酸(複数可)の代替となることができる。いくつかの実施形態では、定常領域が、モノクローナル抗体の所望の抗体断片を生成するために切断または除去される。モノクローナル抗体の特異性、親和性等最適化するために可変領域コード配列の部位特異的変異誘発または高密度変異誘発を使用することができる。

【0201】

抗ActRII抗体は、当該技術分野で公知の多数の技術のいずれを使用しても直接調製することができる。(例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boemer et al., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991)、及び米国特許第5,750,373号を参照のこと)。同様に、ヒト抗ActRII抗体は、インビトロで免疫化された不死化ヒトBリンパ球から容易に取得することができ、またActRII(例えば、ActRIIB及びActRIIA)に対して指向する抗体を産生する免疫個体から容易に分離することもできる。

10

【0202】

ヒト抗ActRII抗体はまた、例えば、Vaughan et al., Nat. Biotech. 14: 309-314 (1996)、Sheets et al., PNAS 95: 6157-6162 (1998)、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991)、及びMarks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)に記載のように、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから選択することもできる。抗体ファージライブラリーを生成及びスクリーニングするための技術はまた、米国特許第5,969,108号、同第6,172,197号、同第5,885,793号、同第6,521,404号、同第6,544,731号、同第6,555,313号、同第6,582,915号、同第6,593,081号、同第6,300,064号、同第6,653,068号、同第6,706,484号、及び同第7,264,963号、ならびにRothe et al., J. Mol. Biol. 376(4): 1182-1200 (2008)にも記載されている(その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

20

【0203】

ヒト抗ActRII抗体は、免疫化時に免疫グロブリンの内因的産生がなくてもヒト抗体産生能のあるヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスで作製することもできる。この方法は、例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、及び同第5,661,016号で記載されている。

30

【0204】

ヒト抗ActRII抗体はまた、例えば、それぞれの内容が参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる、WO012/009568、WO09/036379、WO10/105256、WO03/074679及び米国出願公開第US2002/0177170号に開示されるように、酵母を用いた抗体提示ライブラリーから選択及び/または単離することもできる。そのようなライブラリーは、ヒトの免疫前レパートリーにより提供される多様性が反映されるようインシリコで設計される。

40

【0205】

別法として、抗ActRII抗体は、酵母により提示される抗体ライブラリーから選択され得、例えば、Blaise et al., Gene 342(2): 211-218 (2004)、Boder et al., Nat Biotechnol. 15(6): 553-557 (1997)、Kuroda et al., Biotechnol. Lett. 33(1): 1-9 (2011)、Review、Lauer et al., J. Pharm. Sci. 101(1): 102-15 (2012)、Orcutt K.D. and Witttrup K.D. Antibody Engineering, yeast display and selectios (2010), 207-233、Ra

50

kestrow et al., Protein Eng. Des. Sel. 24(6): 525-30(2011)、及び米国特許第6,423,538号、同第6,696,251号、及び同第6,699,658号を参照のこと。

【0206】

抗原結合性抗体断片の生成のために様々な技術が知られている。従来より、これらの断片は、無傷抗体のタンパク消化を介して誘導される(例えば、Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117(1993)、及びBrennan et al., Science 229:81(1985)を参照のこと)。ある特定の実施形態では、ActRII結合性抗体断片は、組換えにより生成される。Fab、Fv、及びscFvの抗体断片はすべて、E. coliまたは他の宿主細胞で発現させ、またそれから分泌させることができるため、これらの断片を大量に生成することが可能である。そのようなActRII結合性抗体断片はさらに、前述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。いくつかの実施形態では、ActRII結合性抗体断片は、米国特許第5,641,870号に記載のような線状抗体である。抗原結合性抗体断片の生成のための他の技術は当該技術分野で公知である。

10

【0207】

ActRIIと結合する一本鎖抗体の生成には公知の技術を容易に適合させることができる(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、Fab発現ライブラリーの構築に公知の方法を日常的に適合させて(例えば、Huse et al., Science 246:1275-1281(1989)を参照のこと)、ActRIIに対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ有効な同定を可能にすることができる。ActRII結合性抗体断片は、当該技術分野で公知の技術により生成することができ、それらには、(a)抗体のペプシン消化により生成されるF(ab')₂断片、(b)F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元させることにより生成されるFab断片、(c)パパイニン及び還元剤を用いた抗ActRII抗体の処理により生成されるFab断片、及び(d)Fv断片が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0208】

ある特定の実施形態では、ActRII結合性タンパク質(例えば、抗ActRIIA抗体及び/または抗ActRIIB抗体)は、その血清中半減期を増大させるために修飾することができる。これは、例えば、ActRII結合性タンパク質の適切な領域の変異による、ActRII結合性タンパク質へのサルベージ受容体結合エピトープの組み込みによるか、またはペプチドタグにサルベージ受容体エピトープを組み込み、次いで、それをActRIIB結合性タンパク質のいずれかの末端もしくは中央に(例えば、DNAまたはペプチドの合成によって)融合させることにより達成することができる。ActRII結合性タンパク質の血清中半減期を延長するための他の方法、例えば、PEG等の異種分子への結合は、当該技術分野で公知である。

30

【0209】

ヘテロ複合体ActRII結合性タンパク質(例えば、完全長抗ActRIIB抗体及びActRIIB結合性抗体断片等の抗ActRIIB抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体)もまた、本開示の範囲内である。ヘテロ複合体ActRII結合性タンパク質は、共有結合で連結された2つのタンパク質で構成される。ヘテロ複合体ActRII結合性タンパク質は、架橋剤を伴う方法を含め、合成タンパク質化学の公知の方法を使用してインビトロで調製できることが企図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用しても、またはチオエーテル結合の形成によっても構築することができる。この目的のための好適な試薬の例としては、イミノチオラート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダートが挙げられる。

40

【0210】

ActRII結合性タンパク質は、ActRII(例えば、ActRIIB及びActRIIA)との抗体の会合を提供する任意の種類の可変領域を含むことができる。そのような可変領域は、ActRII抗原に対する液性応答を開始して免疫グロブリンを生成す

50

るよう誘導することができる任意の哺乳類に含まれ得るかまたはそれに由来し得る。抗 A c t R I I 抗体の可変領域は、例えば、ヒト、マウス、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、マカクザル等）またはオオカミに由来するものであり得る。いくつかの実施形態では、修飾抗 A c t R I I 抗体の可変領域と定常領域の両方がヒトのものである。他の実施形態では、適合性のある抗体の可変領域（通常は非ヒト供給源に由来する）は、結合特性が改善するよう、または分子の免疫原性が低下するよう、操作もしくは特異的に調整することができる。これに関し、本開示による有用な可変領域は、親和性成熟、変異誘発手順、鎖シャッフリングの各戦略及び／または本明細書に記載されるかもしくは当該技術分野で知られる他の方法を使用して移入アミノ酸配列を含めることにより、ヒト化するか、そうでなければ変化させることができる。

10

【 0 2 1 1 】

ある特定の実施形態では、抗 A c t R I I 抗体の重鎖と軽鎖の両方の可変ドメインが、1つ以上の C D R の少なくとも部分的な置き換えによって、及び／または部分的なフレームワーク領域の置き換えと配列変化によって改変される。C D R は、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスの抗体、さらにはサブクラスの抗体に由来し得るが、C D R が、異なるクラスの抗体に由来すること、またはある特定の態様では異なる種に由来することが予測される。ある可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインに移すために、C D R のすべてをドナー可変領域からの完全 C D R で置き換える必要はない。むしろ、抗原結合部位の活性を維持するために必要な残基を移すだけでよい。免疫原性の低い機能性抗体を日常的に得ることは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号及び同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号を参照のこと。

20

【 0 2 1 2 】

可変領域に対する改変にもかかわらず、本開示の修飾抗 A c t R I I が、天然または未変化の定常領域を含む免疫原性がほぼ同じ抗体と比較した場合に、A D C C 低下または血清中半減期延長等の所望の生化学的特性が得られるように定常領域ドメインのうち1つ以上の少なくともごく一部を欠失させてあるか、そうでなければ変化させてある抗体を含むことを当業者は理解するであろう。いくつかの実施形態では、修飾抗 A c t R I I 抗体の定常領域は、ヒト定常領域を含む。定常領域に対する修飾には、1つ以上のドメインにおける1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換が含まれ得る。本明細書に開示される修飾抗 A c t R I I 抗体は、3つの重鎖定常ドメイン（C H 1、C H 2 または C H 3）のうち1つ以上に対する改変もしくは修飾、及び／または軽鎖定常ドメイン（C L）に対する改変もしくは修飾を含むことができる。いくつかの実施形態では、修飾抗 A c t R I I 抗体は、1つ以上のドメインが部分的または完全に欠失している定常領域を含むことが企図される。いくつかの実施形態では、修飾抗 A c t R I I 抗体は、C H 2 ドメイン全体が除去されている、ドメインが欠失したコンストラクトまたはバリエーションを含む（Δ C H 2 コンストラクト）。いくつかの実施形態では、取り除かれた定常領域ドメインは、典型的には欠けた定常領域により付与されるいくらかの分子柔軟性を提供する、短いアミノ酸スペーサー（例えば、10 残基）に置き換えることができる。

30

【 0 2 1 3 】

定常領域がいくつかのエフェクター機能を仲介することが一般に理解される。例えば、補体の C 1 成分の抗体への結合により補体系が活性化される。補体の活性化は、オプソニン作用及び細胞病原体の溶解に重要である。補体の活性化はまた、炎症反応を刺激し、自己免疫性過敏症にも関与し得る。さらに、抗体は、F c 領域を介して細胞に結合し、抗体 F c 領域上の F c 受容体部位が細胞上の F c 受容体（F c R）に結合する。各種クラスの抗体に特異的な F c 受容体がいくつかあり、I g G（ガンマ受容体）、I g E（エータ受容体）、I g A（アルファ受容体）及び I g M（ミュー受容体）が含まれる。細胞表面の F c 受容体への抗体の結合により、抗体に覆われた粒子の貪食及び破壊、免疫複合体除去、キラー細胞による、抗体に覆われた標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害、または A D C C と呼ばれる）、炎症メディエーターの放出、胎盤移行、ならびに免疫グロ

40

50

ブリン産生制御が含まれる、いくつかの重要かつ多様な生体応答が誘発される。

【0214】

ある特定の実施形態では、抗A c t R I I抗体は、エフェクター機能が改変されており、それが、投与される抗A c t R I I抗体の生物学的プロファイルに影響を及ぼす。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活化（点変異または他の手段による）により、循環血中修飾抗体のF c受容体結合が減少し得る。他の場合には、定常領域修飾により補体結合が抑えられ、そのため、結合細胞毒素の血清中半減期及び非特異的会合が低減され得る。ジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を排除するよう定常領域のさらに他の修飾を使用することができ、抗原特異性または抗体柔軟性の増大による局在化の向上を可能にすることができる。同様に、本開示に従った定常領域に対する修飾は、当業者に公知の生化学的または分子的工業技術を使用して容易に行うことができる。

10

【0215】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるA c t R I I B結合性タンパク質は、1つ以上のエフェクター機能を有していないA c t R I I抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、抗A c t R I I抗体は、抗体依存性細胞傷害（A D C C）活性を有しない、及び/または補体依存性細胞傷害（C D C）活性を有しない。ある特定の実施形態では、抗A c t R I I抗体はF c受容体及び/または補体因子に結合しない。ある特定の実施形態では、抗A c t R I I抗体は、エフェクター機能を有しない。A D C C及び/またはC D C活性ならびにF c受容体及び/または補体因子の結合を低減するかもしくは排除するF c配列操作修飾の例は、本明細書に記載されるか、そうでなければ当該技術分野で公知であり、それらを試験するためのアッセイ及び手順も同様である。

20

【0216】

いくつかの実施形態では、抗A c t R I I抗体は、C H 3ドメインをそれぞれの修飾抗体のヒンジ領域に直接融合させるよう操作される。他のコンストラクトでは、ヒンジ領域と修飾C H 2及び/またはC H 3ドメインとの間にペプチドスペーサーが挿入される。例えば、C H 2ドメインを欠失させてあり、残りのC H 3ドメイン（修飾または未修飾）が5～20アミノ酸スペーサーでヒンジ領域に連結されている適合性のあるコンストラクトを発現させることができる。そのようなスペーサーを付加して、例えば、定常ドメインの調節エレメントが自由かつ接近可能な状態にあること、またはヒンジ領域が柔軟な状態にあることを保証することができる。アミノ酸スペーサーは場合によっては免疫原性であることが示され、コンストラクトに対する望ましくない免疫応答を誘発し得る。したがって、ある特定の実施形態では、コンストラクトに付加されるいかなるスペーサーも、修飾抗A c t R I Iの所望の生化学的品質を維持するために比較的非免疫原性であり得るか、または完全に排除することもできる。

30

【0217】

追加の実施形態では、抗A c t R I I抗体は、定常領域の少数、さらには単一のアミノ酸の部分的な欠失もしくは置換により修飾される。例えば、C H 2ドメインの選択領域での単一アミノ酸の変異はF c結合を実質的に減少させ、それにより十分であり得る。同様に、エフェクター機能（例えば、補体C 1 Q結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインを、完全または部分的に欠失させることができる。定常領域のそのような部分的欠失により、抗A c t R I I抗体の選択された特性（例えば、血清中半減期）を改善しつつ、対応する定常領域ドメインと関連する他の望ましい機能はそのまま残すことができる。いくつかの実施形態では、抗A c t R I I抗体の定常領域は、得られるコンストラクトのプロファイルを增強させる、1つ以上のアミノ酸の変異または置換を介して修飾される。これに関し、修飾抗A c t R I I抗体の立体配置と免疫原性プロファイルを実質的に維持しつつ、保存された結合部位（例えば、F c結合）により提供される活性を破壊することが可能である。本開示はまた、エフェクター機能を増減させること、または1つ以上の細胞毒素、標識もしくは炭水化物部分のための結合部位を提供すること等の望ましい特徴を增強させるために定常領域に対する1つ以上のアミノ酸の付加を含有する抗A c t R I I抗体も提供する。そのような実施形態では、選択された定常領域ドメインに由来する特定の配

40

50

列を挿入または複製することが望ましい場合がある。

【0218】

本開示はまた、本明細書で提供される A c t R I I B と A c t R I I A に結合性のタンパク質に対するバリエーションである A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、マウス、ヒト化及びヒト A c t R I I 結合性タンパク質）も提供する。特定の実施形態では、バリエーション A c t R I I 結合性タンパク質は、（a）A c t R I I B 及び／または A c t R I I A への結合に対してアクチビン A と競合する、（b）A c t R I I B 及び／または A c t R I I A のリガンド（例えば、アクチビン A）の存在下で A c t R I I B 及び／または A c t R I I A を発現している細胞での S m a d（例えば、S m a d 2 及び／または S m a d 3）のリン酸化を減少させる、（c）A c t R I I B 及び／または A c t R I I A のリガンドの存在下で、A c t R I I B 及び／または A c t R I I A と、A L K 4 及び／または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び／または A L K 7 のリン酸化を減少させる、及び（d）A c t R I I B または A c t R I I A に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D（例えば、B I A C O R E（登録商標）分析により決定した場合）で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。さらなる実施形態では、バリエーションは、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質と比較して、保存的アミノ酸残基の置換変異を含有する。

10

20

【0219】

抗 A c t R I I 抗体等の提供される A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I 結合性タンパク質の、例えば、溶解度、生物学的半減期、生物学的利用能を改善するための当該技術分野で公知の追加の化学部分を含有するよう、また他の方法でその安定性、製剤及び／または治療上の特性を改善するよう、誘導体化することができる。そのような部分についての非網羅的概要は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000) に見出すことができる。

【0220】

A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸及びそれらの発現

30

A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸分子及び核酸分子の組み合わせもまた提供される。いくつかの実施形態では、核酸分子は、完全長抗 A c t R I I 抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I 抗体をコードする。さらなる実施形態では、本開示は、本明細書で提供される完全長抗 A c t R I I 抗体または A c t R I I 結合性抗体断片のバリエーションもしくは誘導体をコードする核酸分子を提供する。

【0221】

本明細書に開示される核酸分子は、RNA の形態または DNA の形態であり得る。DNA には、c DNA、ゲノム DNA、及び合成 DNA が含まれ、これらは二本鎖でも一本鎖でもあり得、一本鎖の場合は、コード鎖でも非コード（アンチセンス）鎖でもあり得る。ある特定の実施形態では、核酸分子は単離されている。追加の実施形態では、核酸分子は、実質的に純粋である。いくつかの実施形態では、核酸は、c DNA であるかまたは c DNA に由来する。いくつかの実施形態では、核酸は、組換えにより生成される。

40

【0222】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、宿主細胞またはインビトロにおいてコード配列の発現を制御する制御配列に機能的に連結された A c t R I I 結合性タンパク質コード配列を含む。特定の実施形態では、コード配列は c DNA である。本開示はまた、宿主細胞またはインビトロにおいてコード配列の発現を制御する制御配列に機能的に連結された A c t R I I 結合性タンパク質コード配列を含む核酸分子を含有するベクターに関する。

【0223】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、同じリーディングフレーム内で異種ポリヌクレ

50

オチド配列に融合されている成熟 A c t R I I 結合性タンパク質のためのコード配列を含む。いくつかの実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸分子（複数可）で形質転換された宿主細胞からの発現タンパク質の分泌を促進するリーダーペプチド配列をコードする。リーダー配列を含有するタンパク質は前駆体タンパク質と呼ばれ、リーダー配列を宿主細胞により切断させて成熟形態の A c t R I I 結合性タンパク質を形成することができる。そのようなリーダーペプチド配列及び宿主細胞での組換えタンパク質の分泌を促進するそれらの使用は一般に当該技術分野で公知である。追加の実施形態では、異種ポリヌクレオチド配列は、例えば、組換え発現された A c t R I I 結合性タンパク質の精製を容易にし、タンパク質の安定性及び／または治療もしくは診断の特性を追加もしくは改善するよう、機能することができる追加の 5' アミノ酸残基をコードする。

10

【0224】

いくつかの実施形態では、本開示は、ハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマーまたはシーケンシングプライマーとしての使用に十分である、A c t R I I 結合性タンパク質をコードする c D N A 断片等の単離された核酸を提供する。

【0225】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、(a) A c t R I I への結合に対して A c t R I I リガンドと競合する、(b) A c t R I I リガンドの存在下で、A c t R I I 及び同族 A c t R I を発現している細胞での A L K 4 及び／または A L K 7 のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I リガンドの存在下で、A c t R I I を発現している細胞での 1 つ以上の S m a d のリン酸化を減少させる、及び (d) A c t R I I に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D （例えば、B I A C O R E（登録商標）分析により決定した場合）で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する A c t R I I 結合性タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、コードされた A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、コードされた A c t R I I 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。いくつかの実施形態では、コードされた A c t R I I 結合性タンパク質は、本明細書に開示される A c t R I I 結合性の V H と V L の対を有する抗体と、A c t R I I への結合に対して競合する。追加の実施形態では、コードされた A c t R I I 結合性タンパク質は、本明細書に開示される抗体と同じ A c t R I I のエピトープに結合する。

20

30

【0226】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、A c t R I I A と特異的に結合する A c t R I I 結合性タンパク質をコードし、(a) A c t R I I A リガンド（例えば、アクチビン A、アクチビン B、G D F 1、G D F 3、または N o d a l）と競合する、(b) A c t R I I A リガンド（例えば、アクチビン A）の存在下で、A c t R I I A と、A L K 4 及び／または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び／または A L K 7 のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I A リガンドの存在下で、A c t R I I A を発現している細胞での 1 つ以上の S m a d のリン酸化を減少させる、及び (d) A c t R I I A に、1 n M 以下かつ 1 p M 以上の K_D （例えば、B I A C O R E（登録商標）分析により決定した場合）で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも 1 つの特性を有する。いくつかの実施形態では、コードされた A c t R I I A 結合性タンパク質は、上記の特性のうち 2 つ、3 つ、または 4 つを有する。いくつかの実施形態では、コードされた A c t R I I A 結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも 2 つまたは少なくとも 3 つを有する。いくつかの実施形態では、コードされた A c t R I I A 結合性タンパク質は、A c t R I I A への結合に対して、本明細書に開示される A c t R I I A 結合性の V H と V L の対を有する抗体と競合する。追加の実施形態では、コードされた A c t R I I A 結合性タンパク質は、本明細書に開示される抗体と同じ A c t R I I A のエピトープに結合する。さらなる実施形態では、核酸分子は、A c t R I I と特異的に結合し、かつ V H と V L を含む、A c t R I I A 結合性タンパク質をコードする。

40

50

【0227】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、A c t R I I Bと特異的に結合するA c t R I I結合性タンパク質をコードし、(a) A c t R I I Bへの結合をアクチビンA及び/またはG D F 8と競合する、(b) A c t R I I Bリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8)の存在下で、A c t R I I Bと、A L K 4及び/またはA L K 7とを発現している細胞でのA L K 4及び/またはA L K 7のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I Bリガンドの存在下で、A c t R I I Bを発現している細胞での1つ以上のS m a dのリン酸化を減少させる、及び(d) A c t R I I Bに、1 n M以下かつ1 p M以上のK_D(例えば、B I A C O R E(登録商標)分析により決定した場合)で結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する。いくつかの実施形態では、コードされたA c t R I I B結合性タンパク質は、上記の特性のうち2つ、3つ、または4つを有する。いくつかの実施形態では、コードされたA c t R I I B結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも2つまたは少なくとも3つを有する。いくつかの実施形態では、コードされたA c t R I I B結合性タンパク質は、A c t R I I Bへの結合に対して、本明細書に開示されるA c t R I I B結合性のV HとV Lの対を有する抗体と競合する。追加の実施形態では、コードされたA c t R I I B結合性タンパク質は、本明細書に開示される抗体と同じA c t R I I Bのエピトープに結合する。さらなる実施形態では、核酸分子は、A c t R I I Bと特異的に結合し、かつV HとV Lを含む、A c t R I I B結合性タンパク質をコードする。

10

【0228】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと特異的に結合するA c t R I I結合性タンパク質をコードし、(a) A c t R I I B及びA c t R I I Aへの結合に対してアクチビンA及び/またはG D F 8と競合する、(b) A c t R I I A及び/またはA c t R I I Bリガンド(例えば、アクチビンA及び/またはG D F 8)の存在下で、A c t R I I A及び/またはA c t R I I Bと、A L K 4及び/またはA L K 7とを発現している細胞でのA L K 4及び/またはA L K 7のリン酸化を減少させる、(c) A c t R I I A及び/またはA c t R I I Bリガンドの存在下で、A c t R I I A及び/またはA c t R I I Bを発現している細胞での1つ以上のS m a dのリン酸化を減少させる、及び(d) A c t R I I AまたはA c t R I I Bに、1 n M以下かつ1 p M以上(例えば、B I A C O R E(登録商標)分析により決定した場合)のK_Dで結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する。いくつかの実施形態では、コードされたA c t R I I BとA c t R I I Aに結合性のタンパク質は、上記の特性のうち2つ、3つ、または4つを有する。いくつかの実施形態では、コードされたA c t R I I B結合性タンパク質は、上記の特性のうち少なくとも2つまたは少なくとも3つを有する。いくつかの実施形態では、コードされたA c t R I I BとA c t R I I Aに結合性のタンパク質は、A c t R I I B及びA c t R I I Aへの結合に対して、本明細書に開示されるA c t R I I BとA c t R I I Aに結合性のV HとV Lの対を有する抗体と競合する。追加の実施形態では、コードされたA c t R I I B結合性タンパク質は、本明細書に開示される抗体と同じA c t R I I AまたはA c t R I I Bのエピトープに結合する。さらなる実施形態では、核酸分子は、A c t R I I B及びA c t R I I Aと特異的に結合し、かつV HとV Lを含む、A c t R I I BとA c t R I I Aに結合性のタンパク質をコードする。

20

30

40

【0229】

本開示はまた、本明細書で提供されるA c t R I I B結合性タンパク質をコードする核酸及び核酸のセットを含有する、ベクター及びベクターのセットも提供する。これらの核酸、核酸のセット、ベクター、及びベクターのセットで形質転換された宿主細胞もまた提供され、A c t R I I結合性タンパク質を作製及び使用方法も提供される。

【0230】

いくつかの実施形態では、本開示は、上記で提供されるような核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせまたはベクターを含む宿主細胞を提供し、その場合、宿主細胞は、場合に

50

よって、A c t R I I に特異的に結合するA c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長A c t R I I B 抗体及びA c t R I I 結合性抗体断片等の、抗A c t R I I 抗体）を発現することができる。さらなる実施形態では、本開示は、上記で提供されるような核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせまたはベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、その場合、宿主細胞は、場合によっては、A c t R I I に特異的に結合するA c t R I I 結合性タンパク質を発現することができる。そのような宿主細胞は、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質を作製する方法で利用することができ、その場合、方法には、（a）宿主細胞を培養すること、及び（b）宿主細胞から発現されたA c t R I I 結合性タンパク質を単離することが含まれる。

【0231】

本開示はまた、好適な条件下でA c t R I I 結合性タンパク質を発現する能力がある宿主細胞（例えば、ハイブリドーマまたは形質転換された哺乳類宿主細胞）を培養することを含む、A c t R I I 結合性タンパク質を作製する方法も提供し、任意選択で、宿主細胞から分泌されたA c t R I I 結合性タンパク質を単離するための方法を提供する。また、本開示はさらに、本開示の方法を使用して単離されたA c t R I I 結合性タンパク質を提供する。

【0232】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、同じリーディングフレーム内で、例えば、コードされたポリペプチドの精製を可能にするマーカ配列に融合されている成熟A c t R I I 結合性タンパク質（複数可）（例えば、完全長抗体及びA c t R I I 結合性抗体断片等のA c t R I I 抗体）のためのコード配列（複数可）を含む。例えば、マーカ配列は、細菌宿主の場合は、マーカに融合させた成熟ポリペプチドの精製を提供するためのp Q E - 9ベクターにより供給されるヘキサ - ヒスチジンタグ（配列番号94）であり得、また哺乳類宿主（例えば、C O S - 7細胞）が使用される場合には、マーカ配列は、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン（H A）タグであり得る。

【0233】

抗A c t R I I 抗体及びA c t R I I 結合性抗体断片等のA c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸バリエーションもまた提供される。核酸バリエーションは、コード領域、非コード領域、またはその両方においての改変を含有することができる。いくつかの実施形態では、核酸バリエーションは、サイレントな置換、付加、または欠失を生じさせるがコードされたポリペプチドの特性もしくは活性は変化させない改変を含有する。いくつかの実施形態では、核酸バリエーションは、遺伝暗号の縮重によるサイレント置換により生成される。核酸バリエーションは、例えば、特定の宿主についてコドン発現を最適化する（ヒトm R N A のコドンをE . c o l i等の細菌宿主に好ましいコドンに変更する）ため等、様々な理由で生成され得る。本明細書に記載される核酸を含むベクター及び細胞もまた提供される。

【0234】

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長抗体及びA c t R I I 結合性抗体断片等の抗A c t R I I 抗体）をコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドシンセサイザーを使用する化学合成により構築される。そのようなオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列及び宿主細胞の選択性に基づいたコドン最適化に基づいて設計することができる。A c t R I I 結合性タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド配列を合成するために、標準的方法を日常的に適用することができる。

【0235】

（合成、部位特異的変異誘発または別の方法により）構築された時点で、A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸配列は、日常的に、所望宿主でのA c t R I I 結合性タンパク質の発現に適切な制御配列に機能的に連結させることができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質をコードする核酸配列は、発現ベクターに挿入され、所望宿主でのタンパク質の発現に適切な制御配列に機能的に連結される。導入遺伝子の高発現量を宿主において得るために、遺伝子を、選択した発現宿主で機能的な、転写

10

20

30

40

50

及び翻訳の発現制御配列に機能的に連結させるかまたは会合させることができる。

【 0 2 3 6 】

ある特定の実施形態では、抗 A c t R I I B 抗体、抗 A c t R I I A 抗体、A c t R I I B 結合性抗体断片、または A c t R I I A 結合性抗体断片等の、A c t R I I 結合性タンパク質をコードする D N A を増幅及び発現させるために、組換え発現ベクターが使用される。組換え発現ベクターは、哺乳類、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子に由来する好適な転写もしくは翻訳の調節エレメントに機能的に連結された A c t R I I 結合性タンパク質のポリペプチド鎖をコードする、合成または c D N A 由来の D N A 断片を有する複製可能な D N A コンストラクトである。転写ユニットは一般に、以下で詳述されるように、(1) 遺伝子発現において調節的役割を担う遺伝要素 (複数可) 、例えば、転写のプロモーターまたはエンハンサーと、(2) m R N A に転写されタンパク質に翻訳される、構造配列またはコード配列と、(3) 適切な転写及び翻訳の、開始配列及び終結配列との構築体を含む。そのような調節エレメントには、転写を制御するオペレーター配列が含まれ得る。通常は複製起点により付与される宿主での複製能、及び形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子をさらに組み込むことができる。D N A 領域は、それらが互いに機能的に関連している場合、機能的に連結されている。例えば、シグナルペプチド (分泌リーダー) の D N A は、あるポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現されている場合、そのポリペプチドの D N A に機能的に連結されており、プロモーターは、それがコード配列の転写を制御している場合、その配列に機能的に連結されており、またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするような位置にある場合、コード配列に機能的に連結されている。酵母発現系での使用が意図される構造要素には、翻訳されたタンパク質の宿主細胞による細胞外分泌を可能にするリーダー配列が含まれる。別法として、組換えタンパク質が、リーダー配列または輸送配列を含まずに発現される場合、タンパク質には、N 末端メチオニン残基が含まれ得る。この残基は、任意選択で、最終タンパク質が提供されるようにその後、発現した組換えタンパク質から切断され得る。ある特定の実施形態では本開示は、上記または本明細書の他の箇所に記載されるような核酸またはベクターを含み、任意選択で 1 つ以上の、担体、希釈剤、添加剤、または他の添加物をさらに含む、組成物、例えば、医薬組成物を提供する。

【 0 2 3 7 】

また、本明細書に開示される核酸分子もしくは c D N A 分子及び / またはベクターで形質転換された宿主細胞も提供される。本開示はまた、開示の核酸分子かまたは制御配列に機能的に連結され、任意選択でベクターに挿入された分子で形質転換された宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳類宿主細胞である。さらなる実施形態では、哺乳類宿主細胞は、N S 0 マウス骨髓腫細胞、P E R . C 6 (登録商標) ヒト細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である。他の実施形態では、宿主細胞は、ハイブリドーマである。

【 0 2 3 8 】

追加の実施形態では、本開示は、A c t R I I 結合性タンパク質を産生するための好適な条件下で、本明細書に開示される形質転換された宿主細胞またはハイブリドーマを培養することを含む、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、完全長 A c t R I I 抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I 抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体) を作製するための方法を提供する。本開示は、任意選択で、宿主細胞から分泌された A c t R I I 結合性タンパク質を単離することを提供する。本開示はまた、任意選択で、この方法を使用して生成された A c t R I I 結合性タンパク質、ならびに A c t R I I 結合性タンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【 0 2 3 9 】

発現制御配列及び発現ベクターの選択は、宿主の選択に応じて異なる。多種多様な発現宿主 / ベクターの組み合わせを利用することができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターには、例えば、S V 4 0、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、及びサイトメガ

10

20

30

40

50

ロウイルスからの発現制御配列を含むベクターが含まれる。細菌宿主に有用な発現ベクターには、pCR1、pBR322、pMB9及びそれらの誘導体が含まれるE.coli由来プラスミドのような既知の細菌プラスミド、またM13及び他の繊維状1本鎖DNAファージ等の広宿主域プラスミドが含まれる。

【0240】

ActRII結合性タンパク質の発現に好適な宿主細胞としては、適切なプロモーター制御下の原核生物、酵母、昆虫または高等真核生物の細胞が挙げられる。原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性の生物、例えば、E.coliまたは桿菌が含まれる。高等真核細胞には、以下に記載の哺乳類由来の樹立細胞株が含まれる。無細胞翻訳系もまた使用でき得る。抗体産生を含め、タンパク質産生の方法に関する追加情報は、例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国出願公開第2008/0187954号、米国特許第6,413,746号及び同第6,660,501号、ならびに国際出願公開第WO04/009823号に見出すことができる。

10

【0241】

様々な哺乳類細胞または昆虫細胞の培養系もまた、組換えActRII結合性タンパク質（例えば、完全長ActRII抗体及びActRII結合性抗体断片等の、抗ActRII抗体、ならびにそのパリアント及び誘導体）を発現させるために有利に使用することができる。哺乳類細胞での組換えActRII結合性タンパク質の発現は、そのようなタンパク質が一般に正確に折り畳まれ、適切に修飾され、また完全に機能的であることから、実施可能である。好適な哺乳類宿主細胞株の例としては、HEK-293及びHEK-293T、Gluzman (Cell 23:175 (1981))で記載されているサル腎細胞のCOS-7株、ならびに、例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLa及びBHK細胞株等の他の細胞株が挙げられる。哺乳類発現ベクターは、非転写要素、例えば、複製起点、発現対象遺伝子に連結された適切なプロモーターとエンハンサー、及び5'または3'に隣接する他の非転写配列等、ならびに5'または3'の非翻訳配列、例えば、必要な、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位とスプライスアクセプター部位、及び転写終結配列等を含むことができる。昆虫細胞での異種タンパク質の産生のためのバキュロウイルス系は、Luckow and Summers, BioTechnology 6:47 (1988)で概説されている。

20

30

【0242】

形質転換された宿主細胞またはハイブリドーマにより産生されるActRII結合性タンパク質は、任意の好適な方法に従って精製することができる。そのような標準的方法としては、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、及びサイズ調整カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、分別溶解法、または他の任意の標準的タンパク質精製技術が挙げられる。適切なアフィニティークラムを通過させることで容易に精製できるよう、ヘキサヒスチジン（配列番号94）、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等のアフィニティータグをタンパク質に結合させることができる。ActRII結合性タンパク質は、タンパク質分解、核磁気共鳴及びX線結晶解析のような技術を使用して物理的に特徴付けることもできる。

40

【0243】

例えば、組換えActRII結合性タンパク質を培地中に分泌する系からの上清は市販されているタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外ろ過ユニットを使用して最初に濃縮することができる。濃縮ステップに続き、濃縮物を適切な精製マトリックスに適用することができる。別法として、陰イオン交換樹脂、例えば、ペンダントのジエチルアミノエチル(DEAE)基を有するマトリックスまたは基質を使用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製に一般的に用いられる他の種類のマトリックスであり得る。別法として、陽イオン交換ステップを使用することができる

50

。好適な陽イオン交換体には、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスが含まれる。最後に、疎水性 R P - H P L C 媒体、例えば、ペンダントのメチル基または他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する 1 つ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー (R P - H P L C) ステップを使用して、A c t R I I 結合性タンパク質をさらに精製することができる。上述の精製ステップの一部または全部は、様々な組み合わせで、均一な組換え A c t R I I 結合性タンパク質を得るために日常的に使用することもできる。

【 0 2 4 4 】

細菌培養で産生された組換え A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、完全長 A c t R I I 抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の抗 A c t R I I 抗体ならびにそのバリエーション及び誘導体) は、例えば、細胞ペレットからの最初の抽出、その後の 1 つ以上の、濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーのステップにより単離することができる。最終精製ステップでは高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を使用することができる。組換えタンパク質の発現で使用された微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含め、任意の好都合な方法で破壊することができる。

【 0 2 4 5 】

完全長抗体及び抗原結合性抗体断片等の標的結合性タンパク質を精製するための当該技術分野で公知の方法には、例えば、米国出願公開第 2 0 0 8 / 0 3 1 2 4 2 5 号、同第 2 0 0 8 / 0 1 7 7 0 4 8 号、及び同第 2 0 0 9 / 0 1 8 7 0 0 5 号に記載のものも含まれ、その各々は、本明細書で参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 2 4 6 】

ある特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は抗体ではない。タンパク質標的に高親和性で結合する非抗体ポリペプチドを同定及び生成するための様々な方法が知られている。例えば、その各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、S k e r r a , C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . 1 8 : 2 9 5 - 3 0 4 (2 0 0 7)、H o s s e e t a l . , P r o t e i n S c i e n c e 1 5 : 1 4 - 2 7 (2 0 0 6)、G i l l e t a l . , C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . 1 7 : 6 5 3 - 6 5 8 (2 0 0 6)、N y g r e n , F E B S J . 2 7 5 : 2 6 6 8 - 2 6 7 6 (2 0 0 8)、及び S k e r r a , F E B S J . 2 7 5 : 2 6 7 7 - 2 6 8 3 (2 0 0 8) を参照のこと。ある特定の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質を同定 / 生成するためにファージディスプレイ技術が使用される。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、プロテイン A、リボカリン、フィブロネクチンドメイン (例えば、フィブロネクチン I I I 型 (F n 3))、コンセンサスアンキリン反復ドメイン、及びチオレドキシンからなる群から選択される種類のタンパク質足場を含む。

【 0 2 4 7 】

使用方法及び医薬組成物

提供される A c t R I I 結合性タンパク質 (抗体、免疫複合体、及びポリペプチドを含む) は、様々な用途において有用であり、それらには、A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、抗 A c t R I I B 及び A c t R I I A 抗体) を用いた様々な疾患及び状態の診断方法ならびにそれらを治療及び / または改善する方法が含まれるが、これらに限定されない。A c t R I I (例えば、A c t R I I B 及び / または A c t R I I A) シグナル伝達及び / または A c t R I I 発現増加と関連する疾患もしくは状態を有する対象を治療するための、A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、A c t R I I と特異的に結合する完全長抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I 抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体) の使用のための方法が提供される。追加の実施形態では、本開示は、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質と薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、医薬品として使用するための、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質と薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。本開示はまた、A c t R I I、A c t R I I 発現増加

10

20

30

40

50

及び／またはA c t R I I シグナル伝達増大と関連する疾患もしくは状態を治療及び／または改善するための本明細書に開示される医薬組成物の使用も提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物を使用して治療される疾患または状態は、疾患または不使用による筋肉消耗等の筋障害である。追加の実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物を使用して治療される疾患または状態は、線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び／または眼の線維性状態）；炎症性、心血管、肺、筋骨格、神経、もしくは代謝性の疾患または状態；創傷治癒；あるいはがんである。

【0248】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I B と特異的に結合する完全長抗体及びA c t R I I A と特異的に結合する完全長抗体）及び薬学的に許容される担体を含み、標識基またはエフェクター基をさらに含む。「標識」とは、スクリーニングで検出を可能にするためにより結合された1つ以上の元素、同位体、または化学物質を指す。標識は一般に、3つのクラス、すなわち、（a）放射性または重同位体であり得る同位体標識、（b）蛍光色素及び比色色素、または他の標識方法を可能にするビオチン等の分子が含まれ得る小分子標識、及び（c）抗体により認識される融合パートナーとして組み込まれるエピトープであり得る免疫標識に分類され、「標識基」とは、任意の検出可能な標識を指す。いくつかの実施形態では、標識基は、潜在的な立体障害が低減されるようスペーサー（例えば、ペプチドスペーサー）を介してA c t R I I 結合性タンパク質に結合される。標識は、どの位置でも化合物に組み込まれ得、また、タンパク質発現中にインビトロまたはインビボのいずれでも組み込まれ得る。タンパク質を標識するための様々な方法が当該技術分野で公知であり、提供される方法を実施する際に使用され得る。追加の実施形態では、標識基は、同位体標識、磁気標識、酸化（線維化を減少させる）活性部分、光学色素、ビオチン化基及び二次レポーターにより認識されるポリペプチドエピトープからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標識基は、緑色蛍光タンパク質またはその誘導体（例えば、高感度G F P、青色蛍光タンパク質またはその誘導体（例えば、E B F P（高感度青色蛍光タンパク質）、E B F P 2、A z u r i t e、m K a l a m a 1、シアン蛍光タンパク質またはその誘導体（例えば、E C F P（高感度シアン蛍光タンパク質）、C e r u l e a n、C y P e t）、黄色蛍光タンパク質またはその誘導体（例えば、Y F P、C i t r i n e、V e n u s、Y P e t）等の蛍光タンパク質である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドエピトープは、ビオチンシグナル伝達ペプチド、ヒスチジンペプチド（h i s）、ヘマグルチニン（H A）、F l a g、金結合ペプチドから選択されるメンバーである。追加の実施形態では、エフェクター基は、放射性同位体、放射性ヌクレオチド、毒素、治療剤及び化学療法剤からなる群から選択される。

【0249】

本開示のA c t R I I 結合性タンパク質は、インビトロ及びインビボでの診断上及び治療上の有用性において応用される。例えば、A c t R I I 結合性タンパク質は、様々な疾患もしくは状態を、治療、予防または診断するために、例えば、インビトロもしくはインビボで培養中の細胞、または対象の細胞に投与することができる。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、ヒト抗体、マウス抗体、またはヒト化抗体である。

【0250】

A c t R I I 活性を阻止する方法も提供される。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I を、A c t R I I 結合性タンパク質と接触させることを含む。いくつかの例では、方法はインビボで実施される。他の場合には、方法はインビトロで実施される。いくつかの実施形態では、阻止されるA c t R I I 活性は、（a）A c t R I I リガンド（例えば、アクチビンA、アクチビンB、G D F 8（ミオスタチン）、G D F 1 1、B M P 6、G D F 3、B M P 9、またはB M P 1 0）による結合、（b）アクチビンAの存在下でA c t R I I を発現している細胞での1つ以上のS m a dのリン酸化、（c）A c t R I I リガンドの存在下で、A c t R I I と、A L K 4 及び／またはA L K 7 とを発現している細胞でのA L K 4 及び／またはA L K 7 のリン酸化、から選択される。

【0251】

いくつかの態様では、A c t R I I A 活性を阻止する方法が提供される。さらなる実施形態では、方法は、A c t R I I A を、A c t R I I A 結合性タンパク質と接触させることを含む。いくつかの例では、方法はインビボで実施される。他の場合には、方法はインビトロで実施される。いくつかの実施形態では、阻止される A c t R I I A 活性は、(a) A c t R I I A リガンド (例えば、アクチビン A、アクチビン B、G D F 1、G D F 3、または N o d a l) による結合、(b) アクチビン A の存在下で A c t R I I A を発現している細胞での 1 つ以上の S m a d のリン酸化、(c) A c t R I I A リガンドの存在下で A c t R I I A と、A L K 4 及び / または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び / または A L K 7 のリン酸化、から選択される。

10

【0252】

いくつかの実施形態では、A c t R I I B 活性を阻止する方法が提供される。さらなる実施形態では、方法は、A c t R I I B を、A c t R I I B 結合性タンパク質と接触させることを含む。場合によっては、方法はインビボで実施される。他の場合には、方法はインビトロで実施される。いくつかの実施形態では、阻止される A c t R I I B 活性は、(a) A c t R I I B リガンド (例えば、アクチビン A、アクチビン B、G D F 8 (ミオスタチン)、G D F 1 1、B M P 6、G D F 3、B M P 9、または B M P 1 0) による結合、(b) アクチビン A の存在下で A c t R I I A を発現している細胞での 1 つ以上の S m a d のリン酸化、(c) A c t R I I B リガンドの存在下で A c t R I I A と、A L K 4 及び / または A L K 7 とを発現している細胞での A L K 4 及び / または A L K 7 のリン酸化、から選択される。

20

【0253】

一態様では、本開示は、A c t R I I 発現及び / または A c t R I I シグナル伝達上昇と関連する、疾患もしくは状態を有するか、または疾患もしくは状態を発症するリスクがある対象に対し、A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、A c t R I I B と特異的に結合する完全長抗体及び A c t R I I A と特異的に結合する完全長抗体) を投与することを、含む、疾患または状態の治療、予防及び / または改善を提供する。いくつかの実施形態では、治療には、対象からの分離された組織または細胞への A c t R I I 結合性タンパク質の投与が含まれ、その場合、対象は、A c t R I I 発現または A c t R I I シグナル伝達と関連する、疾患もしくは状態を有するか、または疾患もしくは状態を発症するリスクがある。A c t R I I 発現もしくは A c t R I I シグナル伝達と関連する疾患または状態の治療のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

30

【0254】

本開示は、A c t R I I 結合性タンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。対象における A c t R I I (例えば、A c t R I I A または A c t R I I B) 媒介性の活性と関連する状態を治療及び / または改善するための方法であって、それを必要とする対象に対し、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物を有効量にて投与することを含む方法もまた提供される。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、単独で投与される。他の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、併用療法として投与される。対象での A c t R I I 活性を低下させる方法であって、有効量の A c t R I I 結合性タンパク質を投与することを必要とする対象に、それを行うことを含む方法も提供される。

40

【0255】

本開示はまた、筋障害と関連する疾患もしくは状態を治療及び / または改善する方法も提供する。いくつかの実施形態では、筋障害は、消耗性である。さらなる実施形態では、消耗性は、疾患または不使用による。いくつかの実施形態では、方法は、それを必要とする対象に対し、有効量の、A c t R I I 結合性タンパク質 (例えば、A c t R I I B と特異的に結合する抗体、A c t R I I A と特異的に結合する抗体、または A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合する抗体) を含む医薬組成物を投与することを含む。追

50

加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、単独、または併用療法として投与される。

【 0 2 5 6 】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、対象での骨格筋形成を誘導する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I B 結合性タンパク質（例えば、完全長 A c t R I I B 抗体及び A c t R I I B 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I B 抗体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法により、対象での筋量と筋力が増加する。

【 0 2 5 7 】

本開示はまた、対象における、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び／または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症（I P F）等）；代謝性疾患（例えば、I I 型糖尿病インスリン抵抗性、高血糖症、及び肥満）；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患（例えば、うっ血性心不全、及び高血圧）；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、例えば、骨粗鬆症等；神経疾患；創傷治癒；体重減少；及びがん（例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌）と関連する疾患もしくは状態を治療及び／または改善する方法も提供する。いくつかの実施形態では、方法は、それを必要とする対象に対し、有効量の、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I B と特異的に結合する抗体、A c t R I I A と特異的に結合する抗体、または A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合する抗体）を含む医薬組成物を投与することを含む。追加の実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、単独、または併用療法として投与される。A c t R I I 発現または A c t R I I シグナル伝達と関連する、疾患もしくは状態を有するかまたは疾患もしくは状態を発症するリスクのある対象を治療することに関する使用のための A c t R I I 結合性タンパク質がさらに提供される。

【 0 2 5 8 】

本開示はまた、対象でのシグナル伝達等の A c t R I I （例えば、A c t R I I A または A c t R I I B ）の活性を低下させる方法も提供する。いくつかの実施形態では、方法は、それを必要とする対象（例えば、筋肉消耗；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び／または眼の線維性状態）；炎症性、心血管、肺、筋骨格（すなわち、骨及び／または筋肉）、神経、もしくは代謝性の疾患または状態；創傷治癒；またはがんであると診断された対象）に対し、有効量の A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I B と特異的に結合する抗体、A c t R I I A と特異的に結合する抗体、または A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合する抗体）または有効量の、A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物を投与することを含む。

【 0 2 5 9 】

一態様では、本開示は、対象における筋障害を治療及び／または改善する方法を提供する。場合によっては、方法は、筋障害を有する対象に、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I B と特異的に結合する抗体、A c t R I I A と特異的に結合する抗体、または A c t R I I B 及び A c t R I I A と特異的に結合する抗体）を投与することを含む。他の実施形態では、対象は、筋障害を発症するリスクがある。いくつかの実施形態では、筋肉の障害または状態は、筋萎縮である。さらなる実施形態では、筋萎縮は、コルチゾール、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、またはプレドニゾンによる治療等のグルココルチコイド治療と関連する状態である。追加の実施形態では、筋萎縮は、神経外傷と関連するか、または変性、代謝性、もしくは炎症性のニューロパチー（例えば、ギラン・バレー症候群、末梢神経障害、または環境毒素もしくは薬物への曝露）の結果と関連する状態である。追加の実施形態では、筋萎縮は、成人運動ニューロン疾患、乳児脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、若年性脊髄性筋萎縮症、多巣性伝導ブロック（c o n d u c t o r b l o c k ）を伴う自己免疫性運動ニューロパチー、脳卒中もしくは脊髄損傷による麻痺、骨格の不動化で、外傷、長期の床上安

10

20

30

40

50

静、自発的不活動、強制不活動、代謝性負荷もしくは栄養不足によるもの、がん、A I D S、絶食、甲状腺障害、糖尿病、良性先天性筋緊張低下、セントラルコア病、熱傷、慢性閉塞性肺疾患、肝疾患（例として線維症、肝硬変等）、敗血症、うっ血性心不全、加齢、宇宙旅行またはゼロ重力環境で費やした時間と関連する状態である。

【 0 2 6 0 】

いくつかの実施形態では、治療及び／または改善される筋障害は、ミオパチーと関連する筋萎縮である。さらなる実施形態では、ミオパチーは、ミトコンドリアミオパチー；糖原病もしくは脂質蓄積症によって引き起こされる代謝性ミオパチー、先天性ミオパチー、例えば、ネマリンミオパチー、マルチ／ミニコアミオパチー及びミオチュブラー（中心核）ミオパチー；ミオトニー；家族性周期性麻痺；及び炎症性ミオパチーからなる群から選択される。追加の実施形態では、ミオパチーは、筋ジストロフィー症候群、例えば、デュシェンヌ型、ベッカー型、筋緊張症、顔面肩甲上腕型、福山型、肢帯型、肩甲上腕型、エメリー・ドレフェス型、眼咽頭型等、シャルコー・マリー・トゥース病（C M T）、先天性筋ジストロフィー、または遺伝性遠位型ミオパチーと関連する状態である。封入体筋炎、ミオグロビン尿症、横紋筋融解症、骨化性筋炎、多発性筋炎、または皮膚筋炎を治療するために、提供される A c t R I I 結合性タンパク質が使用され得る。さらに、提供される A c t R I I 結合性タンパク質は、グルココルチコイド治療、筋肉減少症、長期の床上安静、骨格の不動化、敗血症、またはうっ血性心不全から生じる筋萎縮を治療または予防し得る。

【 0 2 6 1 】

別の態様では、本開示は、筋ジストロフィーを治療及び／または改善する方法を提供する。「筋ジストロフィー」という用語は、骨格筋のほか、ときに心筋及び呼吸筋の段階的な衰弱及び悪化により特徴付けられる変性筋疾患の一群を指す。本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質及び医薬組成物により治療及び／または改善され得る例示的筋ジストロフィーとしては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（D M D）、ベッカー型筋ジストロフィー（B M D）、エメリー・ドレフェス型筋ジストロフィー（E D M D）、肢帯型筋ジストロフィー（L G M D）、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（F S HまたはF S H D）（ランドウジー・デジュリンとしても知られる）、筋緊張症筋ジストロフィー（M M D）（シュタイネルト病としても知られる）、眼咽頭型筋ジストロフィー（O P M D）、遠位型筋ジストロフィー（D D）、先天性筋ジストロフィー（C M D）、及び肩甲上腕型筋ジストロフィー（S M D）が挙げられる。

【 0 2 6 2 】

別の態様では、本開示は、線維性状態（例えば、線維症）を治療及び／または改善する方法を提供する。場合によっては、方法は、線維性状態を有する対象に、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I Bと特異的に結合する抗体、A c t R I I Aと特異的に結合する抗体、またはA c t R I I B及びA c t R I I Aと特異的に結合する抗体）を投与することを含む。他の実施形態では、対象は、線維性状態を発症するリスクがある。さらなる実施形態では、線維性状態は、D Nである。いくつかの実施形態では、治療される線維性状態は、原発性の線維症である。いくつかの実施形態では、治療される線維性状態は、特発性である。いくつかの実施形態では、線維性状態は、慢性である。いくつかの実施形態では、治療される線維性状態は、全身性である。他の実施形態では、治療される線維性の疾患または状態は、疾患（例えば、感染症、炎症性疾患、自己免疫疾患、悪性もしくはがん性疾患、及び／または結合疾患）；毒素；傷害（例えば、環境ハザード（例えば、アスベスト、炭塵、多環芳香族炭化水素）、喫煙、創傷）；または医学的処置（例えば、外科的切開、化学療法または放射線）と関連する（例えば、続発する）状態である。

【 0 2 6 3 】

本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質により治療及び／または改善され得る線維性状態としては、線維症、肝損傷（例えば、アルコール、ならびにB型及びC型肝炎等のウイルス感染症によって引き起こされる肝臓の損傷）、肺線維症（例えば、喫煙

10

20

30

40

50

、環境ハザード及びブレオマイシン等の化学療法薬によって引き起こされる、嚢胞性線維症、ＩＰＦまたは肺線維症）、放射線誘発性線維症、注射に伴う線維症、血管の線維症、アテローム性動脈硬化、脾線維症、筋骨格の線維症（例えば、筋線維症）、心筋線維症、皮膚線維症、強皮症、眼部の線維症（例えば、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫、糖尿病網膜症、及びドライアイ）、進行性全身性硬化症（ＰＳＳ）、慢性移植片対宿主病、ペイロニー病、膀胱鏡検査後の尿道狭窄、後腹膜線維症、縦隔線維症、進行性塊状線維症、増殖性線維症、腫瘍性線維症、デュピュイトラン病、狭窄、胸膜線維症、サルコイドーシス、脊髄の損傷／線維症、及び骨髄線維症が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２６４】

対象での線維症を軽減させる方法も提供される。いくつかの実施形態では、本開示は、線維症を有する対象にＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質（例えば、本明細書に記載される医薬組成物にしたもの）を投与することを含む、対象での線維症を軽減させる方法を提供する。そのように軽減された線維症は、例えば、線維症軽減、ならびに、例えば、線維性病変の発症の減少、体重減少もしくは他の臨床症状の減少、及び／または治療される線維性状態の発症と関連する生体分子発現（例えば、ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現）の変化を含む、線維症と関連する徴候もしくは状態の減少に反映され得る。いくつかの実施形態では、線維症は、肝、筋肉、または肺の線維症である。線維症の治療のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

【０２６５】

別の態様では、本開示は、細胞または組織の線維化を減少させる方法を提供する。方法には、線維性の細胞または組織と、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質（例えば、単独で、または別の薬剤もしくは治療様式と組み合わせるとを、線維化を減少させるかまたは阻害するのに十分な量で接触させることが含まれる。これらの方法は、インピトロでもインピボでも行うことができる。いくつかの実施形態では、方法は、インピボで、例えば、哺乳類対象（例えば、動物モデル）で行われる。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、線維化を減少させることには、（ａ）組織線維化の形成もしくは沈着を減少させるかまたは阻害すること、（ｂ）線維性病変の、大きさ、細胞充実性（例えば、線維芽細胞または免疫細胞の数）、組成；もしくは細胞内容物を、減少させること、（ｃ）線維性病変のコラーゲン量もしくはヒドロキシプロリン量を減少させること、及び／または（ｄ）１つ以上の線維形成性タンパク質の発現もしくは活性を低下させること、及び／または（ｅ）炎症反応と関連する線維化を減少させること、が含まれる。いくつかの実施形態では、線維化を減少させることには、（ａ）組織線維化の形成もしくは沈着を減少させるかまたは阻害すること、（ｂ）線維性病変の、大きさ、細胞充実性（例えば、線維芽細胞または免疫細胞の数）、組成；もしくは細胞内容物を、減少させること、（ｃ）線維性病変のコラーゲン量もしくはヒドロキシプロリン量を減少させること、（ｄ）１つ以上の線維形成性タンパク質の発現もしくは活性を低下させること、及び／または（ｅ）炎症と関連する線維化を減少させること、が含まれる。

【０２６６】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、対象における肝機能または肺機能の喪失を抑制する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、ＡｃｔＲＩＩ結合性タンパク質（例えば、完全長ＡｃｔＲＩＩ抗体及びＡｃｔＲＩＩ結合性抗体断片等の、抗ＡｃｔＲＩＩ抗体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法により、対象における肝機能の喪失が抑制される。さらなる実施形態では、方法により、肝線維症の軽減を介して対象における肝機能の喪失が抑制される。いくつかの実施形態では、方法により、対象における肺機能の喪失が抑制される。いくつかの実施形態では、方法により、肺線維症の軽減を介して対象における肺機能の喪失が抑制される。いくつかの実施形態では、方法により、特発性肺線維症（ＩＰＦ）を有するかまたは発症するリスクのある対象における肺機能及び／または肺線維症の喪失が抑制される。

【０２６７】

さらに、対象での線維化を減少させることによって肝機能または肺機能を改善する方法が提供される。場合によっては、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長 A c t R I I 抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I 抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体）または本明細書で提供される医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、肝機能または肺機能について、喪失を抑制すること、または改善することには、（ a ）対応する器官において組織線維化の形成もしくは沈着を減少させるかまたは阻害すること、（ b ）対応する器官において、線維性病変の、大きさ、細胞充実性（例えば、線維芽細胞または免疫細胞の数）、組成；もしくは細胞内容物を、減少させること、（ c ）対応する器官において線維性病変のコラーゲン量もしくはヒドロキシプロリン量を減少させること、（ d ）対応する器官において1つ以上の線維形成性タンパク質（例えば、フィブリノゲン及びコラーゲン）の発現もしくは活性を低下させること、（ d ）対応する器官において発現細胞外マトリックス及び/または E M T を減少させること、及び/または（ e ）対応する器官において炎症反応と関連する線維化を減少させること、が含まれる。

10

【 0 2 6 8 】

人体は、外傷及び損傷に対して瘢痕化により反応する。過剰な瘢痕化により特徴付けられる障害の一種である線維化は、正常な創傷治癒反応が乱れている場合に起こる。線維化の間、創傷治癒反応は継続し、コラーゲンの過剰な産生と沈着を引き起こす。別の実施形態では、本開示は、線維症を治療するための方法であって、それを必要とする対象に治療的有効量の A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I B と特異的に結合する抗体または A c t R I I A と特異的に結合する抗体）を投与することを含む方法を提供する。

20

【 0 2 6 9 】

いくつかの態様では、本開示は、肝機能または肺機能について、喪失を抑制するかまたは改善する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法により、（ a ）対応する器官において組織線維化の形成もしくは沈着を減少させるかまたは阻害すること、（ b ）対応する器官において、線維性病変の、大きさ、細胞充実性（例えば、線維芽細胞または免疫細胞の数）、組成；もしくは細胞内容物を、減少させること、（ c ）対応する器官において線維性病変のコラーゲン量もしくはヒドロキシプロリン量を減少させること、（ d ）対応する器官において1つ以上の線維形成性タンパク質（例えば、フィブリノゲン及びコラーゲン）の発現もしくは活性を低下させること、（ d ）対応する器官において発現細胞外マトリックス及び/または E M T を減少させること、及び/または（ e ）対応する器官において炎症反応と関連する線維化を減少させること、がもたらされる。

30

【 0 2 7 0 】

本開示はまた、肺の線維性状態を治療及び/または改善する方法も提供する。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、A c t R I I と特異的に結合する抗体及びその断片等の、抗 A c t R I I 抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体）を、肺の線維性状態を有するかまたは発症するリスクのある対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、肺線維症は、特発性、薬理的誘発性、放射線誘発性、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、または慢性喘息である。治療され得る肺の線維性状態には、通常型間質性肺炎（U I P）、間質性肺疾患、特発性線維化肺肺炎（C F A）、及び気管支拡張症からなる群の1つ以上のメンバーが含まれる。いくつかの実施形態では、治療される肺の線維性状態は、肺の炎症性疾患、例えば、喘息、及び/または慢性閉塞性肺疾患（C O P D）と関連する状態である。

40

【 0 2 7 1 】

特定の実施形態では、本開示は、肺線維症を有するかまたは発症するリスクのある対象に A c t R I I 結合性タンパク質を投与することを含む、肺線維症を治療及び/または改善する方法を提供する。肺線維症の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

【 0 2 7 2 】

50

いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、及び抗 A c t R I I A 抗体及び抗 A c t R I I B 抗体）により治療される肺の線維性状態は、急性呼吸促進症候群、慢性喘息、急性肺症候群、気管支肺異形成、肺高血圧症（例えば、特発性肺高血圧症（I P H））、ヒスチオサイトーシス X 塵肺、カプラン病、リウマチ様疾患、及び全身性硬化症からなる群から選択されるメンバーである。

【0273】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、及び抗 A c t R I I A 抗体及び抗 A c t R I I B 抗体）により治療される肺の線維性状態は、自己免疫性結合組織障害と関連する状態である。いくつかの実施形態では、自己免疫性結合組織障害は、サルコイドーシス 関節リウマチ、強皮症及び全身性エリテマトーデス（S L E）からなる群から選択される。追加の実施形態では、肺の線維性状態は、疾患、毒素、傷害、または医学的処置と関連する状態である。したがって、いくつかの実施形態では、肺の線維性状態は、職場ハザード（例えば、粉塵、アスベスト、シリカ、ボーキサイト、鉄、綿、タルク、及び炭塵）、毒素（例えば、アミオダロン、カルムスチン、クロラムフェニコール、ヘキサメトニウム）、タバコの煙、及び環境汚染物質の吸入等の、毒素及び刺激物質への曝露からなる群の1つ以上のメンバーと関連する状態である。追加の実施形態では、治療される肺の線維性状態は、感染症と関連する状態である。特定の実施形態では、感染症は、慢性感染症と関連する状態である。

10

【0274】

追加の実施形態では、治療される肺の線維性状態は、医学的処置と関連する状態である。特定の実施形態では、医学的処置は、手術、放射線療法、及び薬物療法から選択される。さらなる実施形態では、薬物療法は、化学療法である。さらなる実施形態では、化学療法は、プレオマイシン、メトトレキサート、アミオダロン、ブスルファン、ニトロソウレア、及びニトロフアントインから選択される化学療法薬の投与を伴う。

20

【0275】

肺高血圧症または特発性肺線維症（I P F）を治療及び/または改善する方法も提供される。場合によっては、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長 A c t R I I 抗体及び A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I 抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体）を、肺高血圧症または I P F を有するかまたは発症するリスクのある対象に投与することを含む。場合によっては、A c t R I I 結合性タンパク質または A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物は、肺高血圧症を治療する、予防する、及び/または改善するために投与される。場合によっては、A c t R I I 結合性タンパク質または A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物は、I P F を治療する、予防する、及び/または改善するために投与される。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質または A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物は、肺高血圧症もしくは I P F を有するかまたは発症するリスクのある対象に投与される。

30

【0276】

本開示はまた、肝臓の線維性状態を治療及び/または改善する方法も提供する。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質または有効量の、A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物を、肝臓の線維性状態を有するかまたは発症するリスクのある対象に投与することを含む。肝臓の線維性状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質を使用して治療され得る肝臓の線維性状態には、脂肪症（例えば、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H））、脂肪性肝疾患、胆汁うっ滞性肝疾患（例えば、原発性胆汁性肝硬変（P B C））、肝硬変、アルコール性肝線維症、感染誘導性の肝線維症、胆管損傷、胆管線維症、先天性肝線維症、自己免疫性肝炎、及び胆管症からなる群の1つ以上のメンバーが含まれる。さらなる実施形態では、感染誘導性の肝線維症は、細菌誘導性またはウイルス誘導性である。

40

【0277】

追加の一実施形態では、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質により治

50

療され得る肝臓の線維性状態は、ウイルス感染症（例えば、肝炎（C型、B型及びD型肝炎）、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、進行性塊状線維症、アルコール依存症、及び毒素または刺激物質（例えば、アルコール、医薬品及び環境毒素）への曝露、と関連する肝線維症からなる群の1つ以上のメンバーである。

【0278】

本開示はまた、心筋線維症を治療及び/または改善する方法も提供する。いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質または有効量の、A c t R I I 結合性タンパク質を含む医薬組成物を、心血管系の線維性状態を有するかまたは発症するリスクのある対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、心筋線維症は、心内膜心筋線維症または特発性心筋症である。いくつかの実施形態では、皮膚線維症は、強皮症、外傷後、術後の皮膚瘢痕化、ケロイド、または皮膚ケロイド形成である。いくつかの実施形態では、眼の線維化は、緑内障、眼の硬化、結膜瘢痕化、角膜瘢痕化、または翼状片である。いくつかの実施形態では、後腹膜線維症は、特発性、薬理的誘発性または放射線誘発性である。いくつかの実施形態では、嚢胞性線維症は、膵臓の嚢胞性線維症または肺の嚢胞性線維症である。いくつかの実施形態では、注射に伴う線維症が筋肉内注射の合併症として生じる。心血管系の線維性状態の線維性状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

10

【0279】

眼の疾患または状態を治療及び/または改善する方法であって、A c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む方法も提供される。特定の実施形態では、眼の疾患または状態は、緑内障である。いくつかの実施形態では、眼疾患は、網膜症である。さらなる実施形態では、眼疾患は、糖尿病網膜症である。

20

【0280】

追加の実施形態では、本開示は、眼の線維性状態（例えば、眼の線維化、眼部の線維症、及び網膜機能不全と関連する線維症）を治療及び/または改善する方法を提供する。したがって、場合によっては、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質を、眼の線維性状態を有するかまたは発症するリスクのある対象に投与することを含む。心血管系の線維性状態の線維性状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

30

【0281】

本明細書で提供される方法に従って治療され得る眼の線維性状態は、機械的創傷（例えば、アルカリによる熱傷と関連する線維化）または様々な代謝機能不全（例えば、炎症、虚血、及び変性疾患に対する反応を含む）等、損傷に反応して生じ得る。いくつかの実施形態では、本開示は、眼科手術と関連する線維症を治療するための方法を提供する。さらなる実施形態では、線維症は、眼科状態における術後瘢痕化と関連する状態である。さらなる実施形態では、術後瘢痕化は、網膜復位術、白内障摘出術またはドレーナージ手技を伴う手術と関連する状態である。

【0282】

いくつかの実施形態では、本開示は、黄斑浮腫（例えば、糖尿病黄斑浮腫）、ドライアイ、水晶体の線維化、角膜の間質または内皮の線維化、角膜及び結膜の瘢痕化、線維血管性の瘢痕化、網膜線維症、ならびに網膜グリオーシスからなる群の1つ以上のメンバーと関連する眼の線維性状態を治療及び/または改善する方法を提供する。

40

【0283】

いくつかの実施形態では、本開示は、黄斑変性と関連する眼の線維性状態を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、治療される線維性状態は、加齢黄斑変性と関連する状態である。いくつかの実施形態では、治療される状態は、滲出型黄斑変性と関連する状態である。他の実施形態では、治療される状態は、萎縮型黄斑変性と関連する状態である。

【0284】

50

いくつかの実施形態では、本開示は、炎症性の疾患または状態を治療及び／または改善するための方法を提供し、A c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。炎症性の疾患または状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。いくつかの実施形態では、炎症性の疾患または状態は、炎症性がん、線維症と関連する炎症、アテローム性動脈硬化、喘息または自己免疫障害と関連する炎症である。

【0285】

さらに、心血管性の疾患または状態を治療及び／または改善する方法が提供される。心血管性の疾患または状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。場合によっては、方法は、心血管性の疾患または状態を治療または改善することを、それを必要とする対象にA c t R I I 結合性タンパク質を投与することによって行うことを含む。いくつかの実施形態では、心血管性の疾患または状態は、貧血、うっ血性心不全、心室機能不全、血管石灰化、肺高血圧症、動脈再狭窄、または心筋線維症である。

【0286】

いくつかの実施形態では、本開示は、肺の疾患または状態を治療及び／または改善するための方法であって、A c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。肺の疾患または状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。

【0287】

いくつかの実施形態では、本開示は、筋骨格の疾患または状態を治療及び／または改善するための方法であって、有効用量のA c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。筋骨格の疾患または状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。有効用量のA c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗A c t R I I B抗体）を投与することにより治療及び／または改善され得る例示的なA c t R I I B関連状態には、神経筋障害（例えば、筋ジストロフィー及び筋萎縮）、うっ血性の閉塞性肺疾患または肺気腫（及び関連する筋肉消耗）、筋肉消耗性症候群、筋肉減少症、悪液質、脂肪組織障害（例えば、肥満）、2型糖尿病、及び骨変性疾患（例えば、骨粗鬆症）が含まれる。これらの疾患または状態の各々の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用が本明細書で提供される。

【0288】

有効用量のA c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗A c t R I I B抗体）を投与することにより治療及び／または改善され得る他の例示的なA c t R I I 関連状態には、筋肉変性障害及び神経筋障害、ならびに骨粗鬆症が含まれる。

【0289】

提供されるA c t R I I 結合性タンパク質により、筋肉の成長を必要としている、他の神経筋の疾患または状態において筋量を増加させるための有効な手段が提供される。例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）においてである。A c t R I I 結合性タンパク質が有用であり得る他の神経筋疾患には、脊髄損傷もしくは脳卒中による麻痺；外傷または変性、代謝性、もしくは炎症性のニューロパチーによる除神経；成人運動ニューロン疾患；多巣性伝導ブロック（c o n d u c t o r b l o c k）を伴う自己免疫性運動ニューロパチー；及び乳児もしくは若年性の脊髄性筋萎縮症が含まれる。

【0290】

他の態様では、本開示は、骨及び／または軟骨の形成を誘導する、骨量減少を予防する、骨石灰化を増大させる、または骨の脱石灰化を予防する方法を提供する。例えば、提供されるA c t R I I 結合性タンパク質は、対象（例えば、ヒト及び他の動物）での骨粗鬆症の治療ならびに骨折及び軟骨欠損の治療に使用される。いくつかの実施形態では、本開

10

20

30

40

50

示は、対象での骨折または軟骨を治癒させるための方法を提供する。いくつかの実施形態では、提供される方法及び組成物は、骨粗鬆症、副甲状腺機能亢進症、クッシング病、甲状腺中毒症、慢性の下痢の状態もしくは吸収不良、または神経性無食欲症等の、骨量減少を引き起こす状態を治療するために投与される。

【0291】

追加の態様では、本開示は、神経学的障害または状態を治療するための方法を提供し、A c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。神経学的障害または状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。いくつかの実施形態では、神経学的障害または状態は、神経細胞死と関連する。いくつかの実施形態では、神経学的障害または状態は、パーキンソン病、A L S、脳萎縮、または認知症である。

10

【0292】

追加の態様では、本開示は、代謝性の障害または状態を治療するための方法を提供し、A c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。代謝性の障害または状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。いくつかの実施形態では、代謝性の障害または状態は、糖尿病と関連する状態である。いくつかの実施形態では、代謝性の障害または状態は、肥満である。さらなる実施形態では、代謝性の障害または状態は、肥大型肥満である。いくつかの実施形態では、代謝性の障害または状態は、がん悪液質または筋肉消耗である。

20

【0293】

他の態様では、本開示は、対象の体脂肪量を調節するため、及びそれに関連する状態、特に、それに関連する健康を損なうような状態を治療または予防するための位置及び方法を提供する。

【0294】

本明細書で提供される場合、体重を調節（管理）することとは、体重を減少もしくは増加させること、体重増加率を低下もしくは増大させること、または体重減少率を増大もしくは低下させることを指し得、これには、体重を能動的に維持すること、または大幅に変化させないこと（例えば、他の場合には体重を増減させ得る、外部または内部の影響に対して）も含まれる。一態様によれば、本開示は、体重を調節することを、それを必要とする対象（例えば、ヒト）に、本明細書で提供されるA c t R I I 結合性タンパク質を投与することにより行う方法を提供する。一態様では、本開示は、対象において、体重を減少させるため、及び／または体重増加を減少させるための方法、より詳細には、肥満のリスクがある、もしくは肥満を患う患者において肥満を治療または改善するための方法を提供する。別の態様では、本開示は、体重を増やすこと、または維持することができない対象（例えば、消耗症候群の動物）を治療するための方法及び化合物を提供する。そのような方法は、体重及び／または体格を増大させるため、あるいは体重及び／または体格の喪失を減少させるため、あるいは好ましくないほど低い（例えば、不健康な）体重及び／または体格と関連するか、もしくはそれによって引き起こされる状態を改善するために有効である。提供されるA c t R I I B 結合性タンパク質はさらに、I I 型糖尿病及びメタボリックシンドロームの発症を減速させるかまたは予防するための治療剤として使用され得る。

30

40

【0295】

特定の態様では、本開示は、糖尿病及び／または糖尿病と関連する状態を、有するかまたは発症するリスクのある対象にA c t R I I 結合性タンパク質を投与することを含む、糖尿病と関連する状態を治療及び／または改善する方法を提供する。糖尿病または糖尿病と関連する状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるようなA c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。いくつかの実施形態では、糖尿病と関連する状態は、糖尿病性神経障害、糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性血管障害または糖尿病性微小血管障害である。

【0296】

50

追加の態様では、本開示は、創傷治癒を促進する方法を提供し、A c t R I I 結合性タンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、創傷治癒と関連する瘢痕形成を減少させるために対象に投与される。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、肥厚性の瘢痕またはケロイドを発症するリスクのある対象に投与される。

【0297】

さらに、A c t R I I 発現及び/またはA c t R I I シグナル伝達と関連する病的状態におけるA c t R I I 活性に拮抗する方法が提供される。場合によっては、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長抗A c t R I I 抗体またはA c t R I I 結合性抗体断片等の、抗A c t R I I 抗体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、病的状態は、筋萎縮等の、筋骨格の疾患または障害である。いくつかの実施形態では、病的状態は、例えば、肺または肝臓の、線維性疾患である。さらなる実施形態では、病的状態は、糖尿病である。いくつかの実施形態では、病的状態は、肥満（例えば、肥大型肥満）である。追加の実施形態では、病的状態は、肺高血圧症または特発性肺線維症（I P F）である。いくつかの実施形態では、病的状態は、糖尿病網膜症等の眼疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、癌腫（例えば、皮膚の基底細胞癌及び扁平上皮癌、頭頸部癌、及び腎細胞癌）、骨髓腫（例えば、多発性骨髓腫）、大腸癌、または骨量減少誘導性がん等のがんである。

10

【0298】

A c t R I I B 発現及び/またはA c t R I I B シグナル伝達増大と関連する病的状態におけるA c t R I I B 活性に拮抗する方法もまた提供される。場合によっては、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長抗A c t R I I B 抗体及びA c t R I I B 結合性抗体断片等の、抗A c t R I I 抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、病的状態は、筋萎縮等の、筋骨格の疾患または障害である。いくつかの実施形態では、病的状態は、例えば、肺または肝臓の、線維性疾患である。さらなる実施形態では、病的状態は、糖尿病である。いくつかの実施形態では、病的状態は、肥満（例えば、肥大型肥満）である。追加の実施形態では、病的状態は、肺高血圧症または特発性肺線維症（I P F）である。いくつかの実施形態では、病的状態は、糖尿病網膜症等の眼疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、癌腫（例えば、皮膚の基底細胞癌及び扁平上皮癌、ならびに頭頸部癌）、骨髓腫、腎細胞癌、大腸癌、または骨量減少誘導性がん等のがんである。

20

30

【0299】

さらに、A c t R I I A 発現及び/またはA c t R I I A シグナル伝達増大と関連する病的状態におけるA c t R I I A 活性に拮抗する方法が提供される。場合によっては、方法は、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長抗A c t R I I A 抗体またはA c t R I I A 結合性抗体断片等の、抗A c t R I I 抗体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、病的状態は、筋萎縮等の、筋骨格の疾患または障害である。いくつかの実施形態では、病的状態は、線維性疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、例えば、肺または肝臓の、線維性疾患である。さらなる実施形態では、病的状態は、肺または肝臓の線維性疾患である。さらなる実施形態では、病的状態は、糖尿病である。いくつかの実施形態では、病的状態は、肥満（例えば、肥大型肥満）である。追加の実施形態では、病的状態は、肺高血圧症または特発性肺線維症（I P F）である。いくつかの実施形態では、病的状態は、糖尿病網膜症等の眼疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、癌腫（例えば、皮膚の基底細胞癌及び扁平上皮癌、頭頸部癌）、骨髓腫（例えば、多発性骨髓腫）、大腸癌、または骨量減少誘導性がん等のがんである。

40

【0300】

さらに、A c t R I I B 及び/またはA c t R I I A 発現、及び/またはA c t R I I B 及び/またはA c t R I I A シグナル伝達増大と関連する病的状態におけるA c t R I I B 及びA c t R I I A の活性に拮抗する方法が提供される。場合によっては、方法は、

50

A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、完全長抗 A c t R I I 抗体または A c t R I I 結合性抗体断片等の、抗 A c t R I I 抗体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、病的状態は、筋萎縮等の、筋骨格の疾患または障害である。いくつかの実施形態では、病的状態は、線維性疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、例えば、肺または肝臓の、線維性疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、肺または肝臓の、線維性疾患である。さらなる実施形態では、病的状態は、糖尿病である。いくつかの実施形態では、病的状態は、肥満（例えば、肥大型肥満）である。追加の実施形態では、病的状態は、肺高血圧症または特発性肺線維症（I P F）である。いくつかの実施形態では、病的状態は、糖尿病網膜症等の眼疾患である。いくつかの実施形態では、病的状態は、癌腫（例えば、皮膚の基底細胞癌及び扁平上皮癌、頭頸部癌）、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、大腸癌、または骨量減少誘導性がん等のがんである。

10

【0301】

追加の実施形態では、本開示は、がん、またはがんもしくはその治療と関連する状態を治療及び／または改善する方法を提供し、A c t R I I 結合性タンパク質（例えば、抗 A c t R I I 抗体またはその A c t R I I 結合性断片）を、それを必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、抗 A c t R I I B 抗体またはその A c t R I I B 結合性断片である。がんまたはがんに関連する状態の治療または改善のための医薬品の製造における、本明細書で提供されるような A c t R I I 結合性タンパク質の使用がさらに提供される。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、抗 A c t R I I A 抗体またはその A c t R I I A 結合性断片である。いくつかの実施形態では、A c t R I I 結合性タンパク質は、A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合する抗体であるか、またはその A c t R I I B 及び A c t R I I A A c t R I I B に結合性の断片である。いくつかの実施形態では、対象は、黒色腫、子宮癌、肺癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、膵癌及び肉腫から選択されるがんを有する。特定の実施形態では、対象は、癌腫（例えば、皮膚の基底細胞癌及び扁平上皮癌、ならびに頭頸部癌）、骨髄腫、大腸癌、または骨量減少誘導性がんを有する。

20

【0302】

いくつかの実施形態では、方法は、A c t R I I（例えば、A c t R I I B 及び／または A c t R I I A）を発現している、がん細胞、腫瘍関連間質細胞、または内皮細胞を、A c t R I I と特異的に結合する A c t R I I 結合性タンパク質と接触させることを含む。場合によっては、方法は、アクチビン A を、A c t R I I 結合性タンパク質と接触させることを含む。追加の実施形態では、腫瘍細胞は、骨髄線維症、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、下垂体癌からなる群から選択されるがんからのものである。他の実施形態では、がんは、乳癌、消化管癌、または癌腫（例えば、基底細胞癌及び扁平上皮癌）である。追加の一実施形態では、がんは、骨量減少誘導性がんである。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、がん株からのものである。

30

【0303】

本開示は、線維性状態を有するかまたは発症するリスクのある対象に対し、治療的有効量の A c t R I I 結合性タンパク質を単独で、または 1 つ以上の追加の療法（例えば、1 つ以上の追加の治療剤）と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。本開示はさらに、A c t R I I 介在性の疾患及び／または状態（例えば、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び／または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症（I P F）等）；代謝性疾患（例えば、I I 型糖尿病インスリン抵抗性、高血糖症、及び肥満）；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患（例えば、うつ血性心不全、及び高血圧）；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、例えば、骨粗鬆症等；神経疾患；創傷治癒；体重減少；及びがん（例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌））の治療（例えば、予防）、及び／または改善での使用のための 1 つ以上の医薬品の調製のために、A c t R I I 結合性タンパク質を単独で、または別の

40

50

薬剤と組み合わせて使用するための組成物を提供する。

【0304】

また、例えば所与の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床検査手順の一部として血中または組織中のタンパク質濃度（例えば、A c t R I I B 及び/または A c t R I I A 濃度）を診断的にモニタリングするための本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質の使用も提供される。例えば、検出は、A c t R I I 結合性タンパク質を検出可能物質に結合させることにより容易にすることができる。検出可能物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、補欠分子族複合体の好適な例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられ、蛍光物質の好適な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン (dichlorotriazinylamine fluorescein)、ダンシルクロリドまたはフィコエリスリンが挙げられ、発光物質の一例としては、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ、放射性物質の好適な例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。

10

【0305】

医薬組成物及び投与方法

20

A c t R I I 結合性タンパク質を調製し、それを必要とする対象にそれを投与方法は、当業者に知られているかまたは当業者により容易に決定される。A c t R I I 結合性タンパク質の投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入によるかもしくは局所的であり得る。非経口という用語には、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、眼球内、皮下、直腸内、または腔内の投与が含まれる。これらの投与形態はいずれも本開示の範囲内であることが明確に企図されるが、投与のための形態の別の例は、注射用、特に静脈内もしくは動脈内への注射用液または点滴用液であろう。通常、好適な医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、任意選択で、安定剤（例えば、ヒトアルブミン）等を含むことができる。本明細書の教示に適合する他の方法では、本明細書で提供される A c t R I I 結合性タンパク質を線維症もしくは腫瘍の器官及び/または部位に直接送達し、それにより治療剤への罹患組織の曝露を増大させることができる。いくつかの実施形態では、投与は、例えば、吸入または鼻腔内投与により気道に対して直接的なものである。

30

【0306】

本明細書で考察されるように、A c t R I I 結合性タンパク質は、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び/または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症 (I P F) 等）；代謝性疾患（例えば、I I 型糖尿病インスリン抵抗性、高血糖症、及び肥満）；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患（例えば、うっ血性心不全、及び高血圧）；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、例えば、骨粗鬆症等；神経疾患；創傷治癒；体重減少；及びがん（例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌）が含まれるが、これらに限定されない、A c t R I I 介在性の疾患及び状態のインビボ治療のために薬学的有効量で投与することができる。これに関し、開示されている A c t R I I 結合性タンパク質は、投与を容易にするよう、また活性物質の安定性を促進するように製剤化可能であることは認識されよう。本開示による医薬組成物は、薬学的に許容される無毒な無菌の担体、例えば、生理食塩水、無毒性緩衝液、保存剤等を含むことができる。本出願の目的では、A c t R I I 結合性タンパク質の薬学的有効量とは、結合型であっても非結合型であっても、A c t R I I への有効な結合を達成するため、及び利益を達成するため、例えば、疾患もしくは状態の症状を改善するか、または物質もしくは細胞を検出するために十分な量を意味する。本明細書に開示される

40

50

治療法での使用に好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)に記載されている。

【0307】

本明細書で提供される、ある特定の医薬組成物は、例えば、カプセル、錠剤、水性懸濁液または溶液を含め、許容される剤形で経口投与することができる。ある特定の医薬組成物はまた、経鼻エアロゾルまたは吸入で投与することもできる。そのような組成物は、ベンジルアルコールもしくは他の好適な保存剤、生物学的利用能を高める吸収促進剤、及び/または従来の他の可溶化剤もしくは分散剤を用いて生理食塩水中に溶液として調製することができる。

10

【0308】

単一剤形を生産するために担体材料と合わせることができるActRII結合性タンパク質(例えば、ActRIIB及び/またはActRIIAと特異的に結合する抗体)の量は、治療される対象及び個別の投与方法により異なる。組成物は、単回投与、多回投与、または設定された期間にわたる注入で投与することができる。投与レジメンはまた、最適の所望反応(例えば、治療反応または予防的反応)が得られるよう調整することができる。

【0309】

本明細書で提供されるActRII結合性タンパク質は、ヒトまたは他の対象に対し、治療効果を生み出すのに十分な量で前述の治療方法に従って投与することができる。本明細書で提供されるActRII結合性タンパク質は、そのようなヒトまたは他の動物に対し、ActRII結合性タンパク質と、従来の薬学的に許容される担体または希釈剤とを公知の技術に従って合わせることでより調製される従来の剤形で投与することができる。薬学的に許容される担体または希釈剤の形態及び特性は、それと合わせる有効成分の量、投与経路及び他の周知の変要素により決定することができる。1つ以上の異なるActRII結合性タンパク質を含むカクテルも使用することができる。

20

【0310】

ActRII介在性の疾患または状態、例えば、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、または筋肉消耗障害;線維性状態;炎症性、自己免疫、心血管、肺、筋骨格、骨格、眼、神経、もしくは代謝性の疾患または状態;肥満;創傷治癒;及びがんの治療のためのActRII結合性組成物の治療上有効な用量は、投与手段、標的部位、対象の生理的状态、対象がヒトなのか動物なのか、他の投与薬剤、及び治療が予防的なのか治療的なのか等、多くの異なる要因により異なる。通常、対象はヒトであるが、トランスジェニック哺乳類等の非ヒト哺乳類を治療することもできる。治療投与量は、安全性及び有効性を最適化するための当業者に公知の日常的方法を用いて調節することができる。

30

【0311】

ActRII結合性タンパク質の投与により特定の疾患または状態の症状を改善することとは、永続的なのか一時的なのか、持続性なのか一過性なのかを問わず、ActRII結合性の投与に起因し得る、またはそれに関連し得る、任意の軽減を指す。

【0312】

本開示はまた、例えば、治療のため、または変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害;線維性状態;炎症性、自己免疫、心血管、肺、筋骨格、骨格、眼、神経、もしくは代謝性の疾患または状態;肥満;創傷治癒;及びがんのための医薬品の製造における抗ActRII抗体等のActRII結合性タンパク質の使用も提供する。

40

【0313】

併用療法

いくつかの実施形態では、ActRII結合性タンパク質(例えば、完全長ActRII抗体及びActRII結合性抗体断片等の、抗ActRII抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体)は、1つ以上の他の療法と組み合わせて投与される。そのような療法には、追加の治療剤及び他の医学的介入が含まれる。本明細書で提供されるActRII結

50

合性タンパク質と組み合わせて投与され得る例示的治療剤としては、抗SDI線維化剤、コルチコステロイド、抗炎症薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断薬、利尿薬、抗糖尿病薬、免疫抑制薬、化学療法薬、代謝アンタゴニスト、及び免疫調節薬が挙げられるが、これらに限定されない。様々な実施形態では、ActRII結合性タンパク質が、外科的切除/除去の手技前、手技中、及び/または手技後に対象に投与される。

【0314】

診断法

本開示はまた、ActRII介在性の疾患及び状態（例えば、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、もしくは筋肉消耗障害等の筋障害；線維性状態（例えば、肝臓、肺、血管及び/または眼の線維性状態、例えば、心筋線維症、及び特発性肺線維症（IPF）等）；代謝性疾患（例えば、II型糖尿病インスリン抵抗性、高血糖症、及び肥満）；炎症性の疾患または状態、自己免疫疾患、心血管疾患（例えば、うっ血性心不全、及び高血圧）；加齢黄斑変性等の眼疾患；肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、例えば、骨粗鬆症等；神経疾患；創傷治癒；体重減少；及びがん（例えば、癌腫、骨髄腫、骨量減少誘導性がん、下垂体癌、及び消化管癌））の診断の際に有用な診断法も提供し、この方法は、個体からのActRII（例えば、ActRIIAまたはActRIIB）タンパク質組織もしくは体液の発現量を測定すること、及び測定された発現量を正常な組織もしくは体液での標準的ActRII（例えば、ActRIIAまたはActRIIB）発現量と比較することを伴い、それにより、標準と比較したActRII発現量の増加は、本明細書で提供される完全長抗ActRIIB抗体及び抗原結合性抗体断片等の、本明細書で提供されるActRII結合性タンパク質により治療可能な障害であることを示す。

【0315】

抗ActRII抗体（例えば、完全長ActRII抗体及びActRII結合性抗体断片、ならびにそのバリエーション及び誘導体）等の本明細書で提供されるActRII結合性タンパク質は、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法（例えば、Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985)、Jalkanen et al., J. Cell Biol. 105: 3087-3096 (1987)を参照のこと）を使用して生体試料中のActRII（例えば、ActRIIB及びActRIIA）レベルを評価するために使用することができる。ActRIIタンパク質（例えば、ActRIIB及びActRIIA）の発現を検出するのに有用な他の抗体ベースの方法としては、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫沈降法、またはウェスタンブロットティング等のイムノアッセイが挙げられる。

【0316】

「ActRIIタンパク質の発現量を評価すること」とは、第1の生体試料中のActRIIタンパク質濃度を、直接的（例えば、絶対タンパク質濃度を決定または推定することによる）または相対的に（例えば、第2の生体試料中の疾患関連ポリペプチド濃度と比較することにより）、定性的または定量的に測定または推定することを意図する。第1の生体試料中のActRIIタンパク質発現量は、測定または推定して、標準的ActRIIタンパク質濃度と比較することができ、かかる標準は、障害を有していない個体から取得された第2の生体試料から測定されるか、または障害を有していない個体の集団からの濃度を平均することにより決定される。当該技術分野で理解されるように、「標準」ActRIIタンパク質濃度が分かった後は、それを比較用標準として繰り返し使用することができる。

【0317】

「生体試料」とは、ActRIIを発現する可能性のある、個体、細胞株、組織培養、または他の細胞源から取得された任意の生体試料が意図される。哺乳類から組織生検及び体液を取得するための方法は当該技術分野で公知である。

【0318】

ActRII結合性タンパク質を含むキット

10

20

30

40

50

本開示はさらに、好適なパッケージに入ったA c t R I I結合性タンパク質（例えば、完全長A c t R I I抗体及びA c t R I I結合性抗体断片等の、A c t R I Iと特異的に結合する抗体、ならびにそのバリエーション及び誘導体）、及び資料が含まれる、本明細書に記載される方法を実施するために使用することができるキットを提供する。資料には、使用説明書、臨床試験についての考察、副作用の一覧、参考科学文献、添付文書資料、臨床試験結果、及び／またはこれらの概要等という情報のうちのいずれもが含まれ得る。資料では、組成物の活性及び／または利点を示すかもしくは立証すること、及び／または投薬、投与、副作用、薬物相互作用、もしくは医療提供者に有用な他の情報を説明することができる。そのような情報は、様々な試験、例えば、インビボモデルを伴う実験動物を使用した試験及び／またはヒトの臨床試験に基づいた試験の結果に基づき得る。キットにはさらに、別の治療法（例えば、別の薬剤）、及び／または他の治療法（例えば、他の薬剤）に関する情報を提供する役目を果たす上記のような資料が含有され得る。

10

【0319】

ある特定の実施形態では、キットは、1つ以上の容器に入った少なくとも1つの精製A c t R I I結合性タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、キットには、すべての対照、アッセイ実施のための説明書、及び結果の分析と提示に必要な任意のソフトウェアを含め、検出アッセイを実施するために必要及び／または十分な構成成分のすべてが含有される。

【0320】

イムノアッセイ

20

A c t R I I結合性タンパク質（例えば、A c t R I Iと特異的に結合する抗体、及びA c t R I Iと特異的に結合する抗体のA c t R I I結合性断片、ならびにバリエーション、またはその誘導体）は、当該技術分野で公知の任意の方法により免疫特異的結合を評価することができる。使用することができるイムノアッセイとしては、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ（R E A）、E L I S A（酵素結合免疫吸着測定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、蛍光イムノアッセイ、またはプロテインAイムノアッセイ等の技術を使用する、競合的及び非競合的なアッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。そのようなアッセイは日常的であり、当該技術分野で公知である（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるA u s u b e l l e t a l . , e d s , (1 9 9 4) C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N Y) V o l . 1を参照のこと）。

30

【0321】

本明細書で提供されるA c t R I I結合性タンパク質（例えば、A c t R I Iと特異的に結合する抗体及びA c t R I Iと特異的に結合する抗体のA c t R I I結合性断片、ならびにバリエーション、またはその誘導体）は、免疫蛍光法、免疫電子顕微鏡法または非免疫学的アッセイの場合のように、A c t R I I（例えば、A c t R I I B及びA c t R I I A）または保存されたバリエーションもしくはそのペプチド断片のインサイチュでの検出のために組織学的に利用することができる。インサイチュでの検出は、当該技術分野で公知の方法に従って達成することができる。当業者は、日常的な実験を用いることにより、それぞれの決定について有効かつ最適なアッセイ条件を決定することができる。A c t R I I結合性タンパク質の結合特性の決定に好適な方法は、本明細書に記載されているか、そうでなければ当該技術分野で知られている。そのような動態解析用に設計された装置及びソフトウェアは市販されている（例えば、B I A C O R E（登録商標）、B I A e v a l u a t i o n（登録商標）ソフトウェア、G E H e a l t h c a r e ; K I N E X A（登録商標）S o f t w a r e、S a p i d y n e I n s t r u m e n t s）。

40

【0322】

別段に示されていない限り、本開示の実施には、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技術が使用さ

50

れ、これらは当業者の技量の範囲内である。

本発明は以下の態様も提供する。

[1] VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2 及び VL - CDR 3 という CDR のセット、及び / または VH - ABR 1、VH - ABR 2、VH - ABR 3、VL - ABR 1、VL - ABR 2 及び VL - ABR 3 という ABR のセットを含む、単離されたアクチビン受容体 II 型 (ActRII) 結合性タンパク質であって、前記 CDR 及び / または ABR が、重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) の対、すなわち、

(a) (i) 配列番号 20 の VH 配列と、

(ii) 配列番号 30 の VL 配列であり、

前記タンパク質が、アクチビン受容体 II B 型 (ActRIIB) と結合するもの、

(b) (i) 配列番号 20 の VH 配列と、

(ii) 配列番号 39 の VL 配列であり、

前記タンパク質が ActRIIB と結合するもの、

(c) (i) 配列番号 49 の VH 配列と、

(ii) 配列番号 59 のアミノ酸配列を有する VL であり、

前記タンパク質が ActRIIB と結合するもの、

(d) (i) 配列番号 20 の VH 配列と、

(ii) 配列番号 67 の VL 配列であり、

前記タンパク質が ActRIIB と結合するもの、

(e) (i) 配列番号 77 の VH 配列と、

(ii) 配列番号 85 の VL 配列であり、

前記タンパク質が ActRIIB と結合するもの、及び

(f) (i) 配列番号 2 の VH 配列と、

(ii) 配列番号 12 の VL 配列であり、

前記タンパク質が ActRIIB 及びアクチビン受容体 II A 型 (ActRIIA) と結合するもの、

からなる群から選択される対に存在する、前記単離されたアクチビン受容体 II 型 (ActRII) 結合性タンパク質。

[2] VH - CDR 1、VH - CDR 2、VH - CDR 3、VL - CDR 1、VL - CDR 2 及び VL - CDR 3 という CDR のセットを含む、単離された ActRII 結合性タンパク質であって、前記 CDR のセットが、CDR の参照セット、すなわち、

(a) (i) VH - CDR 1 が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、

(ii) VH - CDR 2 が配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、

(iii) VH - CDR 3 が配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、

(iv) VL - CDR 1 が配列番号 31 のアミノ酸配列を有し、

(v) VL - CDR 2 が配列番号 32 のアミノ酸配列を有し、

(vi) VL - CDR 3 が配列番号 33 のアミノ酸配列を有し、

かつ、前記タンパク質が ActRIIB と結合するもの、

(b) (i) VH - CDR 1 が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、

(ii) VH - CDR 2 が配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、

(iii) VH - CDR 3 が配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、

(iv) VL - CDR 1 が配列番号 40 のアミノ酸配列を有し、

(v) VL - CDR 2 が配列番号 41 のアミノ酸配列を有し、

(vi) VL - CDR 3 が配列番号 42 のアミノ酸配列を有し、

かつ、前記タンパク質が ActRIIB と結合するもの、

(c) (i) VH - CDR 1 が配列番号 50 のアミノ酸配列を有し、

(ii) VH - CDR 2 が配列番号 51 のアミノ酸配列を有し、

(iii) VH - CDR 3 が配列番号 52 のアミノ酸配列を有し、

(iv) VL - CDR 1 が配列番号 60 のアミノ酸配列を有し、

10

20

30

40

50

(v) VL - CDR 2 が配列番号 61 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 62 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(d) (i) VH - CDR 1 が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、
(ii) VH - CDR 2 が配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、
(iii) VH - CDR 3 が配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、
(iv) VL - CDR 1 が配列番号 68 のアミノ酸配列を有し、
(v) VL - CDR 2 が配列番号 69 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 70 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(e) (i) VH - CDR 1 が配列番号 78 のアミノ酸配列を有し、
(ii) VH - CDR 2 が配列番号 79 のアミノ酸配列を有し、
(iii) VH - CDR 3 が配列番号 80 のアミノ酸配列を有し、
(iv) VL - CDR 1 が配列番号 86 のアミノ酸配列を有し、
(v) VL - CDR 2 が配列番号 87 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 88 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、または
(f) (i) VH - CDR 1 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、
(ii) VH - CDR 2 が配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、
(iii) VH - CDR 3 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有し、
(iv) VL - CDR 1 が配列番号 13 のアミノ酸配列を有し、
(v) VL - CDR 2 が配列番号 14 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 15 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、
 から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、10、10 未満、
 もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する、前記単離された A
 c t R I I 結合性タンパク質。

10

20

[3] CDR のセット、すなわち、

(a) (i) VH - CDR 1 が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、
(ii) VH - CDR 2 が配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、
(iii) VH - CDR 3 が配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、
(iv) VL - CDR 1 が配列番号 31 のアミノ酸配列を有し、
(v) VL - CDR 2 が配列番号 32 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 33 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(b) (i) VH - CDR 1 が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、
(ii) VH - CDR 2 が配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、
(iii) VH - CDR 3 が配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、
(iv) VL - CDR 1 が配列番号 40 のアミノ酸配列を有し、
(v) VL - CDR 2 が配列番号 41 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 42 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(c) (i) VH - CDR 1 が配列番号 50 のアミノ酸配列を有し、
(ii) VH - CDR 2 が配列番号 51 のアミノ酸配列を有し、
(iii) VH - CDR 3 が配列番号 52 のアミノ酸配列を有し、
(iv) VL - CDR 1 が配列番号 60 のアミノ酸配列を有し、
(v) VL - CDR 2 が配列番号 61 のアミノ酸配列を有し、
(vi) VL - CDR 3 が配列番号 62 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(d) (i) VH - CDR 1 が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、

30

40

50

(i i) V H - C D R 2 が配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - C D R 3 が配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - C D R 1 が配列番号 6 8 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - C D R 2 が配列番号 6 9 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - C D R 3 が配列番号 7 0 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(e) (i) V H - C D R 1 が配列番号 7 8 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - C D R 2 が配列番号 7 9 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - C D R 3 が配列番号 8 0 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - C D R 1 が配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - C D R 2 が配列番号 8 7 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - C D R 3 が配列番号 8 8 のアミノ酸配列を有し、

10

かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、または
 (f) (i) V H - C D R 1 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - C D R 2 が配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - C D R 3 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - C D R 1 が配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - C D R 2 が配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - C D R 3 が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有し、

かつ、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、
 を含む、[2] に記載の単離された A c t R I I 結合性タンパク質。

20

[4] A B R のセット、すなわち、V H - A B R 1、V H - A B R 2、V H - A B R 3、
 V L - A B R 1、V L - A B R 2 及び V L - A B R 3 を含む、単離された A c t R I I
 結合性タンパク質であって、前記 A B R のセットが、A B R の参照セット、すなわち、

(a) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - A B R 1 が配列番号 3 4 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - A B R 2 が配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - A B R 3 が配列番号 3 6 のアミノ酸配列を有し、

30

かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
 (b) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - A B R 1 が配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - A B R 2 が配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - A B R 3 が配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(c) (i) V H - A B R 1 が配列番号 5 3 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - A B R 2 が配列番号 5 4 または 5 5 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - A B R 3 が配列番号 5 6 または 5 7 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - A B R 1 が配列番号 6 3 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - A B R 2 が配列番号 6 4 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - A B R 3 が配列番号 6 5 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

40

(d) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - A B R 1 が配列番号 7 1 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - A B R 2 が配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有し、

50

(v i) V L - A B R 3 が配列番号 7 3 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(e) (i) V H - A B R 1 が配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有し、
(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 8 3 のアミノ酸配列を有し、
(i v) V L - A B R 1 が配列番号 8 9 のアミノ酸配列を有し、
(v) V L - A B R 2 が配列番号 9 0 のアミノ酸配列を有し、
(v i) V L - A B R 3 が配列番号 9 1 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、または
(f) (i) V H - A B R 1 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 7 または 8 のアミノ酸配列を有し、
(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 9 または 1 0 のアミノ酸配列を有し、
(i v) V L - A B R 1 が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有し、
(v) V L - A B R 2 が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有し、
(v i) V L - A B R 3 が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、
から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 0 未満、
もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する、前記単離された A
c t R I I 結合性タンパク質。

10

[5] C D R のセット、すなわち、

20

(a) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、
(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、
(i v) V L - A B R 1 が配列番号 3 4 のアミノ酸配列を有し、
(v) V L - A B R 2 が配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有し、
(v i) V L - A B R 3 が配列番号 3 6 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(b) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、
(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、
(i v) V L - A B R 1 が配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有し、
(v) V L - A B R 2 が配列番号 4 4 のアミノ酸配列を有し、
(v i) V L - A B R 3 が配列番号 4 5 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(c) (i) V H - A B R 1 が配列番号 5 3 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 5 4 または 5 5 のアミノ酸配列を有し、
(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 5 6 または 5 7 のアミノ酸配列を有し、
(i v) V L - A B R 1 が配列番号 6 3 のアミノ酸配列を有し、
(v) V L - A B R 2 が配列番号 6 4 のアミノ酸配列を有し、
(v i) V L - A B R 3 が配列番号 6 5 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(d) (i) V H - A B R 1 が配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有し、
(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有し、
(i v) V L - A B R 1 が配列番号 7 1 のアミノ酸配列を有し、
(v) V L - A B R 2 が配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有し、
(v i) V L - A B R 3 が配列番号 7 3 のアミノ酸配列を有し、
かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
(e) (i) V H - A B R 1 が配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有し、
(i i) V H - A B R 2 が配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有し、

30

40

50

(i i i) V H - A B R 3 が配列番号 8 3 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - A B R 1 が配列番号 8 9 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - A B R 2 が配列番号 9 0 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - A B R 3 が配列番号 9 1 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、または
 (f) (i) V H - A B R 1 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、
 (i i) V H - A B R 2 が配列番号 7 または 8 のアミノ酸配列を有し、
 (i i i) V H - A B R 3 が配列番号 9 または 1 0 のアミノ酸配列を有し、
 (i v) V L - A B R 1 が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有し、
 (v) V L - A B R 2 が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有し、
 (v i) V L - A B R 3 が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有し、
 かつ、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、
 を含む、[4] に記載の単離された A c t R I I 結合性タンパク質。
 [6] A c t R I I 結合性タンパク質であって、
 (a) (i) 配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または
 9 9 % の配列同一性を有する V H と、
 (i i) 配列番号 3 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9
 % の配列同一性を有する V L であり、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
 (b) (i) 配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または
 9 9 % の配列同一性を有する V H と、
 (i i) 配列番号 3 9 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9
 % の配列同一性を有する V L であり、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
 (c) (i) 配列番号 4 9 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または
 9 9 % の配列同一性を有する V H と、
 (i i) 配列番号 5 9 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9
 % の配列同一性を有する V L であり、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
 (d) (i) 配列番号 2 0 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または
 9 9 % の配列同一性を有する V H と、
 (i i) 配列番号 6 7 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9
 % の配列同一性を有する V L であり、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
 (e) (i) 配列番号 7 7 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または
 9 9 % の配列同一性を有する V H と、
 (i i) 配列番号 8 5 に対して少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9
 % の配列同一性を有する V L であり、前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、
 または
 (f) (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する V H と、
 (i i) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L であり、
 前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、
 からなる群から選択される V H と V L の対を含む、前記 A c t R I I 結合性タンパク質。
 [7] 前記 V H と V L の対が、
 (a) 配列番号 2 0 の V H 配列と配列番号 3 0 の V L 配列であり、前記タンパク質が A c
 t R I I B と結合するもの、
 (b) 配列番号 2 0 の V H 配列と配列番号 3 9 の V L 配列であり、前記タンパク質が A c
 t R I I B と結合するもの、
 (c) 配列番号 4 9 の V H 配列と配列番号 5 9 の V L 配列であり、前記タンパク質が A c
 t R I I B と結合するもの、
 (d) 配列番号 2 0 の V H 配列と配列番号 6 7 の V L 配列であり、前記タンパク質が A c
 t R I I B と結合するもの、
 (e) 配列番号 7 7 の V H 配列と配列番号 8 5 の V L 配列であり、前記タンパク質が A c
 t R I I B と結合するもの、または

10

20

30

40

50

(f) 配列番号 2 の V H 配列と配列番号 1 2 の V L 配列であり、前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、

からなる群から選択される、[6] に記載の A c t R I I 結合性タンパク質。

[8] A c t R I I 結合性タンパク質であって、

(a) (i) 配列番号 2 0 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 3 0 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V L 配列であり、

前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(b) (i) 配列番号 2 0 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 3 9 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V L 配列であり、

前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(c) (i) 配列番号 4 9 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 5 9 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V L 配列であり、

前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(d) (i) 配列番号 2 0 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 6 7 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V L 配列であり、

前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(e) (i) 配列番号 7 7 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 8 5 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V L 配列であり、

前記タンパク質が A c t R I I B と結合するもの、

(f) (i) 配列番号 2 の参照 V H 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V H 配列と、

(i i) 配列番号 1 2 の参照 V L 配列から合計で 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 5 未満、もしくはゼロの、アミノ酸の置換、欠失、及び / または挿入を有する V L 配列であり、

前記タンパク質が A c t R I I B 及び A c t R I I A と結合するもの、

からなる群から選択される V H と V L の対を含む、前記 A c t R I I 結合性タンパク質。

[9] [1] ~ [8] のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質と同じエピトープに結合する、A c t R I I 結合性タンパク質。

[1 0] [1] ~ [9] のいずれか一項に記載の A c t R I I 結合性タンパク質と、A c t

10

20

30

40

50

R I Iへの結合に対して競合する、A c t R I I結合性タンパク質。

[1 1] 前記A c t R I I結合性タンパク質が、A c t R I I活性に拮抗する、[1] ~ [1 0]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 2] 前記結合タンパク質が、

(a) A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aへの結合に対してアクチビンA、アクチビンB、B M P 7、B M P 9、B M P 1 0、G D F 8 (ミオスタチン)、G D F 1 1、またはN o d a lと競合する、

(b) A c t R I I BまたはA c t R I I Aのリガンド(例えば、アクチビンA)の存在下でA c t R I I B及び/またはA c t R I I Aを発現している細胞での1つ以上のS m a dのリン酸化を減少させる、

(c) A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aのリガンドの存在下で、A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aと、A L K 4及び/またはA L K 7とを発現している細胞でのA L K 4及び/またはA L K 7のリン酸化を減少させる、ならびに

(d) A c t R I I B及び/またはA c t R I I Aに、1 n M以下かつ1 p M以上(例えば、B I A C O R E (登録商標)分析により決定した場合)のK_Dで結合する、という特性からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する、[1] ~ [1 1]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 3] 前記A c t R I I結合性タンパク質が、A c t R I Iと特異的に結合する抗体である、[1] ~ [1 2]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 4] 前記抗体が、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、またはA c t R I I結合性抗体断片である、[1 3]に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 5] 前記A c t R I I結合性抗体断片が、F a b断片、F a b '断片、F (a b ')₂断片、F v断片、ダイアボディ、または一本鎖抗体分子からなる群から選択される、[1 4]に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 6] 前記抗体がさらに、

(a) ヒトI g A定常ドメイン、

(b) ヒトI g D定常ドメイン、

(c) ヒトI g E定常ドメイン、

(d) ヒトI g G 1定常ドメイン、

(e) ヒトI g G 2定常ドメイン、

(f) ヒトI g G 3定常ドメイン、

(g) ヒトI g G 4定常ドメイン、及び

(h) ヒトI g M定常ドメイン

からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、[1 3] ~ [1 5]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 7] 前記抗体がさらに、

(a) ヒトI g カッパ定常ドメイン、及び

(b) ヒトI g ラムダ定常ドメイン

からなる群から選択される軽鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、[1 3] ~ [1 6]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 8] 前記抗体がさらに、ヒトI g G 1重鎖定常ドメイン及びヒトラムダ軽鎖定常ドメインを含む、[1 3] ~ [1 7]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質。

[1 9] [1] ~ [1 8]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質をコードする、単離された核酸分子または核酸分子のセット。

[2 0] c D N Aである、[1 9]に記載の単離された核酸分子または核酸分子のセット。

[2 1] [1 9]または[2 0]に記載の核酸分子を含む、ベクター。

[2 2] [1 9]もしくは[2 0]に記載の核酸分子、または[2 1]に記載のベクターを含む、宿主細胞。

10

20

30

40

50

[2 3] 前記宿主細胞が哺乳類宿主細胞である、[2 2]に記載の宿主細胞。

[2 4] 前記宿主細胞が、N S 0マウス骨髄腫細胞、P E R , C 6 (登録商標)ヒト細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞である、[2 3]に記載の哺乳類宿主細胞。

[2 5] [1] ~ [1 8]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質を作製する方法であって、[2 2]、[2 3]、または[2 4]に記載の宿主細胞を、前記A c t R I I結合性タンパク質を産生するための好適な条件下で培養することを含む、前記方法。

[2 6] 前記宿主細胞から分泌されるA c t R I I結合性タンパク質を単離することを含む、[2 5]に記載の方法。

[2 7] [2 5]または[2 6]に記載の方法を使用して生成される、A c t R I I結合性タンパク質。

10

[2 8] [1] ~ [1 8]または[2 7]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

[2 9] 医薬品として使用するための、[2 8]に記載の医薬組成物。

[3 0] A c t R I I発現もしくはA c t R I Iシグナル伝達上昇と関連する疾患もしくは状態を治療及び/または改善するための、[2 9]に記載の医薬組成物の使用。

[3 1] 前記疾患または状態が、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、筋肉消耗、線維性状態(肝臓、肺、血管または眼の線維性状態)、心筋線維症、特発性肺線維症、代謝性疾患、I I型糖尿病、肥満、炎症性疾患、自己免疫疾患、眼疾患、加齢黄斑変性心血管疾患、うっ血性心不全、高血圧、肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、骨粗鬆症、神経筋疾患、変性疾患、創傷治癒、及びがんから選択されるメンバーである、[3 0]に記載の使用。

20

[3 2] 標識基またはエフェクター基をさらに含む、[2 8]に記載の医薬組成物。

[3 3] 前記エフェクター基が、放射性同位体、放射性核種、毒素、治療剤及び化学療法剤から選択される、[3 2]に記載の医薬組成物。

[3 4] 対象におけるA c t R I I発現もしくはA c t R I I媒介性シグナル伝達上昇と関連する疾患もしくは状態を治療及び/または改善するための方法であって、それを必要とする対象に、[1] ~ [1 8]もしくは[2 7]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質を含む組成物、または[2 8]に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

30

[3 5] 前記疾患または状態が、変性筋疾患、筋ジストロフィー、筋萎縮、筋肉消耗、線維性状態(肝臓、肺、血管または眼の線維性状態)、心筋線維症、特発性肺線維症、代謝性疾患、I I型糖尿病、肥満、炎症性疾患、自己免疫疾患、眼疾患、加齢黄斑変性心血管疾患、うっ血性心不全、高血圧、肺疾患、筋骨格疾患、骨格疾患、骨粗鬆症、神経筋疾患、変性疾患、創傷治癒、及びがんから選択されるメンバーである、[3 4]に記載の方法。

[3 6] 前記A c t R I I結合性タンパク質または医薬組成物が、単独で、または併用療法として投与される、[3 4]に記載の方法。

[3 7] 対象でのA c t R I I活性を低下させる方法であって、[1] ~ [1 8]または[2 7]のいずれか一項に記載のA c t R I I結合性タンパク質、または[2 8]に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

40

【 0 3 2 3 】

以下の実施例は、例示として提供されるものであり、限定として提供されるものではない。

【実施例】

【 0 3 2 4 】

具体的な実施形態についての前述の説明から、本開示の一般的性質は十分に明らかになるため、他の人々でも、過度の実験を伴うことなく、本開示の一般概念から逸脱せずに、当業者の技量の範囲内の知識を応用することで、そのような具体的な実施形態を様々な用途のために容易に変更すること及び/または適応させることができる。したがって、その

50

ような適応及び変更は、本明細書で提示されている教示及び指導に基づき、開示された実施形態の均等物の意味及び範囲内であることが意図される。本明細書での表現または用語は説明を目的とするものであって制限のためではなく、そのため、本明細書の用語または表現は、教示及び指導に鑑みて当業者により解釈されるべきであることを理解されるべきである。

【0325】

本開示の広さと範囲は、上記の例示的实施形態のいずれによっても限定されるべきではなく、以下の請求項及びそれらの均等物によってのみ定義されるべきである。

【0326】

本出願で引用されている刊行物、特許、特許出願、及び/または他の文書はすべて、個々の刊行物、特許、特許出願、及び/または他の文書が各々あらゆる目的のために参照することにより組み込まれることが個別に示されているかの如く同程度に、あらゆる目的のために参照することによりその全体が組み込まれる。

10

【0327】

実施例1. ActRII結合性抗体の選択、特徴付け及び生成

ActRIIと高親和性で結合し、アクチビンAと、ヒトActRIIとの結合に対して競合するヒトIgG抗体について選択するためにマルチラウンド選択手順を使用し、以下に詳述する。

【0328】

材料及び方法

20

PierceのEZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kitを使用して抗原(ActRIIA、ActRIIB、ActRIIA-Fc、及びActRIIB-Fc)をビオチン化した。ヤギ抗ヒトF(ab')₂カップ-FITC(LC-FITC)、Extravidin-PE(EA-PE)及びストレプトアビジン-633(SA-633)をそれぞれ、Southern Biotech、Sigma及びMolecular Probesから入手した。ストレプトアビジンMicroBeads及びMACS LC分離カラムをMiltenyi Biotecより購入した。

【0329】

ナイーブの発見

それぞれ多様性が約 10^9 の8つのナイーブなヒト合成酵母ライブラリーを、以前に報告されているように増殖させた(例えば、WO09/036379、WO10/105256、WO12/009568を参照のこと)。選択の最初の2ラウンドでは、報告されているように(例えば、Siegel et al., J. Immunol. Meth. 286(1-2): 141-153(2004)を参照のこと)Miltenyi MACSシステムを用いて磁気ビーズ選別手法を実施した。簡単に言えば、酵母細胞(約 10^{10} 細胞/ライブラリー)と、3mLのビオチン化した単量体ActRII-Fc抗原(ActRIIB-FcまたはActRIIA-Fc)(10nM)とを、FACS洗浄緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)/0.1%ウシ血清アルブミン(BSA))中で室温にて15分間インキュベートした。50mLの氷冷洗浄緩衝液で1回洗浄した後、細胞ペレットを40mLの洗浄緩衝液に再懸濁させ、Streptavidin MicroBeads(500µL)を酵母に加えて4で15分間インキュベートした。次に、酵母をペレット状にし、5mLの洗浄緩衝液に再懸濁させ、Miltenyi LSカラムに添加した。5mLが添加された後、3mLのFACS洗浄緩衝液でカラムを3回洗浄した。その後、カラムを磁場から外し、酵母を5mLの増殖培地で溶出させた後、一晚増殖させた。フローサイトメトリーを使用して以下の選別ラウンドを実施した。約 1×10^8 の酵母をペレット状にし、洗浄緩衝液で3回洗浄し、ビオチン化した単量体ActRII-Fc融合抗原の濃度を徐々に下げながら(100nMから1nM)平衡条件下で室温にてインキュベートした。次いで、酵母を2回洗浄し、LC-FITC(1:100で希釈)、及び二次試薬のSA-633(1:500で希釈)またはEA-PE(1:50で希釈)で4にて15分間染色した。氷冷洗浄緩衝液で2回洗浄した後、細胞ペレットを0.

30

40

50

4 mLの洗浄緩衝液に再懸濁させ、ストレーナーキャップ付き選別チューブに移した。FACSARIAソーター(BD Biosciences)を使用して選別を実施し、バックグラウンド対照と比べて特定の結合物質を選択するため選別ゲートを割り当てた。その後の選択ラウンドは、CHO細胞からの可溶性膜タンパク質を利用して非特異的な試薬結合物質数を減らすため(例えば、WO14/179363及びXu et al., Protein Eng. Des. Sel. 26(10):663-670(2013)を参照のこと)、及びActRII(ActRIIBまたはActRIIA)に対する親和性が改善された結合物質を、ActRII-Fc(それぞれ、ActRIIB-Fc及びActRIIA-Fc抗原)を使用して同定するために使用された。最終選別ラウンドの後、酵母を播種し、個々のコロニーを特徴付け用及び親和性成熟についてのクローンの指定用に収穫した。

10

【0330】

親和性成熟

ナীবクローンの結合最適化は、軽鎖の多様化;CDRH及び/CDRH2の多様化;ならびにVHとVLの順次変異誘発の実施という3つの成熟戦略を利用して行われた。

【0331】

軽鎖の多様化:重鎖プラスミドは、抽出されたナীবな産物(上記)であり、多様性が 1×10^6 の軽鎖ライブラリーに変換された。選択は、1ラウンドのMACS選別及び2ラウンドのFACS選別で、それぞれのラウンドに10 nMまたは1 nMのビオチン化したActRII-Fc抗原(ActRIIB-FcまたはActRIIA-Fc)を使用して上記のように実施した。

20

【0332】

CDRH1及びCDRH2の選択:軽鎖の多様化手順により選択されたクローンからのCDRH3を、多様性が 1×10^8 の、CDRH1及びCDRH2のバリエーションを有する作製済みライブラリー内に組み換え、それぞれActRIIB及びActRIIA抗原を使用して上記のように並行選択を実施した。親和性の最も高い抗体選択するため、ビオチン化抗原-抗体酵母複合体と、非ビオチン化抗原とを様々な時間インキュベートすることにより親和性圧力をかけた。

【0333】

VHmut/VKmutの選択:CDRH1及びCDRH2の選択手順により得られたクローンを、エラープライムPCRに基づく重鎖及び/または軽鎖の変異誘発による親和性成熟の追加ラウンドに供した。選択は、ActRIIBまたはActRIIAを抗原として使用して概ね上記のように実施されたが、すべての選択ラウンドについてFACS選別を使用することを追加した。抗原濃度を下げ、低温での抗原競合時間を増やして、最適な親和性のためにさらに圧力をかけた。

30

【0334】

抗体の生成及び精製

さらなる特徴付け用に十分な量の選択抗体を生成するために、酵母クローンを飽和まで増殖させ、次いで、振とうしながら30で48時間誘導した。誘導後、酵母細胞をペレット状にし、上清を精製用に回収した。プロテインAカラムを使用してIgGを精製し、酢酸(pH2.0)で溶出させた。パパイン消化によりFab断片を生成し、Kappa Select(GE Healthcare Life Sciences)で精製した。

40

【0335】

ForteBio K_D測定

選択抗体についてのForteBio親和性測定を、概ね前述のように実施した(例えば、Estep et al., Mabs, 5(2):270-278(2013)を参照のこと)。簡単に言えば、ForteBio親和性測定は、IgGをオンラインでAHQセンサーに添加して実施された。センサーをオフラインでアッセイ緩衝液中にて30分間平衡化させた後、ベースラインの確立のためにオンラインで60秒間モニターした。添加したIgGを有するセンサーを100 nMの抗原に5分間に曝露した後、解離速度測定の

50

ためそれらをアッセイ緩衝液に5分間移した。1:1結合モデルを使用して動態を分析した。

【0336】

MSD-SET K_D 測定

選択抗体の平衡親和性測定を、概ね前述のように実施した(Estep et al., Mabs 5(2):270-278(2013))。簡単に言えば、10~100 pMで一定に保たれ、かつ、10 pMから開始して10 nMまでのFabまたはmAbの3倍から5倍の系列希釈と共にインキュベートした抗原(ActRIIB単量体またはActRIIA単量体)を用いて、溶液平衡滴定(SET)をPBS+0.1% IgG不含BSA(PBSF)中で実施した。抗体(20 nMのPBS)を、標準結合MSD-ECLプレートに4で一晩または室温で30分間コートした。その後、700 rpmで振盪しながらプレートをBSAで30分間ブロッキングし、次いで、洗浄緩衝液(PBSF+0.05% Tween 20)で3回洗浄した。SET試料を加え、700 rpmで振盪しながらプレート上で150秒間インキュベートした後、1回洗浄した。プレートに捕捉された抗原を、250 ng/mLのスルホタグ標識ストレプトアビジン含有PBSFを用いて、プレートでの3分間のインキュベーションにより検出した。プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した後、界面活性剤入り1×Read Buffer Tを使用してMSD Sector Imager 2400装置で読み取った。遊離抗原の割合を、滴定抗体の関数としてPrismでプロットし、 K_D を抽出するために二次方程式に適合させた。処理能力を向上させるため、SET試料の調製を含め、MSD-SET実験全体を通してリキッドハンドリングロボットを使用した。

【0337】

Octet Red 384でのエピトープマッピング/リガンド阻止

標準的サンドイッチ形式の交差阻止アッセイを使用して選択抗体のエピトープマッピング/リガンド阻止を実施した。対照の抗標的IgGをAHQセンサーに添加し、センサー上の非占有Fc結合性部位を無関係のヒトIgG1抗体でブロッキングした。次いで、センサーを100 nMの標的抗原に曝露してから、第2の抗標的抗体またはリガンドに曝露した。ForteBioのData Analysis Software 7.0を使用してデータを処理した。抗原会合後の第2の抗体またはリガンドによる追加の結合は、非占有エピトープ(非競合)を示し、結合がない場合はエピトープ阻止(競合物質またはリガンド阻止)を示す。

【0338】

サイズ排除クロマトグラフィー

TSK gel Super SW mAb HTPカラム(22855)を使用して酵母で産生されたmAbの高速SEC分析をランあたり6分のサイクルタイムで0.4 mL/分にて行った。200 mMのリン酸ナトリウムと250 mMの塩化ナトリウムを移動相として使用した。

【0339】

動的走査蛍光定量法

10 uLの20×Sypro Orangeを、20 uLのmAbまたはFab溶液(0.2~1 mg/mL)に加えた。RT-PCR装置(BioRad CFX96 RT-PCR)を使用してサンプルプレート温度の勾配を0.5ずつ40℃から95℃まで上昇させ、各温度で2分間の平衡を設けた。生データのマイナスの一次導関数を使用して T_m を引き出した。

【0340】

前述の分析に基づき、好ましい特性を有するナイーブActRII結合性抗体の配列を確認し、上記の成熟戦略を使用した結合最適化用を選択した。

【0341】

作製された例示的なナイーブActRII結合性タンパク質は、表1に提示されているK01、L01、N01、及びP01である。作製された例示的な最適化ActRII結

10

20

30

40

50

合性タンパク質は、表 1 に提示されている J 0 1 及び M 0 1 である。

【 0 3 4 2 】

実施例 2 . A c t R I I 結合性のナイーブ抗体及び最適化抗体の特徴付け

先の例に従って作製された例示的なナイーブ A c t R I I 結合性タンパク質及び結合最適化 A c t R I I 結合性タンパク質を、配列、 S P R、及び細胞ベースのレポーターアッセイ分析によりさらに特徴付けした。

【 0 3 4 3 】

実施例 1 に記載の方法に従って作製された例示的なナイーブ A c t R I I 結合性抗体及び結合最適化 A c t R I I 結合性抗体の配列を表 1 に示す（例示的 C D R 配列には下線が引かれている）。

【 0 3 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1：例示的 A c t R I I 結合性タンパク質

A c t R I I B 結合性抗体

K O 1	
V	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTC
H	CCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTG
	GATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTCCTATAGTGG
	GAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTC
	CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGT
	ACTACTGCGCCAGAGACAGTTTGAGATACGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACA
	ACTGTCACCGTCTCCTCA(配列番号 19)
V	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTY
H	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLRYGMDVWGQGTITVTS
	S(配列番号 20)
	CDR1:GISSSSSYYWG(配列番号 21)
	CDR2:SISYSGSTYYNPSLKS(配列番号 22)
	CDR3:ARDSLRYGMDV(配列番号 23)
	ABR1:GISSSSSYYWG(配列番号 24)
	ABR2:WIGSISYSGSTYY(配列番号 25)
	ABR3:RDSLRYGMDV(配列番号 26)
H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTC
	CCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTG
	GATTCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTCCTATAGTGG
	GAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTC
	CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGT
	ACTACTGCGCCAGAGACAGTTTGAGATACGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACA
	ACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
	TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
	CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC
	ACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGA
	CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
	CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
	ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
	CCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
	GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
	CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
	ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
	TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
	AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA
	GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
	GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC
	CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGT
	GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
	CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA(配列
	番号 27)

10

20

30

40

【 0 3 4 5 】

【表 1 - 2】

H	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLRYGMDVWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号 28)	
V	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCAC	10
L	CATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGC TTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCG GGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTACGCCCTCG CCCCCTCTAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA(配列番号 29)	
V	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRES	20
L	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYALAPPRTFGGGTKVEIK(配列番号 30)	
	CDR1:KSSQSVLYSSNNKNYLA(配列番号 31)	
	CDR2:WASTRES(配列番号 32)	
	CDR3:QQYALAPPRT(配列番号 33)	
	ABR1:QSVLYSSNNKNYLA(配列番号 34)	
	ABR2:LLIYWASTRES(配列番号 35)	
	ABR3:QQYALAPPR(配列番号 36)	
L	GACATCGTAATGACTCAAAGCCCCGACAGTCTGGCCGTGAGCCTGGGGGAGCGCGCTAC AATCAATTGTAAGTCCAGTCAGTCTGTCTGTACTCTTCTAACAACAAGAATTACTTGGCT TGGTACCAGCAGAAAGCCCGGTCAGCCACCCAACTGCTTATCTACTGGGCATCTACTCGG GAATCAGGAGTGCCTGACAGGTTGAGCGGGAGTGGTAGCGGAACCGATTTTACCCTCAC CATTAGTTCTCTTCAGGCTGAGGATGTAGCTGTATACTACTGTCAGCAGTATGCTCTGGCT CCACCTAGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAAAAGAACCGTCGCCGCACC ATCTGTTTTTATATTTCCCCCTAGTGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCTGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTTCTATCCCCGAGAGGCTAAGGTTGAGTGGAAAGTGGATAACGC ACTGCAATCTGGTAATTCTCAGGAGAGCGTTACAGAACAGGATAGCAAGGACAGCACAT ATTCAGTGAAGCAGTACCCTCACCTTGCTAAGGCAGATTACGAAAAACACAAGGTATATG CCTGCGAAGTAACCTACCAAGGACTCAGCAGTCCCGTCACAAAATCTTTCAACCGAGGC GAATGCTAG(配列番号 37)	30
L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYALAPPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKRVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC(配列番号 38)	40

【 0 3 4 6 】

【表 1 - 3】

L O 1	
V	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
H	CACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCG
	CCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTCCTATAGTGGGAGCACCT
	ACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAG
	TTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAG
	AGACAGTTTGAGATACGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACGTGCACCGTCTCCT
	CA(配列番号 19)
V	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNP
H	SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDRLRYGMDVWVGQTTVTVSS(配列番号 20)
	CDR1:GSISSSSYYWG(配列番号 21)
	CDR2:SISYSGSTYYNPSLKS(配列番号 22)
	CDR3:ARDSLRYGMDV(配列番号 23)
	ABR1:GSISSSSYYWG(配列番号 24)
	ABR2:WIGSISYSGSTYY(配列番号 25)
	ABR3:RDSLRYGMDV(配列番号 26)
H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
	CACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATTCTG
	CCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTCCTATAGTGGGAGCACCT
	ACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAG
	TTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAG
	AGACAGTTTGAGATACGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACGGTCACCGTCTCCT
	CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
	GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
	TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTC
	CTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
	AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
	GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT
	GGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
	GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
	TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
	GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGC
	TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG
	AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
	ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
	ATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA
	GACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGT
	GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
	TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA(配列番号 27)

10

20

30

40

【 0 3 4 7 】

【表 1 - 4】

H	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLRYGMDVWGQTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号 28)
V	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
L	CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAG CCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG TCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTAGGTATACAATGTCTGGCCTAGGACTTTTGGCG GAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA(配列番号 95)
V	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGT
L	EFTLTISLQSEDAFVYYCQVYNVWPRTFGGGTKVEIK (配列番号 39)
	CDR1:RASQSVSSNLA(配列番号 40)
	CDR2:GASTRAT(配列番号 41)
	CDR3:QVYNVWPRT(配列番号 42)
	ABR1:QSVSSNLA(配列番号 43)
	ABR2:LLIYGASTRAT(配列番号 44)
	ABR3:QVYNVWPR(配列番号 45)
L	GAAATCGTCATGACCCAGAGCCCAGCAACTCTCAGCGTTAGCCCAGGAGAGCGCGCTAC ACTGTCTTGCAGAGCCTCACAATCCGTGTCAAGTAATCTCGCTTGGTACCAGCAAAAGC CCGGTCAAGCTCCTCGGCTTCTCATCTATGGCGCCAGTACTCGTGCAACCGGCATTCCTG CACGATTCTCTGGGAGCGGATCAGGAACAGAGTTCACCCCTTACCATTAGTAGCCTGCAAT CAGAGGATTTTCGAGTCTATTACTGCCAAGTCTACAACGTCTGGCCAAGAACATTTGGTG GCGGCACCAAAGTAGAGATCAAACGGACAGTAGCTGCACCCTCTGTGTTTATATTCCCTC CCAGCGATGAGCAGCTGAAGTCTGGGACAGCCTCAGTCGTTTGCCTTCTGAATAATTTTT ATCCTCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGATAACGCTCTCCAGTCAGGTAAGTCA CAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGATAGCAAGGATTCCACCTATTCCCTGAGCTCTACTCTG ACTCTGTCAAAGGCCGATTACGAAAAGCACAAAGGTCTATGCATGTGAGGTGACTCATCA GGGCCTGTCTTCTCCAGTGACCAAGTCCTTCAACAGAGGGGAGTGCTGA(配列番号 46)
L	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFS GSGSGTEFTLTISLQSEDAFVYYCQVYNVWPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC(配列番号 47)

10

20

30

40

【 0 3 4 8 】

50

【表 1 - 5】

M O 1	
V H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGGGAGCTATGGCATGACTTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTAGTGGAAGTG GTGGTGGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAAGGGTCCTAGAGTAGTGGGCATGGATGTGTGGG GCCAGGGAACAACTGTCACCGTCTCCTCA(配列番号 48)
V H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSG GGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGPVVGMMDVWG QGTTVTVSS(配列番号 49)
	CDR1:SYGMT(配列番号 50)
	CDR2:VISGSGGGTYADSVKG(配列番号 51)
	CDR3:AKGPVVGMMDV(配列番号 52)
	ABR1:FTFGSYGMT(配列番号 53)
	ABR2:VISGSGGGTYADSVKG(配列番号 54)または WVSVISGSGGGTY(配列番号 55)
	ABR3:AKGPVVGMMDV(配列番号 56)または KGPRVVGMMDV(配列番号 57)
V L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGGTA TTCAGTTACCCTCTCACTTTTGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA(配列番号 58)
V L	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCQQVFSYPLTFGGGTKVEIK(配列番号 59)
	CDR1:RASQGISSWLA(配列番号 60)
	CDR2:AASSLQS(配列番号 61)
	CDR3:QQVFSYPLT(配列番号 62)
	ABR1:QGISSWLA(配列番号 63)
	ABR2:LLIYAASSLQS(配列番号 64)
	ABR3:QQVFSYPL(配列番号 65)

【 0 3 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

N O 1	
V H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTC CCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGG ATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTCCTATAGTGGG AGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCC AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTA CTACTGCGCCAGAGACAGTTTGAGATACGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAA CTGTCAACCGTCTCCTCA(配列番号 19)
V H	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYY NPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLRYGMDVWVGQGTTVTVSS(配列番号 20)
	CDR1:GSISSSSYYWG(配列番号 21)
	CDR2:SISYSGSTYYNPSLKS(配列番号 22)
	CDR3:ARDSLRYGMDV(配列番号 23)
	ABR1:GSISSSSYYWG(配列番号 24)
	ABR2:WIGSISYSGSTYY(配列番号 25)
	ABR3:RDSLRYGMDV(配列番号 26)
H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTC CCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGG ATTCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTCCTATAGTGGG AGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCC AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTA CTACTGCGCCAGAGACAGTTTGAGATACGGAATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAA CGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGGTGCA CACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAATCACA CATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA(配列番号 27)

10

20

30

40

【 0 3 5 0 】

【表 1 - 7】

H	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQQPPGKGLEWIGSISYSGS TYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRLRYGMDVWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番 号 28)	
V L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTGGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGCCTCCAGTTTGA AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGGTATACG GCAGTTACTCTCCTAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA(配列 番号 66)	10
V L	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES FTLTISLQPDFFATYYCQVYGSYSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 67)	
	CDR1:RASQSIGSWLA(配列番号 68)	20
	CDR2:KASSLES(配列番号 69)	
	CDR3:QVYGSYSPRT(配列番号 70)	
	ABR1:QSIGSWLA(配列番号 71)	
	ABR2:LLIYKASSLES(配列番号 72)	
	ABR3:QVYGSYSPR(配列番号 73)	
L	GACATTGAGATGACTCAATCCCCATCAACCCTGAGTGCATCCGTGGGTGACCGCG TAACAATTACATGTCGGGCCTCCCAAAGCATCGGTAGCTGGCTGGCATGGTACCA GCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCTTCTCTGGAG TCTGGGGTGCCCTCTAGGTTTTAGGTTTCAGGTTTCAGGCTCTGGCACAGAGTTTACATTGA CCATCTCCTCTCTTCAGCCAGACGACTTTGCTACATATTATTGCCAGGTGTACGGG TCATACTCTCCTCGGACCTTCGGCGGGCGGAACCAAGGTCGAAATCAAACGGACA GTGGCTGCACCCTCCGTGTTTATTTTTCCACCCTCCGACGAACAGCTGAAGTCCG GAACCGCCTCCGTGGTCTGCCTTCTTAACAATTTCTATCCACGCGAGGCCAAAGT GCAGTGAAGGTTGATAACGCCCTTCAGAGTGGAACTCTCAAGAGTCAGTAAC CGAGCAGGACTCCAAAGACTCTACTTATTCCCTCAGCTCTACACTTACTTTGAGT AAAGCTGACTACGAGAAACATAAAGTGACGCTGCGAGGTGAC CCATCAGGGGCTTTCTCACCCTGACAAAATCATTCAATAGAGGCGAGTGCTGA (配列番号 74)	30
L	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES VPSRFGSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQVYGSYSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号 75)	40

【 0 3 5 1 】

【表 1 - 8】

P O 1	
V H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATCCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAGACTTCCTCAGTATTCAAGGCCCTTCGACTATTG GGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA(配列番号 76)
V H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTSYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPQYSRPFDYWGQGTLLTVSS (配列番号 77)
	CDR1:GFTFSSY(配列番号 78)
	CDR2:AISGSGGSTSYADSVKG(配列番号 79)
	CDR3:ARLPQYSRPFDY(配列番号 80)
	ABR1: <u>FTFSSYAMS</u> (配列番号 81)
	ABR2:WVSAISGSGGSTSY(配列番号 82)
	ABR3:RLPQYSRPFDY(配列番号 83)
V L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGGGAC ACAGTTTCCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA(配列番号 84)
V L	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQGHSFPLTFGGGTKVEIK (配列番号 85)
	CDR1:RASQGISSWLA(配列番号 86)
	CDR2:AASSLQS(配列番号 87)
	CDR3:QQGHSFPLT(配列番号 88)
	ABR1:QGISSWLA(配列番号 89)
	ABR2:LLIYAASSLQS(配列番号 90)
	ABR3:QQGHSFPL(配列番号 91)

【 0 3 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

A c t R I I B と A c t R I I A に結合性の抗体

J 0 1	
V	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
H	AAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCTCGTACCGTATGCACTGGG
	TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTTATCGTGCCTAGTGG
	TGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGA
	CACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACAC
	GGCGGTGTACTACTGCGCTAGAGTATCTAGGTACGCCCCAGAGCCAATGGACGTA
	TGGGGCCAGGGAACAACCTGTCACCGTCTCCTCA(配列番号 1)
V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWMGFIVPS
H	GGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARVSRYAPEPMDVW
	GQGTTVTVSS(配列番号 2)
	CDR1:SYRMH(配列番号 3)
	CDR2:FIVPSGGSTSYAQKFQG(配列番号 4)
	CDR3:VSRYAPEPMDV(配列番号 5)
	ABR1:YTFTSYRMH(配列番号 6)
	ABR2:FIVPSGGSTSYAQKFQG(配列番号 7)または WMGFIVPSGGSTSYA(配列番号 8)
	ABR3:ARVSRYAPEPMDV(配列番号 9)または RVSRYAPEPMDV(配列番号 10)
V	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
L	TCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGGTGGTTAGCCTGGTATCA
	GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA
	AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
	CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTGAGCAGGCATT
	CTCCACCTTGGAACCTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA(配列番号 11)
V	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
L	VPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQAFSHPWTFGGGTKVEIK(配列番号 12)
	CDR1:RASQGISRWLA(配列番号 13)
	CDR2:AASSLQS(配列番号 14)
	CDR3:QQAFSHPWT(配列番号 15)
	ABR1:QGISRWLA(配列番号 16)
	ABR2:LLIYAASSLQS(配列番号 17)
	ABR3:QQAFSHPW(配列番号 18)

【 0 3 5 3 】

S P R (B I A C O R E (商 標) による分析)及び細胞ベースのレポーターアッセイを使用して、表 1 に記載の A c t R I I 結合性タンパク質の結合をより詳細に特徴付けした。

【 0 3 5 4 】

標準的 B I A C O R E (登録商標) による分析を 3 7 で使用して、単量体及び二量体の、h A c t R I I B 及び h A c t R I I A に結合する J 0 1、K 0 1、L 0 1、M 0 1、N 0 1、及び P 0 1 抗体の動態学的特徴付けを実施した。手短に言えば、抗 h F c I g G B i a c o r e チップに抗体を捕捉し、異なる濃度の二量体及び単量体の A c t R I I B または A c t R I I A を捕捉抗体及び対照表面に 2 連で注入した。動的速度定数を得

るため、BiaEvaluationソフトウェア(GE Healthcare)を使用してデータをダブルリファレンスし、1:1相互作用モデルに適合させた。結合速度定数の比 k_d/k_a により平衡結合定数 K_D を決定した。

【0355】

J01、K01、L01、M01、N01、及びP01抗体の結合パラメータ分析の結果を表2に示す。

【表2】

表2: ActRIIB及びActRIIAに結合するJ01、K01、L01、M01、N01、及びP01抗体

mAb	ActRIIB 単量体			ActRIIB 二量体			ActRIIA 単量体			ActRIIA 二量体		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
K01	1.48×10^5	2.37×10^{-3}	1.60×10^{-8}	1.04×10^5	6.83×10^{-4}	6.57×10^{-9}	未試験			結合なし		
L01	9.21×10^5	1.79×10^{-2}	1.95×10^{-8}	2.12×10^5	3.65×10^{-4}	1.72×10^{-9}	未試験			結合なし		
M01	1.16×10^6	8.72×10^{-5}	7.55×10^{-11}	3.04×10^5	3.24×10^{-5}	1.07×10^{-10}	未試験			結合なし		
N01	4.16×10^5	7.69×10^{-3}	1.85×10^{-8}	1.82×10^5	3.35×10^{-4}	1.84×10^{-9}	未試験			結合なし		
P01	結合なし			3.88×10^5	1.45×10^{-2}	3.74×10^{-8}	未試験			結合なし		
J01	1.05×10^6	2.20×10^{-4}	2.09×10^{-10}	4.52×10^5	1.69×10^{-5}	3.74×10^{-11}	8.28×10^5	2.59×10^{-3}	3.13×10^{-9}	4.84×10^5	9.31×10^{-5}	1.92×10^{-10}

【0356】

J01、K01、L01、M01、N01、及びP01抗体はそれぞれ、ActRIIB及び/またはActRIIAの単量体及び二量体の結合について平衡解離定数(K_D)動態パラメータを示した。

【0357】

ActRIIAのActRIIB中和能力は、293FT細胞のCRISPE-Cas9修飾により得られるF2.35(IIAノックアウト)細胞における、細胞ベースのアクチビンAシグナル伝達アッセイで評価される。細胞に、Smad2/3応答要素pGL3(CAGA)12を含有する実験的ルシフェラーゼレポータープラスミド及び対照ルシフェラーゼレポータープラスミドpRL-CMVを同時導入する。翌日、mAbの系列希釈を行い、プラスミドを導入された細胞に加えて30分間インキュベートし、その後、アクチビンA等の活性化因子を加え(最終濃度5ng/ml)、さらに6時間のインキュベ

ーションに供した。細胞をPBS中で1回洗浄し、溶解させ、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を製造者の指示書に従って使用してアッセイする。Infinite M200プレートリーダーを使用して化学発光を測定する。実験的レポーターのルシフェラーゼ活性を、対照レポーターから取得したルシフェラーゼ活性で正規化する。抗ActRIIA中和活性を評価するため、A204細胞に同じレポーター遺伝子を導入する。A204は、ActRIIA及び低量の内在性ActRIIBを発現する。遺伝子導入された細胞を上記のようにアッセイする。

【0358】

実施例3．A204細胞におけるレポーター遺伝子アッセイ

10

抗ActRIIFab及び組換え抗体等のActRII結合性タンパク質がActRII(例えば、ActRIIB)を中和する能力を決定するために、A204細胞におけるレポーター遺伝子アッセイを使用することができる。このアッセイは、pGL3(CAGA)12レポータープラスミド(Dennler et al., EMBO 17:3091-3100(1998))、及び導入効率を確認するためのRenillaレポータープラスミド(pRLCMV)を導入された、ヒト横紋筋肉腫細胞株に基づき得る。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、Smad2及びSmad3を介してシグナル伝達する因子に一般に使用するものである。A204細胞株は主にActRIIBよりむしろActRIIAを発現することから、ActRIIBを中和する潜在的能力について抗体を直接試験することは不可能である。その代わり、被験物質が、ActRIIBとActRIIAの両方に高親和性で結合することができるリガンド(アクチビンA、GDF11、またはミオスタチン等)による内在性ActRIIAの活性化に対する可溶性融合タンパク質ActRIIB-Fcの抑制効果を中和する能力を検出するよう、このアッセイを設計することができる。

20

【0359】

したがって、このアッセイでは、抗ActRIIBのFabまたは抗体が中和している場合、ActRIIB-Fcの存在にもかかわらずリガンド媒介性のActRIIA活性化が起こる。アッセイの第1日目、A204細胞(ATCC HTB-82)を、ウェルあたり 10^5 細胞で48ウェルプレートに入れる。第2日目、 $10\mu\text{g}$ のpGL3(CAGA)12、 $1\mu\text{g}$ のpRLCMV、 $30\mu\text{l}$ のFugene 6(Roche Diagnostics)、及び $970\mu\text{l}$ のOptiMEM(Invitrogen)を含有する溶液を30分間ブレインキュベートしてからマッコイ増殖培地に加え、それを、播種した細胞に加え($500\mu\text{l}$ /ウェル)室温で一晩のインキュベーションに供する。第3日目、培地を除去し、細胞を、下記のように調製したリガンドと阻害剤の混合物と共に37で6時間インキュベートする。

30

【0360】

被験ActRII結合性タンパク質の中和能力を評価するため、被験物質の系列希釈を、48ウェルプレートに $200\mu\text{l}$ の体積のアッセイ緩衝液(マッコイ培地+0.1%BSA)で作製する。その後、等容量のActRIIB-Fc($200\mu\text{g}/\text{ml}$)含有アッセイ緩衝液を加える。被験溶液を37で30分間インキュベートし、次いで、 $400\mu\text{l}$ のGDF11($10\text{ng}/\text{ml}$)またはアクチビンA($10\text{ng}/\text{ml}$)を全ウェルに加え、この混合物のうち $350\mu\text{l}$ をA204細胞の48ウェルプレートの各ウェルに加える。各濃度の被験ActRII結合性タンパク質を2連で試験する。ActRIIB-Fcの最終濃度は $50\text{ng}/\text{ml}$ である(これは、アクチビンAの最終濃度が $5\text{ng}/\text{ml}$ の場合のこのアクチビンAシグナル伝達阻害剤の IC_{50} である)。被験溶液との6時間のインキュベーション後、細胞を、0.1%BSAを含有するリン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、次いで受動的溶解バッファ(Promega E1941)で溶解し、-70で一晩保存する。第4日目及び最終日、穏やかに振盪しながらプレートを室温まで温める。細胞ライセートを化学発光プレート(96ウェル)に2連で移し、Dual-Luciferase Reporter Assayシステム(Promega E1980)

40

50

製試薬を用いてルミノメーターで分析し、正規化ルシフェラーゼ活性を決定する。被験物質と、被験物質が存在しない対照との間のルシフェラーゼ活性の相違は、被験物質の存在に起因する細胞内シグナル伝達の相違を反映する。

【配列表】

0007669291000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

ライブ 7

(72)発明者 グリンバーグ, アシャ

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州, レキシントン, フォーレン ロード 3 7

(72)発明者 サコ, ダイアン

アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州, メドフォード, ミスティック ストリート 1 4

(72)発明者 カストングアイ, ロゼリン

アメリカ合衆国 0 2 4 7 2 マサチューセッツ州, ウォータータウン, ダウニー ストリート 4 4

審査官 籠島 福太郎

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 0 8 6 5 0 (U S , A 1)

特表 2 0 1 2 - 5 2 5 1 2 8 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 1 3 0 1 5 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 7 2 4 4 8 (W O , A 2)

特表 2 0 1 5 - 5 2 5 2 3 0 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 1 0 0 0 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 2 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 1 / 1 6

A 6 1 P 3 / 0 0

A 6 1 P 3 / 0 4

A 6 1 P 3 / 1 0

A 6 1 P 9 / 0 0

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 9 / 1 2

A 6 1 P 1 1 / 0 0

A 6 1 P 1 7 / 0 2

A 6 1 P 1 9 / 0 0

A 6 1 P 1 9 / 1 0

A 6 1 P 2 1 / 0 0

A 6 1 P 2 1 / 0 4

A 6 1 P 2 7 / 0 2

A 6 1 P 2 9 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 2

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 P 2 1 / 0 8

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

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