

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成26年4月17日(2014.4.17)

【公開番号】特開2014-40483(P2014-40483A)

【公開日】平成26年3月6日(2014.3.6)

【年通号数】公開・登録公報2014-012

【出願番号】特願2013-243668(P2013-243668)

【国際特許分類】

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 7/06 Z N A

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 45/00

【手続補正書】

【提出日】平成26年1月16日(2014.1.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

アクチビン結合 A c t R I I ポリペプチドは、1つのドメインとして、A c t R I I ポリペプチド（例えば、A c t R I I a または A c t R I I b のリガンド結合部分）と、所望の特性（例えば、改善された薬物動態、より容易な精製、特定の組織への標的化など）を提供する1以上のさらなるドメインとを有する融合タンパク質であり得る。例えば、融合タンパク質のドメインは、インビボ安定性、インビボ半減期、取り込み／投与、組織局在化もしくは分布、タンパク質複合体の形成および／または精製のうちの1以上を増強し得る。アクチビン結合 A c t R I I 融合タンパク質は、免疫グロブリン F c ドメイン（野生型または変異型）、または血清アルブミン、または所望の特性（例えば、改善された薬物動態、改善された溶解性または改善された安定性）を提供する他のポリペプチド部分を含み得る。好ましい実施形態では、A c t R I I - F c 融合物は、F c ドメインと細胞外 A c t R I I ドメインとの間に位置する比較的構造の定まらない（unstructured）リンカーを含む。この構造の定まらないリンカーは、A c t R I I の細胞外ドメインのC末端におよそ15アミノ酸の構造の定まらない領域（「テイル」）に対応し得るか、または、1、2、3、4もしくは5アミノ酸、または、比較的二次構造が自由な、5~15、20、30、50もしくはそれ以上の長さのアミノ酸の人工配列であり得るか、あるいはこの両方の混合物であり得る。リンカーは、グリシン残基およびプロリン残基が豊富であり得、そして例えば、スレオニン／セリンおよびグリシンの単一の配列、または、スレオニン／セリンおよびグリシンの繰り返し配列（例えば、T G₄（配列番号22）もしくは S G₄（配列番号23）の單一体もしくは繰り返し）を含み得る。融合タンパク質は、エピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジン配列、または、GST融合物のような精製配列を含み得る。必要に応じて、可溶性のA c t R I I ポリペプチドは、グリコシ

ル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分に結合されたアミノ酸または有機誘導体化因子(organic derivatizing agent)に結合されたアミノ酸から選択される1以上の修飾されたアミノ酸残基を含む。薬学的調製物はまた、骨障害を処置するために使用される化合物のような1以上のさらなる化合物を含み得る。好ましくは、薬学的調製物は、発熱物質を実質的に含まない。一般に、ActRIIタンパク質は、患者における望ましくない免疫応答の可能性を無くすために、ActRIIタンパク質の天然のグリコシリ化を適切に媒介する哺乳動物細胞株において発現されることが好ましい。ヒトおよびCHOの細胞株は、首尾よく使用されており、そして、他の一般的な哺乳動物発現系が有用であることが予想される。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0133

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0133】

【数15】

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTTGCTGTGCTGCTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTCGCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACGGTGTGAACCGTGTT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGCATGTGTTGCTACCTGGAAGAATATTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAACAAAGGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAACGCCACCCACCGGTGGAACTCACACAT
 GCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GGCCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGGTCAAGCTGGCTGGTCAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCTCT
 ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
 GTCTCCGGTAAATGAGAATT (配列番号 14)

ActRIIa-hFcおよびActRIIa-mFcは共に、組換え発現にとって際立って扱いやすかった。図1に示されるように、タンパク質は、单一の十分に画定されたタンパク質のピークとして精製された。N末端の配列決定は、-ILGRSE**T**QE (配列番号11)の单一の配列を明らかにした。精製は、例えば、以下のうちの3またはそれ以上を任意の順序で含む一連のカラムクロマトグラフィー工程によって達成され得る：プ

ロテイン A クロマトグラフィー、Q セファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびカチオン交換クロマトグラフィー。精製は、ウイルス濾過およびバッファの交換により完了され得る。ActRI
Ia-hFcタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定すると、98%を超える純度、そして、SDS-PAGEによって決定すると、95%を超える純度まで精製された。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2014040483000001.app