

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-506452  
(P2014-506452A)

(43) 公表日 平成26年3月17日(2014.3.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A 4 B O 2 4
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00 1 O 2 4 B O 6 5
C 07 K 16/46	(2006.01)	C 07 K 16/46 4 C O 8 4
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K 19/00 4 H O 4 5
A 61 P 7/06	(2006.01)	A 61 P 7/06

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-550573 (P2013-550573)	(71) 出願人	513183418 フェルマックス・ファーマシューティカル ズ・インコーポレイテッド F e r r u m a x P h a r m a c e u t i c a l s, I n c. アメリカ合衆国O 2 1 1 4 マサチューセッ ツ州ボストン、ブルフィンチ・ブレイスク 番、サード・フロア 392015468 ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレイ ション T H E G E N E R A L H O S P I T A L C O R P O R A T I O N アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン フルーツストリート 55 最終頁に続く
(86) (22) 出願日	平成24年1月19日 (2012.1.19)		
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月17日 (2013.9.17)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/021829		
(87) 國際公開番号	W02012/150973		
(87) 國際公開日	平成24年11月8日 (2012.11.8)		
(31) 優先権主張番号	61/434,405		
(32) 優先日	平成23年1月19日 (2011.1.19)		
(33) 優先権主張國	米国(US)		

(54) 【発明の名称】鉄恒常性を制御するための組成物およびそれを用いる方法

## (57) 【要約】

本開示は、ヘモジュベリン - IgG Fc ドメイン融合タンパク質、それに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体、ならびに鉄恒常性の制御および鉄恒常性に関連する疾患の治療のためにこれらの融合タンパク質を用いる方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 9 の配列と 95 % 同一の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体を含む組成物。

**【請求項 2】**

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体が、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定すると少なくとも 98 % 純粋である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体がグリコシル化されている、請求項 1 に記載の組成物。 10

**【請求項 4】**

グリコシル化パターンが哺乳類のグリコシル化パターンである、請求項 3 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

アスパラギン 83、アスパラギン 178 および / またはアスパラギン 337 がグリコシル化されている、請求項 4 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

グリコシル化パターンがチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株に由来するものである、請求項 4 に記載の組成物。 20

**【請求項 7】**

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の N 末端アミノ酸がグルタミンである、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の N 末端アミノ酸の N 末端が QCKILRCNAE ( 配列番号 10 ) である、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

配列番号 9 の断片が配列番号 9 の N 末端の 150 個のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の組成物。 30

**【請求項 10】**

組成物が実質的に発熱物質を含まない、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 11】**

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の血清半減期が少なくとも 10 時間である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 12】**

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体が、少なくとも 10<sup>-7</sup> M の K<sub>D</sub> で骨形態形成タンパク質 - 6 ( 「 BMP - 6 」 ) に結合し、かつ、 BMP - 6 シグナル伝達を阻害する、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 13】**

組成物が、投与された時に対象のヘモグロビンおよび / またはヘマトクリットを増加させる、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 14】**

組成物が、貧血の対象に 1 か月以上投与された時に、貧血の対象のヘモグロビンおよび / またはヘマトクリットを少なくとも正常レベルまで増加させる、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 15】**

融合タンパク質がホモ二量体を形成している、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 16】**

ホモ二量体が、配列番号 9 のシステイン 373、380 および / または 383 の間の化 50

学的相互作用を通じて形成されている、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

化学的相互作用がジスルフィド結合である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の融合ポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 1 9】

核酸分子が配列番号 2 の配列と 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 8 に記載の核酸分子。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の核酸配列を含む哺乳類細胞。

10

【請求項 2 1】

細胞が C H O 細胞である、請求項 2 0 に記載の哺乳類細胞。

【請求項 2 2】

それを必要としている対象の鉄恒常性障害を治療する方法であって、請求項 1 に記載の組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって鉄恒常性障害を治療する方法。

【請求項 2 3】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体を含む組成物であって、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体が N 末端ポリペプチドおよび C 末端ポリペプチドを含み、N 末端ポリペプチドが配列番号 3 の配列と 9 5 % 同一の配列を含み、かつ、C 末端ペプチドが配列番号 4 、 5 、 6 、 7 および 8 からなる群から選択される配列と 9 5 % 同一の配列を含む組成物。

20

【請求項 2 4】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体が、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定すると少なくとも 9 8 % 純粋である、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体がグリコシル化されている、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

グリコシル化パターンが哺乳類のグリコシル化パターンである、請求項 2 5 に記載の組成物。

30

【請求項 2 7】

グリコシル化パターンがチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞株に由来するものである、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の N 末端アミノ酸がグルタミンである、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の N 末端アミノ酸の N 末端が Q C K I L R C N A E ( 配列番号 1 0 ) である、請求項 2 8 に記載の組成物。

40

【請求項 3 0】

組成物が実質的に発熱物質を含まない、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の血清半減期が少なくとも 1 0 時間である、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体が、少なくとも 1 0  $\cdot$  <sup>7</sup> M の K <sub>D</sub> で骨形態形成タンパク質 - 6 ( 「 B M P - 6 」 ) に結合し、かつ、B M P - 6 シグナル伝達を阻害する、請求項 2 3 に記載の組成物。

50

**【請求項 3 3】**

組成物が、投与された時に対象のヘマトクリットを増加させる、請求項 2 3 に記載の組成物。

**【請求項 3 4】**

組成物が、貧血の対象に 1 か月以上投与された時に、貧血の対象のヘマトクリットを少なくとも正常レベルまで増加させる、請求項 2 3 に記載の組成物。

**【請求項 3 5】**

融合タンパク質がホモ二量体を形成している、請求項 2 3 に記載の組成物。

**【請求項 3 6】**

請求項 2 3 に記載の融合ポリペプチドをコードする核酸分子。

10

**【請求項 3 7】**

核酸が配列番号 1 1 の核酸配列を含む、請求項 3 6 に記載の核酸。

**【請求項 3 8】**

請求項 3 6 に記載の核酸配列を含む哺乳類細胞。

**【請求項 3 9】**

細胞が C H O 細胞である、請求項 3 7 に記載の哺乳類細胞。

**【請求項 4 0】**

それを必要としている対象の鉄恒常性障害を治療および / または貧血を改善する方法であって、請求項 2 1 に記載の組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって鉄恒常性障害を治療および / または貧血を改善する方法。

20

**【請求項 4 1】**

それを必要としている対象の癌を治療する方法であって、請求項 1 に記載の組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって癌障害を治療する方法。

**【請求項 4 2】**

それを必要としている対象の癌の方法であって、請求項 2 3 に記載の組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって癌障害を治療する方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願**

30

本出願は 2 0 1 1 年 1 月 1 9 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 4 3 4 , 4 0 5 号の優先権を主張するものであって、その全体において参考することによって本明細書に援用される。

**【0 0 0 2】****技術分野**

本開示は、全体として、特に貧血の管理に関する鉄恒常性障害の治療、予防および改善に関する。より具体的には、本開示はヘモジュベリン - 免疫グロブリン F c ドメイン融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体、ならびにヒトにおける血清鉄、血清ヘモグロビンおよび / またはヘマトクリットレベルを変化させるためにこれらの組成物を用いる方法に関する。

40

**【背景技術】****【0 0 0 3】****背景**

鉄はほとんど全ての生物の増殖および生存に必要な必須元素である。赤血球 ( R B C ) は、赤色の、鉄に富むタンパク質であるヘモグロビン ( H b ) を含有し、それは肺から全ての体の筋肉および臓器へ酸素を輸送し、そこで酸素は反応し、体がその通常の活動に必要とするエネルギーを供給する。赤血球の数またはそれらが含有するヘモグロビンの量が正常値より低くなると、体が受け取る酸素がより少くなり、正しく機能するために体が必要とするよりも少ないエネルギーしか産生できなくなる。この状態は一般に貧血と呼ばれる。乳幼児および小児の中の貧血の一般的な原因は鉄欠乏である。米国における小児の

50

20%および発展途上国における小児の80%もが、18歳になるまでのある時点で貧血になる。Martin, P. L., et al. The Anemias, Principles and Practices of Pediatrics, 1657 (2d ed., Lippincott 1994)。

#### 【0004】

哺乳類では、鉄バランスは、主として食事に含まれる鉄の十二指腸吸収のレベルで制御される。ヒトにおいては、遺伝性ヘモクロマトーシス(HH)は食事に含まれる鉄の過吸収に起因する一般的な常染色体性劣性遺伝病であり、血漿および多臓器、特に脾臓、肝臓、および皮膚における鉄過剰状態をもたらし、これらの臓器および組織において鉄沈着による損傷をもたらす。

#### 【0005】

若年性ヘモクロマトーシスは、主要な鉄制御ホルモンであるヘプシジン(HAMP)およびヘモジュベリン(HFE2)をコードする遺伝子の変異に起因する鉄過剰症である(Roetto, A., et al.. 2003. Nut. Genet. 33:21-22; Papanikolaou, G., et al. 2004. Nut. Genet. 36:77-82.)。ヘモジュベリンが骨形成タンパク質(BMP)共受容体であり、ヘモジュベリン媒介性BMPシグナルがヘプシジン発現および鉄代謝を制御することが示されている(Babitt, J.L., et al. 2006. Nat. Genet. 38:531-539; Babitt, J.L., et al.. 2007. J Clin Invest. 117:1933-1939.)。しかしながら、ヘプシジンのインビボの内在性BMP制御因子は知られていない。

#### 【0006】

ヘモジュベリン(RGMcとしても知られている)は、50~60%のアミノ酸同一性を共有する、RGMaおよびDRAGON(RGMb)を含む反発性ガイダンス分子(Repulsive Guidance Molecules)ファミリーのタンパク質のメンバーである(Samad, T.A., et al. 2004. J. Neurosci. 24:2027-2036.)。

#### 【0007】

ヘプシジン発現および鉄代謝を制御するための、費用対効果が高く、効率的な方法が必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

#### 概略

本開示は、ヘモジュベリン('HJV') - 免疫グロブリンFcドメイン融合タンパク質を提供する。本開示は、鉄恒常性障害の治療のためにこれらのタンパク質を用いる方法も提供する。HJVは哺乳類HJVであってよい。より具体的には、HJVはマウスまたはヒトHJVであってよい。

#### 【0009】

本開示は、配列番号9の配列と95%同一の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体を含む組成物をさらに提供する。1つの実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定すると少なくとも98%純粋である。別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体は、グリコシリ化されている。特定の実施態様では、配列番号1および配列番号9のアスパラギン83、アスパラギン178およびアスパラギン337は、N-グリコシリ化部位である。この実施態様の1つの態様では、グリコシリ化パターンは哺乳類のグリコシリ化パターンである。具体的には、グリコシリ化パターンはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株に由来するものである。

#### 【0010】

別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体のN末端アミノ酸はグルタミンである。この実施態様の1つの態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体のN末端はQCKILRCNAE(配列番号10)である。別の実施態様では、N末端断片は、配列

10

20

30

40

50

番号 1 または 9 の最初の 150 個のアミノ酸に由来するいずれかの断片であってよい。

【0011】

別の実施態様では、組成物は実質的に発熱物質を含まない。別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体の血清半減期は少なくとも 10 時間である。別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体は、少なくとも  $10^{-7}$  M の K<sub>D</sub> で骨形態形成タンパク質 - 6 (「BMP-6」) に結合し、かつ、BMP-6 シグナル伝達を阻害する。別の実施態様では、組成物は、投与された時に対象のヘマトクリットを増加させる。別の実施態様では、組成物は、貧血の対象に 1 か月以上投与された時に、貧血の対象のヘマトクリットを少なくとも正常レベルまで増加させる。

10

【0012】

別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体は、ホモ二量体を形成している。この実施態様の 1 つの態様では、ホモ二量体は Fc ヒンジ領域内で形成されている。より具体的には、ホモ二量体は配列番号 9 内のシステイン 373、380 および / または 383 の間の化学的相互作用を通じて形成されている。具体的には、化学的相互作用はジスルフィド結合である。

【0013】

本開示は、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体をコードする核酸分子も提供する。1 つの実施態様では、核酸分子は配列番号 11 の配列と 95 % 同一の配列を含む。

20

【0014】

本開示は、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体をコードする核酸配列を含む哺乳類細胞も提供する。1 つの実施態様では、細胞は CHO 細胞である。

【0015】

本開示は、それを必要としている対象の、結果としての貧血を有する鉄恒常性障害を治療する方法であって、上記組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって鉄恒常性障害を治療し、貧血を改善する方法も提供する。

【0016】

本開示は、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体を含む組成物であって、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体が N 末端ポリペプチドおよび C 末端ポリペプチドを含み、N 末端ポリペプチドが配列番号 3 の配列と 95 % 同一の配列を含み、かつ、C 末端ペプチドが配列番号 4、5、6、7 および 8 からなる群から選択される配列と 95 % 同一の配列を含む組成物も提供する。1 つの実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定すると少なくとも 98 % 純粋である。

30

【0017】

別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体はグリコシル化されている。この実施態様の 1 つの態様では、グリコシル化パターンは哺乳類のグリコシル化パターンである。具体的には、グリコシル化パターンはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株に由来するものである。

40

【0018】

別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の N 末端アミノ酸はグルタミンである。この実施態様の 1 つの態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の N 末端は QCKILRCNAE (配列番号 10) である。

【0019】

別の実施態様では、組成物は実質的に発熱物質を含まない。別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体の血清半減期は

50

少なくとも 10 時間である。別の実施態様では、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体は、少なくとも  $10^{-7}$  M の K<sub>D</sub> で骨形態形成タンパク質 - 6 (「BMP-6」) に結合し、かつ、BMP-6 シグナル伝達を阻害する。別の実施態様では、組成物は、投与された時に対象のヘマトクリットを増加させる。別の実施態様では、組成物は、貧血の対象に 1 か月以上投与された時に、貧血の対象のヘマトクリットを少なくとも正常レベルまで増加させる。

## 【0020】

本開示は、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体をコードする核酸分子も提供する。1つの実施態様では、核酸配列は配列番号 11 を含む。10

## 【0021】

本開示は、融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体をコードする核酸配列を含む哺乳類細胞も提供する。1つの実施態様では、細胞は CHO 細胞である。

## 【0022】

本開示は、それを必要としている対象の鉄恒常性障害を治療および / または貧血を改善する方法であって、上記組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって鉄恒常性障害を治療および / または貧血を改善する方法も提供する。20

## 【0023】

本開示は、それを必要としている対象の癌を治療する方法であって、上記組成物の治療的有効量を対象に投与し、それによって癌を治療する方法も提供する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0024】

【図 1】図 1 は、配列番号 3 ~ 7 のアミノ酸配列の配列比較を示す。

## 【0025】

【図 2】図 2 は、HJV.Fc 二量体の模式図を示す。

## 【0026】

【図 3】図 3 は、コントロールラットと比較した、20 mg / kg の HJV.Fc を投与された貧血ラットの血清ヘモグロビンレベルを示す線グラフである。

## 【0027】

【図 4】図 4 は、コントロールラットと比較した、2 または 20 mg / kg の HJV.Fc を投与された貧血ラットの血清ヘモグロビンレベルを示す線グラフである。30

## 【0028】

【図 5】図 5 は、コントロールラットと比較した、20 mg / kg の HJV.Fc を投与された貧血ラットのヘマトクリットレベルを示す棒グラフである。

## 【0029】

【図 6】図 6 は、コントロールラットと比較した、20 mg / kg の HJV.Fc を投与された貧血ラットの血清鉄を示す棒グラフである。

## 【0030】

【図 7A】図 7A は、BMP6 に対するピアコア (Biacore) 結合アッセイから得られたデータを用いた HJV.His (ホモ二量体) 親和性を示すグラフである。40

## 【0031】

【図 7B】図 7B は、BMP6 に対するピアコア (Biacore) 結合アッセイから得られたデータを用いた HJV.Fc (ホモ二量体) 親和性を示すグラフである。

## 【0032】

【図 8】図 8 は、細胞ベースの生物学的阻害アッセイにおいて、HJV.Fc が BMP6 活性を阻害するのに効果的であることを示す。

## 【0033】

【図 9】図 9 は、HPLC 分析による、ホモ二量体 HJV.Fc の単量体の > 95 % 純度の調製品を示す。50

**【発明を実施するための形態】****【0034】****詳細な記載**

本発明者は、貧血の治療のための新規治療用組成物を発見した。これらの組成物は、ヘモジュベリン（「HJV」）およびIgG Fc領域を含む融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体である。本開示は、IgG Fc領域と融合したHJVのアミノ酸配列またはその誘導体の少なくとも一部を含むペプチドを含む融合タンパク質を提供する。特定の実施態様では、融合タンパク質のHJV部分は融合タンパク質のN末端部分であり、融合タンパク質のIgG Fc部分はC末端部分である。他の実施態様では、融合タンパク質のHJV部分は融合タンパク質のC末端部分であり、融合タンパク質のIgG Fc部分はN末端部分である。

**【0035】**

特定の実施態様では、融合タンパク質のN末端およびC末端部分はリンカーと結合している。具体的な実施態様では、リンカーは1～50個のアミノ酸長のポリペプチドである。より具体的な実施態様では、リンカーは2～25個のアミノ酸長である。より具体的な実施態様では、リンカーは3～15個のアミノ酸長である。より具体的な実施態様では、リンカーは4、5、6、7、8または9個のアミノ酸長である。1つの好ましい実施態様では、リンカーは5個のアミノ酸長である。特定の実施態様では、リンカーはグリシンおよびプロリン残基に富んでいてよく、例えば、スレオニン／セリンおよびグリシンの単一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TG）を含有してよい。特定の実施態様では、タンパク質の半減期を変化させるために、リンカー（もしあれば）および／またはFcタンパク質内に変異が作成されてよい。

**【0036】**

本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体の投与は、ヘプシジン発現の減少をもたらす。本明細書に記載されている組成物は、鉄代謝障害を治療し、血清ヘモグロビンおよびヘマトクリットを増加させるために用いられてよい。

**【0037】****HJV部分**

本明細書に記載されている融合タンパク質のヒトヘモジュベリン（「HJV」）部分は、鉄の動員を増加させ、および／または鉄代謝疾患と関連する少なくとも1つの症状を治療もしくは改善することができるHJVの可溶性部分を含む。いくつかの実施態様では、本開示の融合タンパク質のHJV部分は、配列番号1の一部と少なくとも75%（例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%）同一である。

**【0038】**

HJVのアミノ酸配列を、下記表1に示す：

10

20

30

## 【表1】

表1. N末端シグナル配列またはC末端GPIドメインのないヒトHJVのアミノ酸配列(364アミノ酸;配列番号1)

10	20	30	40	50	60
QCKILRCNAE	YVSSTLSLRG	GGSSGALRGG	GGGGRGGGVG	SGGLCRALRS	YALCTRRTAR
70	80	90	100	110	120
TCRGDLAFHS	AVHGIEDLMI	QHNCSRQGPT	APPSSPRGPAL	PGAGSGLPAP	DPCDYEGRFS
130	140	150	160	170	180
RLHGRPPGFL	HCASFGDPHV	RSFHHHFHTC	RVQGAWPLLD	NDFLFVQATS	SPMALGANAT
190	200	210	220	230	240
ATRKLTIIIFK	NMQECIDQKV	YQAEVDNLPV	AFEDGSINGG	DRPGGSSLSSI	QTANPGNHVE
250	260	270	280	290	300
IQAAYIGTTI	IIRQTAGQLS	FSIKVAEDVA	MAFSAEQDLQ	LCVGGCPBSQ	RLSRSENRNRR
310	320	330	340	350	360
GAITIDTARR	LCKEGLPVED	AYFHSCVFDV	LISGDPNFTV	AAQAALEDDAR	AFLPDLEKLH
364					
LFPS					

## 【0039】

特定の実施態様では、本明細書に記載されている融合タンパク質のHJV部分は、水溶液に可溶であり、鉄を動員することができ、および/または鉄代謝疾患と関連する少なくとも1つの症状を治療もしくは改善することができる配列番号1のいずれかの断片である。本開示の融合タンパク質のHJV部分を構成する配列番号1の断片は、配列番号1の10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350または360個のアミノ酸の断片を含む。これらの断片は、配列番号1のアミノ酸のいずれかの範囲を含んでよい。いくつかの具体的な実施態様では、断片は配列番号1のアミノ酸1～150の10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350または360個のアミノ酸を含む。特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質のHJV部分は配列番号1の断片と80、85、90、95、97、98、または99%を超える同一性を有し、断片は、配列番号1の10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350または360個のアミノ酸を含む。

## 【0040】

本開示の融合タンパク質のHJV部分を構成する配列番号1の断片は、配列番号1の10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350または360個の連続したアミノ酸の断片を含む。特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質のHJV部分は、配列番号1の断片と80、85、90、95、97、98、または99%を超える同一性を有し、断片は、配列番号1の10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350または360個の連続したアミノ酸を含む。

## 【0041】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質のHJV部分は全長または断片であり、配列番号1と75%を超える同一性を有する。他の実施態様では、本開示の融合タンパク質のHJV部分は全長または断片であり、配列番号1と80、85、90、95、97、98、または99%を超える同一性を有する。特定の具体的な実施態様では、配列番号1

10

20

30

40

50

と本開示の融合タンパク質の H J V 部分の間の相違は、下記のような保存的アミノ酸変化である。

#### 【 0 0 4 2 】

##### I g G F c 部分

本開示の融合タンパク質の I g G F c 部分は、本開示の融合タンパク質の H J V 部分と融合した時に、鉄を動員することができ、および / または鉄代謝疾患と関連する少なくとも 1 つの症状を治療もしくは改善することができる、免疫グロブリンの F c 領域またはその誘導体の少なくとも一部を含む。本開示の融合タンパク質の I g G F c 部分は、対象に投与された時に、融合タンパク質を安定化した。具体的な実施態様では、I g G F c 、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体の結合は、血清タンパク質の血清半減期を 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 15 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、 24 、 36 、 48 、 60 、 72 、 84 、または 96 時間超にする。本開示の融合タンパク質に適合するいくつかの配列がある。

10

#### 【 0 0 4 3 】

特定の実施態様では、I g G F c ドメインは、C H 2 および C H 3 ドメイン、ならびにヒンジ領域を含む。他の実施態様では、I g G F c は、C H 1 領域の少なくとも一部も含有する。具体的な実施態様では、融合タンパク質の H J V 部分はヒンジ領域と直接結合している。他の実施態様では、F c ドメインは、融合タンパク質の H J V 部分と結合したその C H 1 ドメインからヒンジ領域への配列 N 末端を含有する。他の実施態様では、リンカーはヒンジ領域、または F c ドメイン上の C H 1 ドメインに結合している。より具体的な実施態様では、ヒンジ領域は、コンセンサス配列 X<sub>1</sub> - P - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> ( 配列番号 2 ) を有する 4 個のアミノ酸を含み、ここで X<sub>1</sub> はシスティンまたはセリンであり、X<sub>2</sub> はロイシンまたはプロリンであり、X<sub>3</sub> はシスティンまたはセリンである。完全な免疫グロブリンのヒンジ領域は、効果的な抗原 - 抗体結合に十分な柔軟性をタンパク質に提供する。本開示の特定の実施態様では、ヒンジ領域は、特に融合タンパク質が二量体型である時に、その柔軟性を維持するために、本開示の融合タンパク質の I g G F c 部分に含まれる。

20

#### 【 0 0 4 4 】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の I g G F c 部分は、配列番号 3 の一部と少なくとも 75 % ( 例えは、少なくとも 80 % 、少なくとも 85 % 、少なくとも 90 % 、少なくとも 95 % 、少なくとも 96 % 、少なくとも 97 % 、少なくとも 98 % 、または少なくとも 99 % ) 同一である。

30

#### 【 表 2 】

表 2 . I g G F c 領域誘導体のアミノ酸配列 ( 232 アミノ酸 ; 配列番号 3 )						
10	20	30	40	50	60	
DPKSCDKPHT	CPLCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	
70	80	90	100	110	120	
NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	
130	140	150	160	170	180	
ISKAKGQPREG	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKATP	
190	200	210	220	230	232	
PVLSDSDGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK	

40

#### 【 0 0 4 5 】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の I g G F c 部分は、本開示の融合タンパク質の H J V 部分と融合した時に、水溶液に可溶であり、鉄を動員することができ、および / または鉄代謝疾患と関連する少なくとも 1 つの症状を治療もしくは改善することができる、配列番号 3 のいずれかの断片である。本開示の融合タンパク質の I g G F c 部分を構成する配列番号 3 の断片は、配列番号 3 の 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 110 、 120 、 130 、 140 、 150 、 160 、 170 、 180 、 190 、 200 、 210 、 220 または 230 個のアミノ酸の断片を含む。

50

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分は、配列番号 13 の断片と 80、85、90、95、97、98、または 99 % を超える同一性を有し、断片は、配列番号 1 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、または 230 個のアミノ酸を含む。

#### 【0046】

本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分を構成する配列番号 3 の断片は、配列番号 3 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220 または 230 個の連続したアミノ酸の断片を含む。特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分は、配列番号 3 の断片と 80、85、90、95、97、98、または 99 % を超える同一性を有し、断片は、配列番号 1 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、または 230 個の連続したアミノ酸を含む。10

#### 【0047】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分は全長または断片であり、配列番号 3 と 75 % を超える同一性を有する。他の実施態様では、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分は全長または断片であり、配列番号 3 と 80、85、90、95、97、98、または 99 % を超える同一性を有する。特定の具体的な実施態様では、配列番号 3 と本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分の間の相違は、下記のような保存的アミノ酸変化である。20

#### 【0048】

その誘導体の他の配列または断片は、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分としての使用に適合するものである。IgG Fc 誘導体（配列番号 3）、ヒト IgG1 Fc（配列番号 4）、リジェネロン社によって開発された VEGFR - Fc 融合に由来する Fc 領域（配列番号 5）、ブリストル・マイヤーズ・スクイプ社によって開発された CTLA4 - Fc 融合（ORENCIA（商標）またはアバタセプト）に由来する Fc 領域（配列番号 6）、リジェネロン社によって開発された IL1R - Fc 融合（ARCALYST（商標）またはリロナセプト）に由来する Fc 領域（配列番号 7）および HUMIRA（登録商標）（アダリムマブ）に由来する Fc 領域の配列比較。30

#### 【0049】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分は、本開示の融合タンパク質の HJV 部分と融合した時に、水溶液に可溶であり、鉄を動員することができ、および / または鉄代謝疾患と関連する少なくとも 1 つの症状を治療もしくは改善することができる、配列番号 4、5、6 または 7 のいずれかの断片である。本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分を構成する配列番号 4、5、6 または 7 の断片は、配列番号 4、5、6 または 7 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220 または 230 個のアミノ酸の断片を含む。特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分は、配列番号 3 の断片と 80、85、90、95、97、98、または 99 % を超える同一性を有し、断片は、配列番号 4、5、6 または 7 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、または 230 個のアミノ酸を含む。40

#### 【0050】

本開示の融合タンパク質の IgG Fc 部分を構成する配列番号 4、5、6 または 7 の断片は、配列番号 4、5、6 または 7 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220 または 230 個の連続したアミノ酸の断片を含む。特50

定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の Ig G Fc 部分は、配列番号 3 の断片と 80、85、90、95、97、98、または 99 %を超える同一性を有し、断片は、配列番号 4、5、6 または 7 の 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、または 230 個の連続したアミノ酸を含む。

#### 【0051】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質の Ig G Fc 部分は全長または断片であり、配列番号 4、5、6 または 7 と 75 %を超える同一性を有する。他の実施態様では、本開示の融合タンパク質の Ig G Fc 部分は全長または断片であり、配列番号 4、5、6 または 7 と 80、85、90、95、97、98、または 99 %を超える同一性を有する。10 特定の具体的な実施態様では、配列番号 4、5、6 または 7 と本開示の融合タンパク質の Ig G Fc 部分の間の相違は、下記のような保存的アミノ酸変化である。

#### 【0052】

##### リンカー

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質は、融合タンパク質の HJV 部分と Ig G Fc 部分を結合するリンカーを含む。好ましい実施態様では、リンカーはペプチドである。別の実施態様では、ペプチドは 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 および 50 個のアミノ酸長であってよい。特定の実施態様では、リンカーを構成するアミノ酸は、各位置でグリシンまたはセリンである。1 つの好ましい実施態様では、リンカーは配列 GGGGG ( 配列番号 8 ) を有する。20

#### 【0053】

特定の実施態様では、リンカーはグリシンおよびプロリン残基に富んでいてよく、例えば、スレオニン / セリンおよびグリシンの単一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 TG ) を含有してよい。

#### 【0054】

特定の実施態様では、タンパク質の半減期を変化させるために、リンカー ( もしあれば ) および / または Fc タンパク質内に変異が作成されてよい。30

#### 【0055】

##### 二量体化

特定の実施態様では、融合タンパク質は 2 つの同一のポリペプチドサブユニットを含む二量体の形態である。図 2 に模式的に示している実施態様では、各ポリペプチドサブユニットは、N 末端から C 末端まで、以下に示す配列番号 9 のポリペプチド配列を含む。

【表3】

表3. 本開示の HJV.Fc 融合タンパク質のアミノ酸配列 (594 アミノ酸 ; 配列番号 9 )					
10	20	30	40	50	60
QCKILRCNAE	YVSSTLRLRG	GGSSGALRGG	GGGGRRGGVG	SGGLCRALRS	YALCTRRTAR
70	80	90	100	110	120
TCRGDLAFHS	AVHGIEDLMI	QHNCSRQGPT	APPPPRGPAL	PGAGSGLPAP	DPCDYEGRFS
130	140	150	160	170	180
RLHGRPPGFL	HCASFGDPHV	RSFHHHFHTC	RVQGAWPLLD	NDFLFVQATS	SPMALGANAT
190	200	210	220	230	240
ATRKLTIIIFK	NMQECIDQKV	YQAEVDNLPV	AFEDGSINGG	DRPGGSSLSI	QTANPGNHVE
250	260	270	280	290	300
IQAAYIGTTI	IIRQTAGQLS	FSIKVAEDVA	MAFSAEQDLQ	LCVGGCPPSQ	RLSRSENR
310	320	330	340	350	360
GAITIDTARR	LCKEGLPVED	AYFHSCVFDV	LISGDPNFTV	AAQAALEDAR	AFLPDLEKLH
370	380	390	400	410	420
LFPSDPKSCD	KPHTCPLCPA	PELLGGPSVF	LFPPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDE
430	440	450	460	470	480
VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPIE
490	500	510	520	530	540
KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKA
550	560	570	580	590	594
TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK

## 【0056】

2つのポリペプチドサブユニットはそれぞれのヒンジ領域の間のジスルフィド結合によって互いに結合し、二量体構造を形成する。ホモ二量体は、Fc ヒンジ領域内で形成される。より具体的には、ホモ二量体は、配列番号 9 内のシステイン 373、380 および / または 383 の間の化学的相互作用を通じて形成される。

## 【0057】

配列番号 9 のアミノ酸配列を有するタンパク質を発現するために用いられるベクターの核酸配列を以下に示す。

【表4】

表4. 配列番号9をコードするベクターの核酸配列（配列番号11）						
ttcttagagaa	tccagacatg	ataagataca	ttgtatgagtt	tggacaaacc	acaactagaa	60
tgcagtgaaa	aaaatgctt	atttgtgaaa	tttgtgatgc	tattgctta	tttgtaacca	120
ttataagctg	caataaacaa	gttaacaaca	acaattgcat	tcattttatg	tttcagggttc	180
agggggaggt	gtgggaggtt	ttttaaagca	agtaaaaacct	ctacaaaatgt	ggtatggctg	240
attatgatca	atcgatgtcg	accaattcgt	aatcatgtca	tagctgttcc	ctgtgtgaaa	300
ttgttatccg	ctcacaaattc	cacacaacat	acgagccgga	agcataaaagt	gtaaaggcctg	360
gggtgcctaa	tgagtgagct	aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	420
gtcgggaaac	ctgtcggtcc	agctgcattt	atgaatcgcc	caacgcgcgg	ggagagggcgg	480
tttgcgtatt	gggcgtctt	ccgcttcctc	gctcaactgac	tgcgtcgct	cggtcggttcg	540
gctgcccggaa	gccccatcg	ctcactcaaa	ggcggtataa	cggttatcca	cagaatcagg	600
ggataaacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaaa	660
ggccgcgttg	ctggcggttt	tccatagct	ccggcccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	720
acgctcaagt	cagaggtggc	gaaaccccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	780
tggaaagctcc	ctcgtcgct	ctcctgttcc	gaccctgccc	cttaccggat	acctgtccgc	840
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgcttcc	tcatacgctca	cgctgttaggt	atctcagttc	900
ggtgttaggtc	gttcgctcca	agctgggtc	tgacgcacgaa	ccccccgttc	agcccgaccg	960
ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	gtccaaaccccg	gtaagacacg	acttattcgcc	1020
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	1080
gttcttgaag	ttgtggccta	actacggcta	cactagaaga	acagtattttg	gtatctgcgc	1140
tctgctgaag	ccagttaccc	tcggaaaaaa	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaaacaaaac	1200
caccgcttgt	agcgggttgtt	tttttgtttt	caagcagcag	attacgcgc	aaaaaaaagg	1260
atctcaagaa	gatcccttga	tcttttctac	ggggctctgac	gctcaatggaa	acgaaaactc	1320
acgtaaaggaa	attttgtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	1380
ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	tatatatgaa	taaacttggt	ctgacagttt	1440
ccaatgttta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	1500
tgcctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	1560
tgctgcaatg	ataccgcgag	acccacgctc	accggctcca	gattttatcag	caataaaacca	1620
gccagccgga	agggcccggc	gcagaagttt	tccgtcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	1680
tattaattgt	tgccggaaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	1740
tgttgccatt	gctacaggca	tcgtgggttc	acgctcgctc	tttggatatgg	cttcatttcag	1800
ctccgggtcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgttgcga	aaaaagcggt	1860
tagtccttc	ggtcctccga	tcgttgcgt	aaqtaagttt	gccgcagtgt	tatcactcat	1920
ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgtcatgcca	tccgttaagat	gtttttctgt	1980
gactgggtgag	tactcaacca	agtcaatttc	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgttc	2040
ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaactttaa	aagtgcctat	2100
cattggaaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaaact	ctcaaggatc	ttaccgtct	tgagatccag	2160
ttcgatgtaa	cccactcgcg	cacccaaactt	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcg	2220
ttctgggtga	gcaaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	2280
gaaatgttga	atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	2340
ttgtctcatg	agcggatata	tatttgaatg	tatttagaaa	aataaaacaaa	taggggttcc	2400
gogcacattt	ccccggaaaa	tgccacatgt	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	2460
aacctataaa	aataggcgta	tcacggggcc	cttgcgtctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	2520
tgaaaacctc	tgacacatgc	agctccccga	gacgggtcaca	gcttgcgtgt	aagcggatgc	2580
cgggagcaga	caagccgcgtc	aggggcggtc	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggctggct	2640
taactatgcg	gcatcagagc	agattgtact	gagagcgac	catatcggt	gtgaaatacc	2700
gcacagatgc	gtaaggagaa	aataccgcat	caggcgccat	tgcgcattca	ggctgcgc	2760
ctgttgggaa	ggggcgtatcg	tgcgggcctc	ttcgtcttta	cgccagctgg	cgaaaggggg	2820
atgtgctgca	aggcgattaa	gttgggttac	gccagggttt	tcccagtca	gacgtttaa	2880
aacgacggcc	agtgcacaa	tagccgcgc	cacggatctt	gctagagttac	gaattcgagc	2940
tcgaaacccc	tatacattga	atcaatattt	gcaattttttt	atatttttca	ttggtttat	3000
agcataaattc	aatattttgt	atggccatt	gcatacgttt	tatctatata	ataatatgtt	3060
catttatatt	ggctcatgtc	caatatgacc	gccatgttga	cattgattat	tgacttagtt	3120
ttaatagtaa	tcaattacgg	ggtcattatgt	tcatagccca	tatattggat	tccgcgttac	3180
ataacttacg	gtaaatggcc	ccgcctggct	accgcggcc	gaccccccgc	cattgacgtc	3240
aataatgacg	tatgtttcc	tagtaacggc	aatagggttt	ttccattgc	gtcaatgggt	3300
ggagtttattt	cggttaactt	cccaacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaaatgc	3360
cccccttattt	gacgtcaatg	acggtaatgt	gcccgccctgg	cattatgc	agtacatgac	3420
cttacgggac	tttccttactt	ggcagttatcat	ctacgttata	gtcatcgct	ttaccatgg	3480
gatgcgggtt	tggcagttaca	ccaaatggcg	tggatagcg	tttgacttac	ggggatttcc	3540
aagtctccac	cccatgtacg	tcaatgggg	tttttttttttgg	caccaaaaatc	aacgggactt	3600
tccaaaaatgt	cgttaataacc	ccggccccgtt	gacgcaatgt	ggcggttaggc	gtgtacgggt	3660
ggaggtcttat	ataaggcagag	ctcggtttttt	gaaccgtca	atcggggatc	cgatatccac	3720
catggggggag	ccagggcgtt	ccccttagtcc	cagggttcc	catggcagtc	ccccaaactt	3780
aagcaactctc	acttccttc	tgcttccttc	tggacatgtc	catttcata	gcaagatct	3840

10

20

30

40

50

ccgctgcaat	gctgagtagcgtatcgccac	tctgagccctt	agagggtgggg	gttcatcagg	3900
agcacttcga	ggaggaggag	gaggaggccg	gggtggaggg	gtgggctctg	3960
tcgagccctc	cgcctctatg	cgctctgcac	tcggcgcacc	gccgcacact	4020
cctcgccctc	cattcgccgg	tacatggcat	cgaagacact	acaactgctc	4080
ccgcccaggc	cctacagccc	ctccccccgc	ccggggccccc	gccctccag	4140
cggcctccct	gccccggacc	cttgtgacta	tgaaggccgg	ttttcccgcc	4200
tcccccgccc	tttttgccatt	gogttccctt	cggggacccc	catgtgcgca	4260
tcactttcac	acatggccgt	tccaaggagc	ttggcctcta	ctggataatg	4320
tgtccaagcc	accagctccc	ccatggcggt	gggggccaac	gctaccgcca	4380
caccatcata	tttaagaaca	tgcaaggaatg	cattgatcag	aagggtgtatc	4440
ggataatctt	cctgttagcct	ttgaagatgg	tttatcaat	ggaggtgacc	4500
atccagtttgc	tcgattcaaa	ctgctaacc	tggaaaccat	gtggagatcc	4560
cattggcaca	actataatca	ttcggcagac	agctgggcag	ctctccttct	4620
agcagaggat	gtggccatgg	ccttctcage	tgaacaggac	ctgcagctct	4680
gtgccctcca	agtcaagcgac	tctctcgatc	agagcgcaat	cgtcggggag	4740
tgatactgcc	agacggctgt	gcaaggaagg	gcttccagtg	gaagatgctt	4800
ctgtgtcttt	gatgtttaa	tttctgttga	tcccaacttt	accgtggcag	4860
actggaggat	gccccggcc	teetggccaga	cttagagaaag	ctgcatctct	4920
tgggtgttgt	ggtgatccca	aatcttgtga	caaaccatcac	acatgcccac	4980
acctgaactc	ctggggggac	cgtcaagtctt	cctcttcccc	ccaaaaccca	5040
catgatctcc	cggacccctg	aggtaacatg	cgtgggttgt	gacgtgagcc	5100
tgaggtcaag	ttcaacttgt	acgtggacgg	cgtggaggtg	cataatgcca	5160
gccccggagg	cagtacaaca	gcacgttacc	tgtggtcagc	gtcctcacc	5220
ggactggctg	aatggcaagg	agtacaagt	caaggtctcc	aacaaagccc	5280
catcgagaaa	accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	5340
gccccccatcc	cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgccc	5400
cttctatccc	agcgacatcg	cctggagtg	ggagagcaat	ggcagccgg	5460
caaggccacg	cctccctgtc	tggactccga	cggctccctc	ttcctctaca	5520
cgtggacaag	agcaggtggc	agcagggaa	cgtcttctca	tgctccgtga	5580
tctgcacaac	cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	ccggtaaat	5638

## 【0058】

配列番号11の核酸14～250は、SV40ポリアデノシンを形成している。核酸643～1297は、複製起点を形成している。核酸1438～2413は、-ラクタマーゼをコードしている。核酸2932～3706は、CMVプロモーターを形成している。核酸3722～3826は、HJVリーダーをコードしている。核酸3827～4918は、ヒトHJVをコードしている。核酸4919～4933は、グリシンスペーサーをコードしている。核酸4934～5629は、IgG Fcをコードしている。配列番号11は、図に模式的に示している。

## 【0059】

特定の実施態様では、本開示の融合タンパク質は二量体を形成していかなければならない。特定の実施態様では、融合タンパク質は二量体を形成しているが、四量体、六量体、または八量体などの高次の集合体は形成していない。これらの高次の会合は、融合タンパク質の溶解性およびその治療有効性に影響しうる。

## 【0060】

## 定義

特に定義しない限り、本開示に関連して用いられている科学的および技術的用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈によって特に要求されない限り、单数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は单数形を含むものとする。一般的に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチド化学ならびにハイブリダイゼーションに関連して利用されている命名法、およびそれらの技術は、当該技術分野で周知かつ一般的に用いられているものである。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養ならびに形質転換に標準的技術が用いられている（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）。酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従って、または当該技術分野で一般的に達成されるように、または本明細書に記載されているよう行われる。本明細書に記載されている組成物および方法の実施は、明確に反対の記載がない限り、当該分野の技術の範囲内にあるウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および

10

20

30

40

50

組換えDNA技術の慣用の方法を利用するものであり、その多くは説明目的で以下に記載されている。そのような技術は、文献にて十分に説明されている。例えば、Sambrook, et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning : A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)を参照のこと。

## 【0061】

10

本明細書に記載されている分析化学、有機合成化学、ならびに医薬品化学および薬化学に関連して利用されている命名法、ならびにその検査法および技術は、当該技術分野で周知かつ一般的に用いられているものである。化学合成、化学分析、医薬品、製剤、および送達、ならびに患者の治療に、標準的技術が用いられる。

## 【0062】

以下の定義は、本開示を理解するために有用である：

## 【0063】

感染を治療する目的となる「哺乳類」はいずれかの哺乳類、例えばヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園の動物、スポーツ動物、または愛玩動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを指す。好ましくは、哺乳類はヒトである。

20

## 【0064】

「治療すること」、「治療」または「緩和」は、治療的処置および予防的 (prophylactic) または予防的 (preventative) 手段の両方を指し、その目的は標的となる病的状態または障害を予防または遅延 (減少) させることである。治療を必要としている対象は、既に障害を有している対象、および障害になりやすい対象、または障害が予防される対象を含む。抗体の治療量を本開示の方法に従って摂取した後、患者が以下の1つ以上における観察可能および / または測定可能な減少または非存在を示した場合に、対象または哺乳類は成功裏に感染が「治療された」ことになる：感染細胞の数の減少もしくは感染細胞の非存在；感染した総細胞のパーセントの減少；および / または特定の感染と関連する症状の1つ以上のある程度の軽減；罹患率および死亡率の減少、ならびに生活の質の問題の改善。疾患の成功裏の治療および改善を評価するための上記パラメーターは、医師によく知られた所定の手順によって容易に測定可能である。

30

## 【0065】

用語「治療的有効量」は、対象または哺乳類の疾患または障害を「治療する」のに効果的な組成物の量を指す。前述の「治療すること」の定義を参照のこと。

## 【0066】

「慢性」投与は、長期間にわたって初期の治療効果（活性）を維持するための、急性様式とは対照的な継続的様式による薬剤の投与を指す。「間欠」投与は、中断することなく継続的になされのではなく、むしろ本質的に周期的な治療である。

40

## 【0067】

本明細書で用いられている「担体」は、利用される投与量および濃度でそれにさらされた細胞または哺乳類に無毒である医薬的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含む。しばしば、生理的に許容される担体はpH緩衝水溶液である。生理的に許容される担体の例は、緩衝液、例えばリン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および他の有機酸緩衝液；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジン；单糖、二糖、および他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、もしくはデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えばマンニトールもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；ならびに / または非イオ

50

ン性界面活性剤、例えばT W E E N（商標）ポリエチレングリコール（P E G）、およびP L U R O N I C S（商標）を含む。

【0068】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は本明細書で互換的に用いられており、一本鎖もしくは二本鎖R N A、D N A、P N A、または混合ポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現し、または発現するように適応されていてよいゲノム配列、ゲノム外およびプラスミド配列、ならびにより小型の操作された遺伝子断片を含んでよい。

【0069】

「単離された核酸」は、他のゲノムD N A配列およびタンパク質または複合体、例えばリボソームおよびポリメラーゼから実質的に分離した核酸であり、必然的に天然配列を伴う。該用語は、その自然に存在する環境から除去された核酸配列を包含し、組換えまたはクローン化D N A単離物、および化学的に合成された類似体または異種系によって生物学的に合成された類似体を含む。実質的に純粋な核酸は、核酸の単離された形態を含む。当然ながら、これは最初に単離された核酸を指し、後にヒトの手によって単離された核酸に加えられた遺伝子または配列を除外しない。

10

【0070】

用語「ポリペプチド」はその慣用の意味で、すなわち、アミノ酸の配列として用いられる。ポリペプチドは産物の特定の長さに限定されるものではない。ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質はポリペプチドの定義内に含まれ、別段の記載がない限り、該用語は本明細書で互換的に用いられてよい。また、この用語は、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに天然および非天然の両方の当該技術分野で周知の他の修飾を指さず、または除外する(does not refer to or exclude)。ポリペプチドはタンパク質全体、またはそのサブ配列であってよい。この開示の文脈において興味のある特定のポリペプチドは、C D R sを含み、抗原またはインフルエンザA感染細胞に結合することができるアミノ酸サブ配列である。

20

【0071】

「単離されたポリペプチド」は、同定され、その自然環境の成分から分離および／または回収されたものである。好ましい実施態様では、単離されたポリペプチドは、(1)ポリペプチドローリー法によって決定した場合に95重量%を超えるまで、最も好ましくは99重量%を超えるまで精製され、(2)スピニングカップシーケネーター(spinning cup sequenator)の使用によってN末端もしくは内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで精製され、または(3)クマシープルー、もしくは好ましくは銀染色を用いる還元もしくは非還元条件下のS D S - P A G Eによって均一になるまで精製されるであろう。単離されたポリペプチドは、ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在していないであろうから、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドを含む。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製工程によって製造されるであろう。

30

【0072】

「天然配列」ポリヌクレオチドは、天然に由来するポリヌクレオチドと同一のヌクレオチド配列を有するものである。「天然配列」ポリペプチドは、天然(例えば、いずれかの種に由来する)に由来するポリペプチド(例えば、抗体)と同一のアミノ酸配列を有するものである。そのような天然配列ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、天然から単離することができ、または組換えもしくは合成手段によって產生することができる。

40

【0073】

本明細書で用いられている用語ポリヌクレオチド「変異体」は、1つ以上の置換、欠失、付加および／または挿入において、本明細書で具体的に開示されているポリヌクレオチドと典型的に異なっているポリヌクレオチドである。そのような変異体は自然に存在しているものでよく、または合成によって產生されてよく、例えば本開示のポリヌクレオチド配列の1つ以上を修飾すること、本明細書に記載されているコードされたポリペプチドの1つ以上の生物学的活性を評価すること、および／または当該技術分野で周知の多数の技

50

術のいずれかを用いることによって產生されてよい。

【0074】

本明細書で用いられている用語ポリペプチド「変異体」は、1つ以上の置換、欠失、付加および／または挿入において、本明細書で具体的に開示されているポリペプチドと典型的に異なるポリペプチドである。そのような変異体は自然に存在しているものでよく、または合成によって產生されてよく、例えば本開示の上記ポリペプチド配列の1つ以上を修飾すること、本明細書に記載されているポリペプチドの1つ以上の生物学的活性を評価すること、および／または当該技術分野で周知の多数の技術のいずれかを用いることによって產生されてよい。

【0075】

本開示のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造中に修飾がなされてよく、望ましい特性を有する変異体または誘導体ポリペプチドをコードする機能分子をさらに得る。同等の、またはさらに改善された本開示のポリペプチドの変異体または部分を作成するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変えることが望ましい場合、当業者はコードしているDNA配列のコドンの1つ以上を典型的に変化させるであろう。

10

【0076】

例えば、特定のアミノ酸は、他のポリペプチド（例えば、抗原）または細胞に結合するその能力の認識可能な喪失なくタンパク質構造内で他のアミノ酸に置換されてよい。そのタンパク質の生物学的機能活性を定義するのはタンパク質の結合能力および性質であるため、特定のアミノ酸配列置換がタンパク質配列、および当然ながら、その基礎となるDNAコード配列内になされてよく、それでもなお同様の性質を有するタンパク質が得られる。それゆえ、様々な変化が、開示されている組成物のペプチド配列、または該ペプチドをコードする対応するDNA配列内に、それらの生物学的有用性または活性の認識可能な喪失なくなされてよいことが意図されている。

20

【0077】

多くの場合において、ポリペプチド変異体は1つ以上の保存的置換を含有するであろう。「保存的置換」は、ペプチド化学の当業者がポリペプチドの二次構造およびヒドロパシー特性が実質的に変化しないと予想するような、アミノ酸が類似の性質を有する別のアミノ酸に置換されている置換である。

30

【0078】

特定のアミノ酸は類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸に置換されてよく、なおも類似の生物学的活性を有するタンパク質をもたらす、すなわち、なおも生物学的機能上同等のタンパク質が得られることは、当該技術分野で周知である。そのような変化を作成する際、そのヒドロパシー指数が±2の範囲内であるアミノ酸の置換が好みしく、±1の範囲内であるものが特に好みしく、±0.5の範囲内であるものがさらに好みしい。類似のアミノ酸の置換は親水性に基づいて効果的になすことができることも、当該技術分野で理解されるであろう。米国特許第4,554,101号は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性が、タンパク質の生物学的性質と相關すると述べている。

40

【0079】

それゆえ、上記で概要を述べたように、アミノ酸置換は一般的に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、および大きさなどに基づいている。前述の特性の1つ以上を考慮した例となる置換は当業者に周知であり、例えば以下を含む：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン。

【0080】

アミノ酸置換は、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性における類似性に基づいてさらになされてよい。例えば、負の電荷を持つアミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含み；正の電荷を持つアミノ酸は、リジンおよびアル

50

ギニンを含み；類似の親水性値を有する電荷を持たない極性頭部基を有するアミノ酸は、ロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、スレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンを含む。保存的変化を表しうるアミノ酸の他の群は、以下を含む：(1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; および(5) phe, tyr, trp, his。変異体は、非保存的変化をさらにまたは代替的に含有してよい。好ましい実施態様では、変異体ポリペプチドは、5個以下のアミノ酸の置換、欠失または付加において、天然配列と異なっている。変異体は、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造およびヒドロバシー特性に最小限の影響のみを有するアミノ酸の欠失または付加によってさらに（または代替的に）修飾されてよい。

10

## 【0081】

ポリペプチドは、タンパク質のN末端に、翻訳と同時に、または翻訳後にタンパク質の移動を指示するシグナル（またはリーダー）配列を含んでよい。ポリペプチドは、ポリペプチドの合成、精製または同定の簡便性のために（例えば、ポリHis）、または固体支持体へのポリペプチドの結合を増強するために、リンカーもしくは他の配列と結合してもよい。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域と結合していてよい。

## 【0082】

比較のための最適な配列比較は、バイオインフォマティクスソフトウェアのLaser gene suite中のMegaalignプログラム(DNA STARインコーポレーテッド、マディソン、ウィスコンシン州)を用い、デフォルトのパラメーターを用いて行われてよい。このプログラムは、以下の参考文献に記載されているいくつかの配列比較スキームを統合したものである：Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) *Com. Theor* 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:726-730.

20

## 【0083】

あるいは、比較のための最適な配列比較は、Smith and Waterman (1981) *Add. APL. Math* 2:482の局所的同一性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443の同一性配列比較アルゴリズムによって、Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444の類似法のための検索によって、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行（ウィスコンシン・ジェネティクス・ソフトウェア・パッケージ（ジェネティクス・コンピューター・グループ(GCG)、575サイエンスドライブ、マディソン、ウィスコンシン州）中のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA）によって、または検査（inspection）によって行われてよい。

30

## 【0084】

配列同一性パーセントおよび配列類似性を決定するために適切なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、それぞれAltschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402およびAltschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST2.0は、例えば本明細書に記載されているパラメーターで、本開示のポリヌクレオチドおよびポリペプチドについての配列同一性パーセントを決定するために用いられてよい。BLAST分析を

40

50

実行するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センターを通じて公的に入手可能である。

#### 【0085】

「相同性」は、最大相同性パーセントを達成するために、配列を並べ、必要であればギャップを導入した後の、非変異体配列と同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列変異体内の残基のパーセンテージを指す。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド変異体は、本明細書に記載されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のポリヌクレオチドまたはポリペプチド相同性を有する。

10

#### 【0086】

「ベクター」は、シャトルおよび発現ベクターを含む。典型的には、プラスミドコンストラクトは、細菌内のプラスミドの複製および選択のために、それぞれ、複製起点（例えば、C<sub>o</sub>1E1複製起点）および選択可能なマーカー（例えば、アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性）も含む。「発現ベクター」は、細菌細胞または真核細胞内に、本開示の抗体断片を含む抗体の発現のために必要なコントロール配列または制御要素を含有するベクターを指す。適切なベクターは、以下に開示されている。

#### 【0087】

用語「変異体」は、タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列と比較して1つ以上のアミノ酸置換、欠失、および／または挿入が存在しているタンパク質またはポリペプチドを指し、タンパク質またはペプチドの自然に存在する対立遺伝子変異体または選択的スライス変異体を含む。用語「変異体」は、類似もしくは相同的アミノ酸または異なるアミノ酸を有するペプチド配列内の1つ以上のアミノ酸の置換を含む。好み変異体は、アミノ酸位置の1つ以上でのアラニン置換を含む。他の好み変異体は、タンパク質の全体の正味の電荷、極性、または疎水性にほとんど、または全く影響しない保存的置換を含む。保存的置換は上記で説明されている。

20

#### 【0088】

他の変異体は、(a) 例えばシート状もしくはらせん状立体構造としての、置換領域のポリペプチド主鎖の構造、(b) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の容積(bulk)、の維持に対するそれらの影響においてより有意に異なっている残基を選択するなど、より保存的でないアミノ酸置換からなってよい。機能に対してより有意な影響を与えると一般に予想される置換は、(a) グリシンおよび／またはプロリンが別のアミノ酸によって置換され、もしくは欠失もしくは挿入された置換；(b) 親水性の残基、例えばセリルもしくはスレオニルが疎水性の残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、もしくはアラニルの代わりとなり（もしくはそれによって置換される）置換；(c) システイン残基が他のいずれかの残基の代わりとなり（もしくはそれによって置換される）置換；(d) 陽性側鎖を有する残基、例えば、リジル、アルギニル、もしくはヒスチジルが陰性電荷を有する残基、例えばグルタミルもしくはアスパルチルの代わりとなり（もしくはそれによって置換される）置換；または、(e) かさ高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンが、そのような側鎖を有さない残基、例えばグリシンの代わりとなり（もしくはそれによって置換される）置換である。他の変異体は、新規グリコシリ化および／もしくはリン酸化部位を生じるように設計されたもの、または既存のグリコシリ化および／もしくはリン酸化部位を除去するように設計されたものを含む。変異体は、グリコシリ化部位、タンパク質切断部位および／またはシステイン残基での少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。変異体は、リンカーペプチド上のタンパク質またはペプチドアミノ酸配列の前または後に付加的アミノ酸残基を有するタンパク質およびペプチドも含む。用語「変異体」は、アミノ酸配列の3'もしくは5'末端のいずれかの隣接領域またはその両方に、少なくとも1個で、最大25個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、または20個）の付加的アミノ酸を有する本開示のタンパク質／ペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含する。

30

40

50

## 【0089】

用語「変異体」は、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置における類似性を比較するために一般的に用いられる標準的な方法によって決定した場合に、そのアミノ酸配列において、本開示のタンパク質の少なくとも60～99パーセント同一（例えば、60、65、70、75、80、85、90、95、98、99、または100%（包含的））のタンパク質も指す。2つのタンパク質の間の類似性または同一性の程度は、既知の方法によって容易に計算することができる。同一性を決定するための好ましい方法は、調べている配列の間に最大限の一致を与えるように設計されている。同一性および類似性を決定する方法は、公的に入手可能なコンピュータープログラムに体系化されている。変異体は、場合によっては、比較タンパク質またはペプチドと比較して、典型的には1つ以上（例えば、2、3、4、5個など）のアミノ酸置換、欠失、および／または挿入を有するであろう。

10

## 【0090】

本開示に開示されている融合タンパク質の「成熟」型は、自然に存在するポリペプチド、前駆体型またはプロタンパク質の産物である。自然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質は、非限定的例として、対応する遺伝子によってコードされた全長遺伝子産物を含む。あるいは、それは本明細書に記載されているオープンリーディングフレームによってコードされたポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として定義されてよい。「成熟」型産物は、非限定的例として、遺伝子産物が生じる細胞（例えば、宿主細胞）内で起こりうる1つ以上の自然に存在するプロセシング工程の結果として生じる。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」型をもたらすそのようなプロセシング工程の例は、ORFの開始コドンによってコードされたN末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドもしくはリーダー配列のタンパク質切断を含む。さらに、本明細書で用いられているように、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」型は、タンパク質切断現象以外の翻訳後修飾の工程から生じうる。そのような付加的プロセスは、非限定的例として、グリコシリ化、ミリストイル化またはリン酸化を含む。一般に、成熟ポリペプチドまたはタンパク質は、これらのプロセスのただ1つの作動、またはそれらのいずれかの組み合わせに起因しうる。

20

## 【0091】

用語「誘導体」は、自然プロセス、例えばプロセシングおよび他の翻訳後修飾のみならず、化学修飾技術、例えば分子(molecule)または分子(molecules)が野生型タンパク質に自然に結合しない1つ以上のポリエチレングリコール分子、糖、リン酸塩、および／または他のそのような分子の付加によって化学修飾された、化学修飾されたタンパク質またはポリペプチドを指す。誘導体は、塩を含む。そのような化学修飾は、基礎的な教科書およびより詳細な研究書、ならびに膨大な研究文献に十分記載されており、それらは当業者に周知である。同じタイプの修飾が、特定のタンパク質またはポリペプチドにおけるいくつかの部位で、同一または異なる程度にて存在してよいと理解されるであろう。また、特定のタンパク質またはポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含有してよい。修飾はタンパク質またはポリペプチド内のいずれの箇所においても生じ得、例えばペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル末端において生じうる。修飾は、例えば、アセチル化、アシリル化、ADP-リボシリ化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、-カルボキシル化、グリコシリ化、GPIアンカー形成、ヒドロキシリ化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、グリコシリ化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基の-カルボキシル化、ヒドロキシリ化およびADP-リボシリ化、セレノイル化(selenoylation)、硫酸化、タンパク質への転移RNA媒介性アミノ酸付加、例えばアルギニル化、ならびにユビキチン化を含む。

30

## 【0092】

40

50

用語「誘導体」は、タンパク質またはポリペプチドを分枝状、または分枝のある、もしくは分枝のない環状にする化学修飾を含む。環状の、分枝状の、および分枝状で環状のタンパク質またはポリペプチドは、翻訳後の自然なプロセスに起因し得、同様に、完全に合成的な方法によってなされてよい。そのような誘導体の例は、(i)アシル基がアルカノイル基（例えば、アセチル、ヘキサノイル、オクタノイル）、アロイル基（例えば、ベンゾイル）またはF-moc（フルオレニルメチル-O--CO--）などの保護基であつてよい、アミノ末端または別の遊離アミノ基のN-アシル誘導体；(ii)カルボキシ末端または別の遊離カルボキシもしくはヒドロキシリル基のエステル；(iii)アンモニアまたは適切なアミンとの反応によって產生される、カルボキシ末端または別の遊離カルボキシリル基のアミド；(iv)リン酸化誘導体；(v)抗体または他の生物学的リガンドと結合した誘導体、ならびに他のタイプの誘導体を含む。

用語「誘導体」は、タンパク質またはポリペプチドを分枝状、または分枝のある、もしくは分枝のない環状にする化学修飾を含む。環状の、分枝状の、および分枝状で環状のタンパク質またはポリペプチドは、翻訳後の自然なプロセスに起因し得、同様に、完全に合成的な方法によってなされてよい。分子内ジスルフィド結合を含有する環状の誘導体は、慣用の固相合成によって製造されてよく、その間、環化のために選択された位置、例えばアミノおよびカルボキシ末端で適切なS保護システインまたはホモシステイン残基が組み込まれてよい。鎖集合の完了後、環化は(1)対応する2つの遊離SH-官能基の結果としての支持体上の(on-support)酸化でS保護基を選択的に除去してS-S結合を形成し、次いで支持体から産物を慣用の方法で除去し、適切な精製手順に付することによって；または、(2)完全な側鎖脱保護と共に支持体からペプチドを除去し、次いで遊離SH-官能基を高度希釈水溶液中で酸化することによって行われてよい。

#### 【0093】

分子内アミド結合を含有する環状の誘導体は、慣用の固相合成によって製造されてよく、その間、環化のために選択された位置で適切なアミノおよびカルボキシリル側鎖保護アミノ酸誘導体が組み込まれてよい。分子内-S-S-アルキル結合を含有する環状の誘導体は、慣用の固相によって製造されてよく、その間、環化のために選択された位置で適切なアミノ保護側鎖を有するアミノ酸残基、および適切なS保護システインまたはホモシステイン残基が組み込まれる。

#### 【0094】

より安定なペプチドを作製するために、同じタイプのD-アミノ酸によるコンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸の系統的な置換（例えば、L-リジンの代わりにD-リジン）が用いられてよい。それゆえ、本開示のペプチド誘導体またはペプチド模倣体は、全てL、全てD、またはD、Lペプチドの混合物であつてよい。好ましい実施態様では、ペプチドは全てD-アミノ酸からなる。ペプチダーゼはD-アミノ酸を基質として利用することができないため、N末端またはC末端D-アミノ酸の存在はペプチドのインビオ安定性を増加させる。

#### 【0095】

ペプチドのサブ配列内で天然アミノ酸を非天然アミノ酸で置換すると、タンパク質分解に対する耐性をも与えることができる。そのような置換は、例えば、N末端に作用するエキソペプチダーゼによるタンパク質分解に対する耐性を与えることができる。そのような置換は記載されており、これらの置換は生物学的活性に影響しない。非天然アミノ酸の例は、-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、C-メチルアミノ酸、および-Methylアミノ酸を含む。本開示において有用なアミノ酸類似体は、限定されるものではないが、-アラニン、ノルバリン、ノルロイシン、4-アミノ酪酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、シクロヘキシリラニン、2-アミノイソ酪酸、6-アミノヘキサン酸、t-ブチルグリシン、フェニルグリシン、o-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジンおよび他の非定型アミノ酸を含んでよい。さらに、非天然アミノ酸によるペプチドの合成は、当該技術分野で通例かつ周知である。

10

20

30

40

50

## 【0096】

ペプチドのN末端またはC末端残基に作用するペプチダーゼに対する耐性を与えるための1つの他の効果的な手段は、ペプチド末端に化学基を加え、修飾されたペプチドがもはやペプチダーゼの基質とならないようにすることである。1つのそのような化学修飾は、いずれかまたは両方の末端でのペプチドのグリコシル化である。特定の化学修飾、特にN末端グリコシル化は、ヒト血清におけるペプチドの安定性を増加させることが示されている。血清安定性を増強する他の化学修飾は、限定されるものではないが、1～20個の炭素の低級アルキルからなるN末端アルキル基、例えばアセチル基の付加、および／またはC末端アミドもしくは置換されたアミド基の付加を含む。特に、本開示は、N末端アセチル基および／またはC末端アミド基を有するペプチドからなる修飾ペプチドを含む。

10

## 【0097】

用語「ペプチド模倣体」または「模倣体」は、ペプチドまたはタンパク質の生物学的活性を模倣するが、化学的性質においてもはやペプチドではない、すなわちペプチド結合（すなわち、アミノ酸の間のアミド結合）をもはや1つも含有しない生物活性化合物を指す。ここで、用語ペプチド模倣体は、もはや完全なペプチド性ではない分子を含むより広範な意味で用いられており、例えば擬ペプチド、半ペプチド（semi-peptides）およびペプトイドを含む。このより広範な意味でのペプチド模倣体の例（ペプチドの部分がペプチド結合を欠く構造と交換されている）は、以下に記載されている。完全に非ペプチドであろうと部分的に非ペプチドであろうと、実施態様のペプチド模倣体は、ペプチド模倣体の基となるペプチド内の活性基の三次元配置とよく似た反応性化学部分の空間的配置を提供する。この類似の活性部位幾何学の結果として、ペプチド模倣体はペプチドの生物学的活性と類似の生物システムに対する影響を有する。

20

## 【0098】

ペプチド模倣体は、L-アミノ酸を含有するペプチドと比較して逆配列で配置したD-アミノ酸を含有する逆Dペプチドを含む。例えば、L-アミノ酸ペプチドのC末端残基がD-アミノ酸ペプチドのN末端になるなどである。逆D-ペプチドは、望ましくはL-アミノ酸ペプチドと同一の三次元立体構造を保持し、それゆえ同一の活性を保持しているが、望ましくは、インビトロおよびインビボで酵素分解に対してより安定であり、それゆえ元々のペプチドよりも優れた治療効果を有しうる（Brady and Dodson, Nature 368:692-693, 1994; and Jameson and McDonnel, Nature 368:744-746, 1994）。ペプチド模倣体は、親ペプチドと比較して逆配列で配置したL-アミノ酸を含有する逆Lペプチドも含む。親ペプチドのC末端残基は、逆LペプチドのN末端になるなどである。

30

## 【0099】

実施態様のペプチド模倣体は、好ましくは、三次元形状および生物学的活性の両方において、本明細書に記載されているペプチドと実質的に類似している。ペプチド模倣体を作製するための当該技術分野で周知の、ペプチドを構造的に修飾する方法の例は、特にN末端で、活性に不利に影響することなくタンパク質分解に対する安定性の増強をもたらしうるD-アミノ酸残基構造をもたらす、主鎖キラル中心の反転を含む。第二の方法は、安定性のために環状構造を変化させること、例えばN～C鎖間イミドおよびラクタムなどである。これの1つの例は、立体構造的に制限されたチモベンチン様化合物、例えば米国特許第4,457,489号に開示されている化合物に見られる（その開示は本明細書でその全体において参照することによって援用される）。第三の方法は、タンパク質分解に対する耐性を与える擬ペプチド結合によって、ペプチド内のペプチド結合を置換することである。

40

## 【0100】

ペプチド模倣体は、模倣体の1つもしくは両方の末端で保護基を含んでよく、または非ペプチド結合による1つ以上のペプチド結合の置換は、ペプチドそのものよりもタンパク質切断の影響を受けない。例えば、1つ以上のペプチド結合は、代替的タイプの共有結合（例えば、炭素-炭素結合またはアシル結合）と交換されうる。ペプチド模倣体は、アミノ末端またはカルボキシル末端保護基、例えばt-ブチルオキシカルボニル、アセチル

50

、アルキル、スクシニル、メトキシスクシニル、スペリル、アジピル、アゼライル、ダンシル、ベンジルオキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル、メトキシアゼライル、メトキシアジピル、メトキシスペリル、および2,4-ジニトロフェニルを取り込むこともでき、それによって模倣体をタンパク質分解により影響を受けにくくする。対応するペプチドよりもタンパク質分解の影響を受けない模倣体を与るために、非ペプチド結合およびカルボキシルまたはアミノ末端保護基は、単独または組み合わせて用いられてよい。さらに、例えば分子の半減期を増加させるために、正常なL-立体異性体がD-アミノ酸に置換されうる。従って、ペプチド模倣体は、以下の修飾の1つ以上を有するペプチドを含む：ペプチジル[---C(O)NR---]結合の1つ以上が非ペプチジル結合、例えば---CH<sub>2</sub>-カルバメート結合[---CH<sub>2</sub>--OC(O)NR---]；ホスホネート結合；---CH<sub>2</sub>-スルホンアミド[---CH<sub>2</sub>--S(O)<sub>2</sub>NR---]結合；尿素[---NHC(O)NH---]結合；---CH<sub>2</sub>-第二級アミン結合；もしくはアルキル化ペプチジル結合[---C(O)NR<sup>6</sup>---(ここでR<sup>6</sup>は低級アルキルである)]によって交換されているペプチド；N末端が---NRR<sup>1</sup>基；---NRC(O)R基；---NRC(O)OR基；---NRS(O)<sub>2</sub>R基；---NHC(O)NHR基(ここでRおよびR<sup>1</sup>は水素もしくは低級アルキルであるが、ただしRおよびR<sup>1</sup>の両方が水素となることはない)；スクシンイミド基；ベンジルオキシカルボニル-NH---(CBZ---CH---)基；もしくはフェニル環上に低級アルキル、低級アルコキシ、クロロ、およびプロモからなる群から選択される1~3個の置換基を有するベンジルオキシカルボニル-NH---基に誘導体化されているペプチド；または、C末端が---C(O)R<sup>2</sup>(ここでR<sup>2</sup>は低級アルコキシ、ならびに---NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>(ここでR<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は水素および低級アルキルからなる群から独立して選択される)からなる群から選択される)に誘導体化されているペプチド。

10

20

30

## 【0101】

好みしい模倣体は、ペプチドの---C(O)NH---結合の0個~全てが、---CR<sub>2</sub>OC(O)NR---結合；ホスホネート結合；---CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>NR---結合；---CH<sub>2</sub>NR---結合；---C(O)NR<sup>6</sup>---結合、および---NHC(O)NH---結合からなる群から選択される結合によって交換され(ここで、Rは水素または低級アルキルであり、R<sup>6</sup>は低級アルキルである)、模倣体のN末端は---NRR<sup>1</sup>基；---NRC(O)R基；---NRC(O)OR基；---NRS(O)<sub>2</sub>R基；---NHC(O)NHR基；スクシンイミド基；ベンジルオキシカルボニル-NH---基；ならびにフェニル環上に低級アルキル、低級アルコキシ、クロロ、およびプロモから選択される1~3個の置換基を有するベンジルオキシカルボニル-NH---基(ここで、RおよびR<sup>1</sup>は水素および低級アルキルからなる群から独立して選択される)からなる群から選択され、さらに模倣体のC末端は式---C(O)R<sup>2</sup>(ここで、R<sup>2</sup>はヒドロキシ、低級アルコキシ、および---NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>からなる群から選択される(ここでR<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は水素および低級アルキルからなる群から独立して選択され、---NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>基の窒素原子は任意にペプチドのN末端のアミン基であって、環状ペプチドを形成していてよい)を有するもの、ならびにその生理的に許容される塩である。

30

40

## 【0102】

用語「断片」または「サブ配列」は、タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列の連続的サブ配列からなるタンパク質またはポリペプチドを指し、自然発生の断片、例えばスプライスバリエントおよび自然発生のインビボプロテアーゼ活性に起因する断片を含む。そのような断片は、アミノ末端で、カルボキシ末端で、および/または内部で(例えば自然なスプライシングによって)切断されうる。そのような断片は、アミノ末端メチオニンを含み、または含まずに製造されてよい。用語「断片」は、同一タンパク質またはペプチドと同一であっても異なっていても、隣接アミノ酸配列が共通し、または共通せずに、直接またはリンカーを通じて結合した断片を含む。そのような断片は、本開示のアミノ酸配列と同一の少なくとも3つの隣接アミノ酸を含んでよい。

50

## 【0103】

語句「医薬的に許容される」または「治療的に許容される」は、生理的に許容でき、好ましくはヒトに投与された時に、典型的にアレルギー反応または類似の有害反応、例えば異常亢進、およびめまいなどを生じない分子実体および組成物を指す。好ましくは、本明細書で用いられている用語「医薬的に許容される」は、動物、特にヒトに使用するために連邦もしくは州政府の規制当局によって認可され、または米国薬局方もしくは他の一般的に認められている薬局方（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences）に記載されているものを意味する。

#### 【0104】

単語「a」または「an」が特許請求の範囲および／または明細書において用語「を含む」と共に用いられている時、「1」を意味しうるが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つより多く」の意味とも矛盾しない。10

#### 【0105】

この出願を通じて、用語「約」は、値が、値を決定するために利用される装置または方法の誤差の標準偏差を含むことを示すために用いられている。

#### 【0106】

##### 鉄代謝疾患

本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片もしくはペプチド模倣体を用いて治療および／または予防されうる状態は、鉄代謝の乱れと関連するいずれかの疾患、障害、または症候群を含む。鉄代謝の乱れは、鉄取り込み、鉄吸収、鉄輸送、鉄貯蔵、鉄プロセシング、鉄動員、および鉄利用の1つ以上の乱れと関連しうる。一般的に、鉄代謝の乱れは、鉄過剰状態、鉄分布異常または鉄欠乏をもたらす。20

#### 【0107】

鉄過剰状態と関連する状態は、原発性および続発性の両方の鉄過剰の疾患、症候群または障害を含み、例えば限定されるものではないが、遺伝性ヘモクロマトーシス、晩発性皮膚ポルフィリン症、遺伝性球状赤血球症、低色素性貧血、赤血球過形成性貧血(hypererythropoietic anemia) (CDAI)、顔面生殖器異形成(faciogenital dysplasia) (FGDY)、アースコグ症候群、無トランスフェリン血症、鉄芽球性貧血(SA)、ピリドキシン反応性鉄芽球性貧血、ならびに異常ヘモグロビン症、例えばサラセミアおよび鎌状赤血球を含む。いくつかの研究は、鉄代謝障害、例えばサラセミアおよびヘモクロマトーシスと、多数の疾患状態、例えばII型(インスリン非依存性)糖尿病およびアテローム性動脈硬化症の間の関連を示唆している(A. J. Matthews et al., J. Surg. Res., 1997, 73: 3540; T. P. Tuomainen et al., Diabetes Care, 1997, 20: 426-428)。30

#### 【0108】

鉄欠乏および／または鉄分布異常と関連する疾患は、限定されるものではないが、慢性疾患の貧血、炎症の貧血、鉄欠乏貧血、機能性鉄欠乏、および小球性貧血を含む。用語「慢性疾患の貧血」または「炎症の貧血」は、例えば、広範な感染、炎症、腫瘍性障害などの結果として発症するいずれかの貧血を指す。発症する貧血は、しばしば赤血球寿命の短縮およびマクロファージ内での鉄の隔離によって特徴づけられ、それは新たな赤血球を作製するために利用可能な鉄の量の減少をもたらす。慢性疾患の貧血または炎症の貧血と関連する状態は、限定されるものではないが、慢性腎疾患、末期腎疾患、腫瘍性障害、慢性細菌性心内膜炎、骨髄炎、リウマチ熱、および潰瘍性大腸炎を含む。さらなる状態は、感染、炎症、および腫瘍と関連する他の疾患および障害、例えば、炎症性感染(例えば、肺膿瘍、結核など)、炎症性非感染性障害(例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、肝炎、炎症性腸疾患など)、ならびに様々な癌、腫瘍、および悪性腫瘍(例えば、癌、肉腫、リンパ腫など)を含む。鉄欠乏性貧血は、状態、例えば妊娠、月経、乳児期および小児期、外傷による血液喪失などに起因しうる。40

#### 【0109】

鉄代謝は多数の他の疾患状態、例えば心血管疾患(例えばうっ血性心不全)、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびある種の結腸直腸癌において役割を果たすことも示唆されている(例えば、P. Tuomainen et al., Circulation, 1997, 97: 1461-1466; J. M.50

McCord, Circulation, 1991, 83: 1112-1114; J. L. Sullivan, J. Clin. Epidemiol., 1996, 49: 1345-1352; M. A. Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1997, 94: 9866-9868; P. Riederer et al., J. Neurochem., 1989, 512: 515-520; P. Knekt et al., Int. J. Cancer, 1994, 56: 379-382を参照のこと)。

#### 【0110】

癌

800人を超える女性からの乳癌における遺伝子発現プロファイルが、フェロポーチン遺伝子発現の減少が他の乳癌危険因子と無関係な無転移および疾患特異的生存率の有意な減少と関連することを明らかにすることが示されている(Pinnix et al. Science Translational Medicine 2(43):1-10 (August 2010))。高フェロポーチンおよび低ヘプシジン遺伝子発現は、90%を超える10年生存率を有する乳癌患者の非常に好ましいコホートを同定した。それゆえ、BMPシグナル伝達を低下させ、それゆえヘプシジン遺伝子発現を低下させ、かつ癌患者、例えば限定されるものではないが、乳癌患者のフェロポーチンレベルを上昇させるためにHJV.Fc投与することは、無転移および疾患特異的生存率の有意な減少を達成するはずである。

10

#### 【0111】

医薬組成物

本開示は、鉄恒常性障害を治療、予防および改善する方法に関する。本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体は、鉄恒常性と関連する状態または疾患の治療に有用である。

20

#### 【0112】

それゆえ、本開示の方法は、鉄を動員し、血清ヘモグロビンおよび/またはヘマトクリットレベルを増加させるために、それを必要とし、またはそれを必要とする危険性がある対象に、本開示の融合タンパク質、もしくはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体の1つ以上、または本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体の1つ以上を含む組成物の有効量を投与することを含む。1つの実施態様では、本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体の1つ以上ならびに適切な医薬担体を含む治療用組成物の有効量は、鉄恒常性に関連する症状を予防もしくは改善し、または障害、疾患もしくは状態を治療する目的で、鉄を動員し、血清ヘモグロビンおよび/またはヘマトクリットレベルを増加させるために対象に投与される。1つの実施態様では、対象は動物である。別の実施態様では、対象は哺乳類、好ましくはヒトである。

30

#### 【0113】

本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体は、鉄の動員ならびに血清ヘモグロビンおよび/またはヘマトクリットレベルの増加が有益となりうるいすれかの疾患状態または障害における症状の治療、予防または改善に用いられる。

#### 【0114】

本開示の範囲内にある組成物は、有害な副作用を回避しながら望ましい治療効果を達成するために効果的な量の活性剤(例えば本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体の1つ以上)を含有するであろう。活性剤の医薬的に許容される製剤および塩は本開示の範囲内にあり、当該技術分野で周知である。ポリペプチドアンタゴニストなどの投与のために、投与される量は有害な副作用を回避するように選択されなければならない。特定の疾患、障害または状態の治療に効果的な治療用組成物または医薬組成物の量は、疾患の性質および重症度、作用の標的部位、患者の体重、患者が摂取している特別食、併用される薬物、投与経路、ならびに当業者によって認識されるであろう他の要因に依存するであろう。投与量は、慣用の要因、例えば疾患の程度および患者によって異なるパラメーターに従って、臨床医によって適応されるであろう。典型的には、0.001~100mg/kgが対象に週2回投与される。好ましくは、10~30mg/kgが対象に週2回投与される。1つの具体的な実施態様では、20m

40

50

g / kg が対象に週 2 回投与される。効果的な用量は、インビトロおよび動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から外挿することができる。例えば、ラット研究から得られたデータに基づいてヒト用の効果的な mg / kg 用量を得るために、ラットにおける効果的な mg / kg 投与量を 6 で割る。

【 0115 】

様々な送達系が周知であり、融合タンパク質、もしくはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体、またはこれらの本開示の融合タンパク質、もしくはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体を含有する医薬組成物を投与するために用いられてよい。本開示の医薬組成物は、いずれかの適切な経路、例えば静脈内もしくは筋肉内注射、脳室内もしくは膜下腔内注射（中枢神経系投与用）、経口、局所、皮下、結膜下、もしくは経鼻、皮内、舌下、膣内、直腸または硬膜外経路によって投与することができる。好ましい投与経路は、静脈内投与である。

10

【 0116 】

当該技術分野で周知の他の送達系が本開示の医薬組成物の送達に用いられてよく、例えば水溶液、微小粒子、またはマイクロカプセル内のカプセル化を介して送達されてよい。

20

【 0117 】

さらに別の実施態様では、本開示の医薬組成物は制御放出系にて送達されてよい。1つの実施態様ではポリマー材料が用いられてよく、別の実施態様ではポンプが用いられてよい。

20

【 0118 】

上記のように、本開示の医薬組成物は、医薬的に許容される担体と併用して、本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体、断片およびペプチド模倣体の1つ以上を含む。用語「担体」は、ペプチド、ペプチド誘導体またはペプチド模倣体と共に投与される、希釈剤、アジュバントおよび/または賦形剤、例えば充填剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、シリカ・フロー・コンディショナー (silica flow conditioner)、安定化剤またはビヒクリルを指す。そのような医薬担体は、滅菌液、例えば水および油、例えば鉱油、植物油（例えば、落花生油、大豆油、ゴマ油およびキャノーラ油）、動物油または合成起源の油を含む。グリセロールおよびデキストロース水溶液、ならびに生理食塩水も本開示の医薬組成物の液体担体として利用されてよい。当然ながら、担体の選択は、ペプチド、ペプチド誘導体またはペプチド模倣体の性質、その溶解性および他の生理的特性、ならびに送達および適用の標的部位に依存する。適切な医薬担体の例は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro, 2003, 21st edition, Mack Publishing Companyに記載されている。

30

【 0119 】

本開示の医薬製剤に取り込まれてよいさらなる医薬的に適切な材料は、吸収促進剤、pH 制御因子および緩衝液、モル浸透圧濃度調節剤 (osmolarity adjusters)、防腐剤、安定剤、抗酸化剤、界面活性剤、増粘剤、皮膚軟化剤、分散剤、香味剤、着色剤ならびに湿润剤を含む。

40

【 0120 】

適切な医薬賦形剤の例は、水、グルコース、スクロース、ラクトース、グリコール、エタノール、モノステアリン酸グリセロール、ゼラチン、米、デンプン、小麦粉、チョーク (chalk)、ステアリン酸ナトリウム、麦芽、および塩化ナトリウムなどである。本開示の医薬組成物は、溶液、カプセル剤、錠剤、クリーム剤、ゲル剤、粉末、および持続放出製剤などの形態であってよい。組成物は、伝統的な結合剤および担体、例えばトリグリセリドで、坐剤として製剤化されてよい (Remington: The Science and Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro, 2003, 21.sup.th edition, Mack Publishing Companyを参照のこと)。そのような組成物は、対象への適切な投与のための形態を提供するように、適切な量の担体と共に治療的有効量の治療用組成物を含有する。製剤は、投与様式および標的的作用部位（例えば、特定の臓器または細胞型）に適合するように設計される。

50

## 【0121】

本開示の医薬組成物は、中性形態または塩形態として製剤化されてよい。医薬的に許容される塩は、遊離アミノ基と形成されたもの、および遊離カルボキシル基と反応するものを含む。医薬品業界で一般的に用いられる無毒性アルカリ金属、アルカリ土類金属およびアンモニウム塩は、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウム、およびプロタミン亜鉛塩を含み、当該技術分野で周知の方法によって製造される。該用語は、一般的に本開示の化合物を適切な有機または無機酸と反応させることによって製造される非毒性酸付加塩も含む。代表的な塩は、臭化水素酸塩、塩酸塩、吉草酸塩、シュウ酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩 (laureate)、ホウ酸塩、安息香酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、酢酸塩、リン酸塩、トシリ酸塩 (tysolate)、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、およびナプシル酸塩などを含む。  
10

## 【0122】

本開示で用いられてよい充填剤または結合剤の例は、アラビアゴム、アルギン酸、リン酸カルシウム (リン酸水素カルシウム)、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、デキストリン、デキストレート (dextrates)、スクロース、チロース、アルファ化デンプン、硫酸カルシウム、アミロース、グリシン、ペントナイト、マルトース、ソルビトール、エチルセルロース、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二ナトリウム、ピロ亜硫酸二ナトリウム、ポリビニルアルコール、ゼラチン、グルコース、グーガム、液状グルコース、圧縮糖 (compressible sugar)、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、マルトデキストリン、ポリエチレンオキシド、ポリメタクリレート、ポビドン、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、微結晶セルロース、デンプン、およびゼインを含む。別の最も好ましい充填剤または結合剤は、微結晶セルロースからなる。  
20

## 【0123】

用いられてよい崩壊剤の例は、アルギン酸、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース (低置換)、微結晶セルロース、粉末セルロース、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、クロスボビドン、メチルセルロース、ポラクリリンカリウム、ポビドン、アルギン酸ナトリウム、デンブングリコール酸ナトリウム、デンプン、二亜硫酸二ナトリウム、エダタミル二ナトリウム、エデト酸二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 架橋ポリビニルピロリジン、アルファ化デンプン、カルボキシメチルデンプン、カルボキシメチルデンプンナトリウムおよび微結晶セルロースを含む。  
30

## 【0124】

滑沢剤の例は、ステアリン酸カルシウム、キャノーラ油、パルミトステアリン酸グリセリル、硬化植物油 (I型)、酸化マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、鉱油、ポロクサマー、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸フマル酸ナトリウム (sodium stearate fumarate)、ステアリン酸、タルク、ステアリン酸亜鉛、グリセリルベハペート (glyceryl behapate)、ラウリル硫酸マグネシウム、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム / 酢酸ナトリウム (組み合わせにて) およびD-Lロイシンを含む。  
40

## 【0125】

シリカ・フロー・コンディショナー (silica flow conditioners) の例は、コロイド状二酸化ケイ素、ケイ酸アルミニウムマグネシウムおよびグーガムを含む。別の最も好ましいシリカ・フロー・コンディショナー (silica flow conditioner) は、二酸化ケイ素からなる。

## 【0126】

安定化剤の例は、アラビアゴム、アルブミン、ポリビニルアルコール、アルギン酸、ペントナイト、リン酸二カルシウム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、コロイド状二酸化ケイ素、シクロデキストリン、モノステアリン酸グリセリル  
50

、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、三ケイ酸マグネシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、プロピレン glycole、アルギン酸プロピレン glycole、アルギン酸ナトリウム、カルナウバワックス、キサンタンガム、デンプン、ステアリン酸塩、ステアリン酸、ステアリン酸モノグリセリド (stearic monoglyceride) およびステアリルアルコールを含む。

#### 【0127】

本開示は、対象に投与された時点より安定となるようなペプチドまたはペプチド誘導体の修飾（すなわち、投与された時点で、非修飾形態と比較してより長い半減期またはより長い有効期間を有するもの）も提供する。そのような修飾は、この開示が関係する分野の当業者に周知である（例えば、ポリエチレン glycole 誘導体化、別名 P E G 化、マイクロカプセル化など）。 10

#### 【0128】

##### スクリーニング方法

本開示は、哺乳類対象の血清鉄、血清ヘモグロビンおよび / またはヘマトクリットレベルを変化させる化合物（例えば、H J V - I g G 融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体）のスクリーニング方法を提供する。いくつかの実施態様では、哺乳類対象において鉄を動員し、血清ヘモグロビンおよび / またはヘマトクリットレベルを変化させる（例えば、増加または減少させる）化合物のスクリーニング方法が提供される。

#### 【0129】

別の実施態様では、本開示は、化合物をスクリーニングする方法であって、化合物が B M P - 6 に特異的に結合するそれらの能力についてスクリーニングされる方法を提供する。具体的な実施態様では、本開示の組成物は、少なくとも  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$  または  $10^{-12}$  M の  $K_D$  で B M P - 6 に結合するそれらの能力についてスクリーニングされる。別の実施態様では、本開示は、化合物をスクリーニングする方法であって、化合物が B M P - 6 シグナル伝達を阻害するそれらの能力についてスクリーニングされる方法を提供する。具体的な実施態様では、本開示の組成物は、B M P - 6 シグナル伝達を少なくとも 10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、97、99 または 100 % 阻害するそれらの能力についてスクリーニングされる。 20

#### 【0130】

##### 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本開示の別の態様は、本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体をコードする核酸を含有するベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書で用いられている用語「ベクター」は、それに結合した別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、付加的 D N A 断片を連結することができる直鎖状または環状二本鎖 D N A ループを指す。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、ウイルスゲノムに付加的 D N A 断片を連結することができる。特定のベクターはそれらが導入された宿主細胞内で自律複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターはそれらが動作可能のように (operatively) 結合した遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書で「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換え D N A 技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。プラスミドは最も一般的に用いられるベクターの形態であるため、本明細書において「プラスミド」および「ベクター」は互換的に用いられてよい。しかしながら、本開示は、他の形態の発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を含むことを意図しており、それらは同等の機能を果たす。 40

10

20

30

40

50

## 【0131】

本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適切な形態の本開示の核酸を含み、これは、組換え発現ベクターが、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され、発現される核酸配列と動作可能なように(operatively)結合した1つ以上の制御配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内において、「動作可能なように(operably)結合した」は、興味あるヌクレオチド配列がヌクレオチド配列の発現を可能にする様式にて制御配列と結合していることを意味することを意図している(例えば、インビトロ転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入された時に宿主細胞において)。用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御要素(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを意図している。そのような制御配列は、例えばGoeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。制御配列は、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの(例えば、組織特異的制御配列)を含む。当業者であれば理解できるであろうが、発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、望ましいタンパク質の発現レベルなどの要因に依存しうる。本開示の発現ベクターは、宿主細胞に導入され得、それによって本明細書に記載されている核酸によってコードされている本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体が産生される。

## 【0132】

本開示の組換え発現ベクターは、原核または真核細胞内で本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体の発現用に設計されうる。例えば、本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを用いる)、酵母細胞または哺乳類細胞内で発現されうる。適切な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)でさらに議論されている。あるいは、組換え発現ベクターは、インビトロで、例えばT7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを用いて転写および翻訳されうる。

## 【0133】

原核生物内のタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する構成的または誘導性プロモーターを含有するベクターを含む大腸菌内で最も頻繁に行われる。融合ベクターは、多数のアミノ酸を、その中にコードされたタンパク質、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。そのような融合ベクターは典型的に、以下の3つの目的を果たす:(1)組換えタンパク質の発現を増加させる;(2)組換えタンパク質の溶解性を増加させる;および(3)親和性精製においてリガンドとして作用することによって、組換えタンパク質の精製を助ける。しばしば、融合発現ベクターにおいて、融合部分と組換えタンパク質の接合部にタンパク質切断部位が導入され、融合タンパク質の精製の後で融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にする。そのような酵素、およびそれらの同族認識配列は、第Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターは、pGEX(ファルマシア・バイオテック・インコーポレーテッド; Smith and Johnson (1988) Gene 67:31-40)、pMAL(ニュー・イングランド・バイオラブズ、ベバリー、マサチューセッツ州)およびpRIT5(ファルマシア、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)を含み、それぞれグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、標的組換えタンパク質に融合する。

## 【0134】

適切な誘導性非融合大腸菌発現ベクターの例は、pTrc(Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315)およびpET-11d(Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)を含

10

20

30

40

50

む。

**【 0 1 3 5 】**

大腸菌内で組換えタンパク質発現を最大にするための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質切断する能力が低下した宿主細菌内でタンパク質を発現することである。Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128を参照のこと。別の戦略は、各アミノ酸用の個々のコドンが大腸菌内で優先的に利用されているものになるように発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変化させることである (Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20:211-217, 10-13, 19-34, 45-53, 58-85, 111-113, 120, 130, 132-134 and 135-18)。本開示の核酸配列のそのような変化は、標準的なDNA合成技術によって行われる。

10

**【 0 1 3 6 】**

別の実施態様では、本開示の組成物で用いられる発現ベクターは、酵母発現ベクターである。出芽酵母内での発現用ベクターの例は、p Y e p S e c 1 (Baldari, et al., (1987) EMBO J 6:229-234)、p M F a (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943)、p J R Y 8 8 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123)、p Y E S 2 (インビトロジェン・コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州)、およびp i c Z (インビトロジェン・コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州)を含む。

**【 0 1 3 7 】**

あるいは、本開示の組成物は、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞で発現されうる。培養昆虫細胞(例えば、S F 9 細胞)内のタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターは、p A c 系 (Smith et al. (1983) Mol Cell Biol 3:2156-2165) および p V L 系 (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39) を含む。

20

**【 0 1 3 8 】**

さらに別の実施態様では、本開示の核酸は、哺乳類発現ベクターを用いて哺乳類細胞内で発現される。哺乳類発現ベクターの例は、p C D M 8 (Seed (1987) Nature 329:840) および p M T 2 P C (Kaufman et al. (1987) EMBO J 6: 187-195) を含む。哺乳類細胞内で用いられる場合、発現ベクターの制御機能は、しばしばウイルス制御要素によって提供される。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来するものである。原核および真核細胞の両方のための他の適切な発現系。例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989のChapters 16および17を参照のこと。

30

**【 0 1 3 9 】**

別の実施態様では、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞型内で優先的に核酸の発現を指示することができる(例えば、組織特異的制御要素が核酸を発現するために用いられる)。組織特異的制御要素は当該技術分野で周知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的例は、アルブミンプロモーター(肝臓特異的;Pinkert et al. (1987) Genes Dev 1:268-277)、リンパ系特異的プロモーター(Calam and Eaton (1988) Adv Immunol 43:235-275)、特にT細胞受容体のプロモーター(Winoto and Baltimore (1989) EMBO J 8:729-733)および免疫グロブリン(Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748)、神経特異的プロモーター(例えば、神経フィラメントプロモーター;Byrne and Ruddle (1989) PNAS 86:5473-5477)、脾臓特異的プロモーター(Edlund et al. (1985) Science 230:912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター;米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号)を含む。発生的に制御されるプロモーターは、例えばマウスhoxプロモーター(Kessel and Gruss (1990) Science 249:374-379)および-フェトタンパク質プロモーター(Campes and Tilghman (1989) Genes Dev 3:537-546)も包含する。

40

**【 0 1 4 0 】**

50

本開示はさらに、アンチセンス配向にて発現ベクターにクローニングされた本開示のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、本開示の融合タンパク質のmRNAにアンチセンスであるRNA分子の発現を可能にする(DNA分子の転写によって)様式にて、制御配列と動作可能なよう(operatively)結合している。アンチセンス配向にてクローニングされた核酸と動作可能なよう(operatively)結合した制御配列は、様々な細胞型においてアンチセンスRNA分子の継続的発現を指示するように選択され得、例えばウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサーであり、または、制御配列はアンチセンスRNAの構成的、組織特異的または細胞型特異的発現を指示するように選択されうる。アンチセンス発現ベクターは組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒ウイルスの形態であってよく、その中でアンチセンス核酸は高効率制御領域(その活性はベクターが導入されている細胞型によって決定されうる)のコントロール下で產生される。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の制御の議論については、Weintraub et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews: Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986を参照のこと。

10

## 【0141】

本開示の別の態様は、本開示の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書で互換的に用いられている。該用語は特定の対象細胞のみならず、該細胞の子孫細胞または潜在的子孫細胞も指すと理解されたい。変異または環境の影響のいずれかによって特定の修飾が後続の世代に生じうるため、該子孫細胞は、実際は親細胞と同一ではないかも知れないが、本明細書で用いられている用語の範囲内になおも含まれる。

20

## 【0142】

宿主細胞は、いずれかの原核または真核細胞であってよい。例えば、本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞、酵母または哺乳類細胞(例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)もしくはCOS細胞)内で発現されうる。他の適切な宿主細胞は当業者に周知である。好ましい実施態様では、本開示の融合タンパク質、またはそれに由来する変異体、誘導体もしくはペプチド模倣体は、CHO細胞内で発現される。

30

## 【0143】

ベクターDNAは、慣用の形質転換またはトランスフェクション技術によって原核または真核細胞に導入されうる。本明細書で用いられている用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来核酸(例えば、DNA)を宿主細胞に導入するための当該技術分野で認識されている様々な技術、例えばリン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈、DEAEデキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを指すことを意図している。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする適切な方法は、Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)、および他の実験マニュアルに見ることができる。

## 【0144】

哺乳類細胞の安定なトランスフェクションのために、用いられる発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存するが、ほんのわずかの細胞のみが外来DNAをそれらのゲノムに組み込めばよいことが知られている。これらの組み込み体を同定および選択するために、選択可能なマーカー(例えば、抗生物質耐性マーカー)をコードする遺伝子が、興味ある遺伝子と共に宿主細胞に一般的に導入される。様々な選択可能なマーカーは、薬物耐性を与えるもの、例えばG418、ハイグロマイシンおよびメトトレキセートを含む。選択可能なマーカーをコードする核酸は、本開示の組成物をコードしているベクターと同一のベクター上において宿主細胞に導入することができ、または別々のベクターに導入することができる。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定することができる(例えば、これらの選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存し、一方その他の細胞は死滅する)。

40

50

## 【0145】

本開示の宿主細胞、例えば培養中の原核または真核宿主細胞は、1つ以上の本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体を產生（すなわち発現）するために用いられてよい。したがって、本開示は、本開示の宿主細胞を用いて1つ以上の本開示の融合タンパク質、ならびにそれに由来する変異体、誘導体およびペプチド模倣体を產生する方法をさらに提供する。1つの実施態様では、該方法は、本開示の組成物が產生されるように本開示の宿主細胞（本開示の組成物をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を適切な培地中で培養することを含む。別の実施態様では、該方法は、培地または宿主細胞から本開示の組成物を単離することをさらに含む。

## 【0146】

さらに詳細な説明がなくとも、当業者であれば、前述の記載を用いて、本開示を最大限に利用することができると考えられる。以下の実施例は説明目的のみで提供されているのであって、決して本開示の残部を限定するものではない。

## 【実施例】

## 【0147】

実施例1. ヘモジュベリン-Fc融合タンパク質で処置された貧血ラットにおけるヘマトクリットの増加。

ラットに15mg/kgで一用量のラムノースを注射した。28日後、関節腫脹、貧血および顕著な白血球増加症を発症したラットを、3つの群の中の1つにランダムに割り当てた。第1群では、ラットを2mg/kgのHJV.Fc（配列番号9）の静脈内注射で、週2回、4週間処置した。第2群では、ラットを20mg/kgのHJV.Fcの静脈内注射で、週2回、4週間処置した。第3群のラットは処置しなかった。

## 【0148】

ヘマトクリットおよびヘモグロビン血清濃度を毎週測定した。4週間後の終末期出血（terminal bleed）で、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血清鉄、脾臓フェリチンおよび肝臓ヘプシジンRNAを決定した。

## 【0149】

図3、5および6に示すように、高用量のHJV.Fcを投与された貧血ラットは、HJV.Fcを投与されなかった貧血ラットよりも、有意に高い血清ヘマトクリットおよび血清ヘモグロビンを有していた。HJV.Fcを投与された貧血ラットは、処置から4週間に後に、非貧血ラットと類似の血清ヘマトクリットおよびヘモグロビンを有していた。低用量HJV.Fcからのデータを高用量データと合わせると、HJV.Fcを投与されたラットは、HJV.Fcを投与されなかった貧血ラットよりも有意に高い血清ヘマトクリットおよび血清ヘモグロビンを有していた（図4）。この場合もやはり、HJV.Fcを投与された貧血ラットは、処置から4週間に後に非貧血ラットと類似の血清ヘマトクリットおよびヘモグロビンを有していた。

## 【0150】

実施例2. 単量体HJV.HisはBMP-6に対する親和性が低い。

図7aは、アミンカップリング法(Halbrooks 2007)によってCM5センサーチップ上に固定化したヒトBMP6と、HISタグ結合を有する可溶性ヒトヘモジュベリンの結合を示す。1部位の一価フィットモデル(one-site univalent fit model)を用いると、およそ33nMのK<sub>d</sub>が得られる。図7bは、可溶性HJV.Fcタンパク質も固定化したヒトBMP6に結合することができ、2部位の二価フィットモデル(two-site bivalent fit model)（ジスルフィド結合したHJV.Fcの二量体の性質を説明するため）がおよそ13pMの予備的なK<sub>d</sub>を与えることを示しているが、これは単量体HJV.Hisタンパク質と比較して非常に高い親和性である。それゆえ、図7aに示すように、単量体HJV.HisはBMP6に対する親和性が低い。図7bに示すように、ホモ二量体HJV.Fcは、有意に高いBMP6に対する結合親和性を有する。

## 【0151】

実施例3. HJV.Fcは用量依存的様式にてBMP6活性を阻害することができる。

10

20

30

40

50

細胞ベースの生物学的阻害ルシフェラーゼアッセイを用いている図8に示すように、HJV.FcはBMP6活性を用量依存的様式にて阻害することができる。肝細胞癌由来のHepG2細胞内でのヘプシンプロモータルシフェラーゼアッセイを以前に記載されたようにして行った(Babitt 2007)。HJV.Fc阻害アッセイのために、ヘプシンプロモータルシフェラーゼレポーターで安定にトランスフェクトされたHepG2細胞(C33細胞株)を6時間血清飢餓状態にし、次いで100ng/ml BMP-6リガンドと共に、単独または0.5、5もしくは10μg/mlのHJV.Fcと共に16時間インキュベートした。「BRX3」および「A6」は、2つの異なるロットのHJV.Fcタンパク質である。さらに、図9に示すように、HJV.Fcは、HPLC分析によって立証した場合に、本質的に純粋なホモ二量体タンパク質の調製品にて製造される。この分析方法は、HJV.Fcのサンプルを、100mMリン酸ナトリウム、200mM塩化ナトリウム、pH6.0のランニング緩衝液を満たしたBioSep S3000クロマトグラフィーカラム(フェノメネックス)に注入する操作を含んだ。流速は1ml/minであり、検出は波長280nmで行った。

10

## 【0152】

本明細書で引用されている全ての出版物および特許出願は、個々の出版物または特許出願が参考することによって援用されることを具体的かつ個々に示されているかのように、参考することによって本明細書に援用される。

20

## 【0153】

前述の開示は理解の明確性のための説明および例示のために少し詳しく記載されているが、この開示の教示を考慮した当業者にとって、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく特定の変化および修飾がそれに対してなされてよいことは明らかであろう。

【図1】

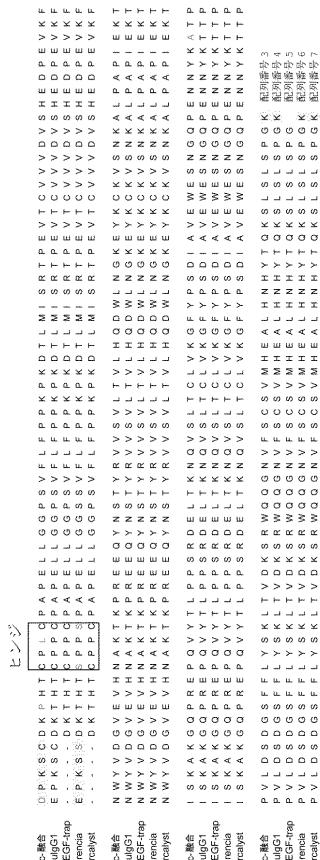


Figure 1

【図2】

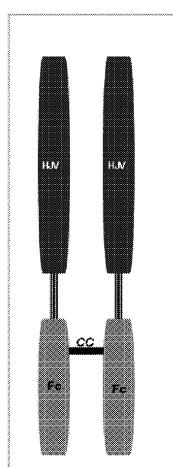


Figure 2

【図3】

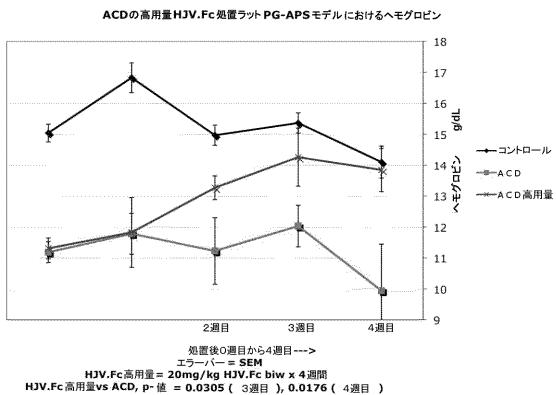


Figure 3

【図4】

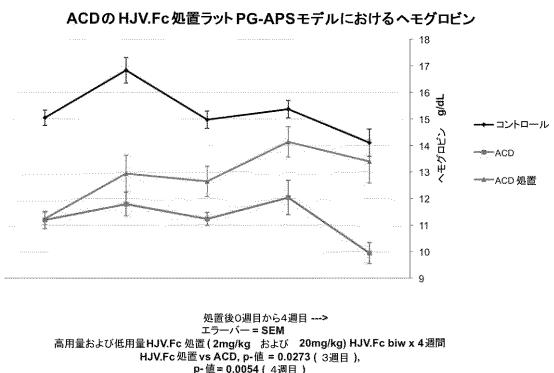


Figure 4

【図5】

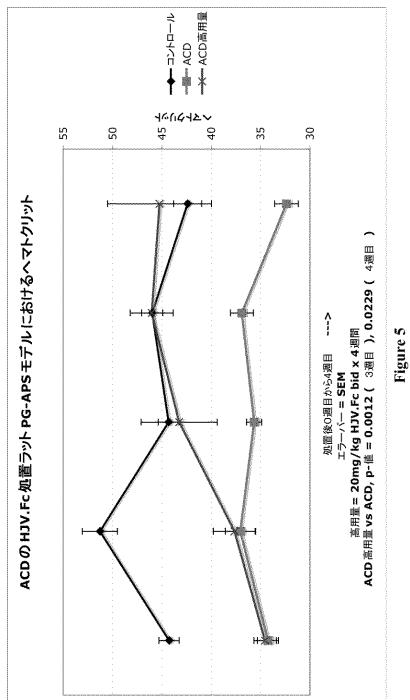


Figure 5

【図6】

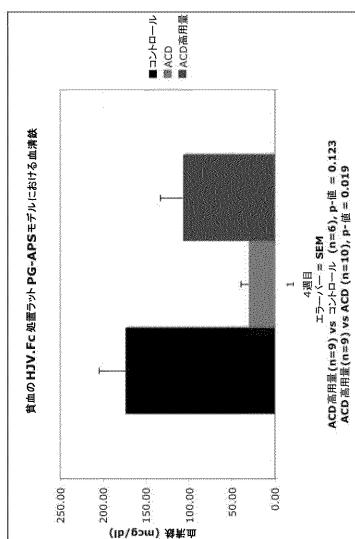
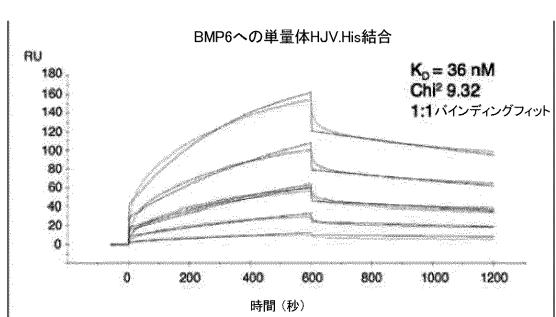


Figure 6

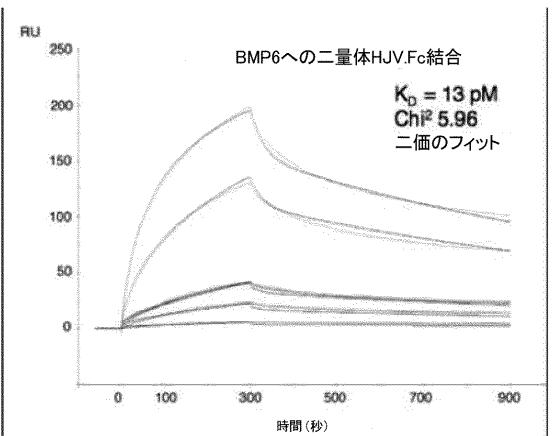
【図 7 A】

Figure 7A

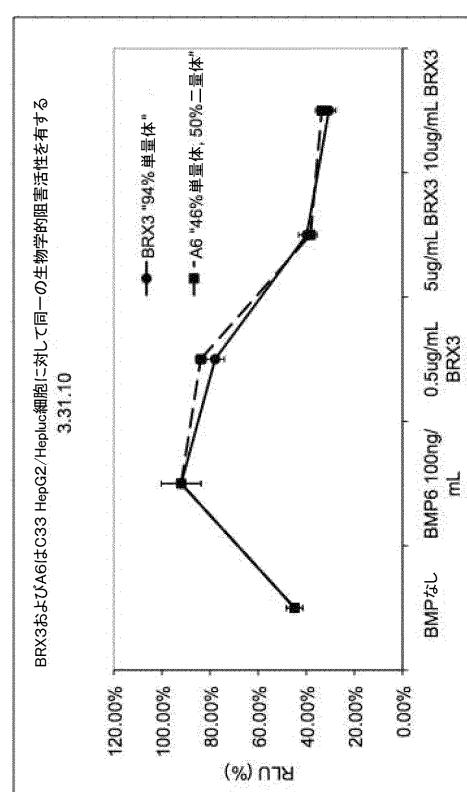


【図 7 B】

Figure 7B

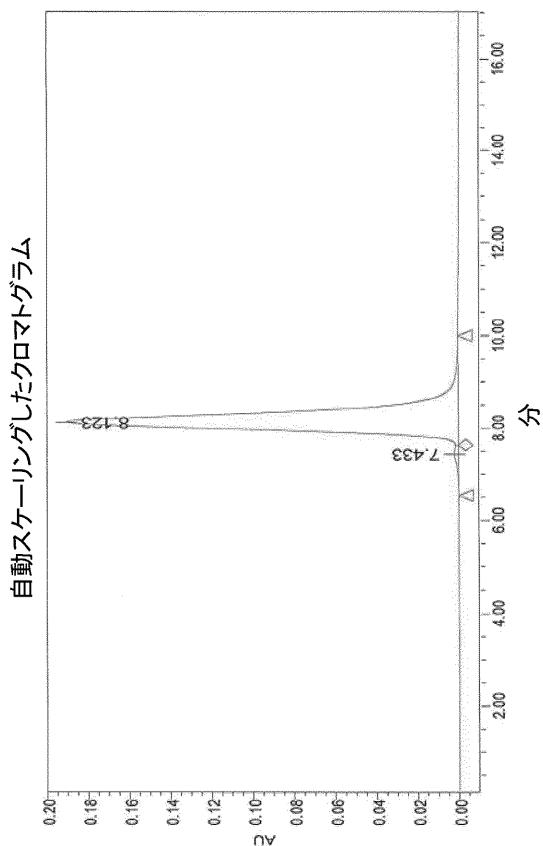


【図 8】



【図 9】

Figure 9



【配列表】

2014506452000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月17日(2013.9.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2014506452000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/021829
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>C07K 19/00(2006.01)i, C07K 1/16(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 19/00; C07K 14/475		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), Pubmed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/124768 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 16 October 2008 See the abstract; paras. [0056]~[0058]; claim 1.	1-21,23-37,37(1) ,38
X	ANDRIOPoulos, B. Jr. et al. 'BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism' Nature Genetics. Vol.41(4), pp.482-487 (1 March 2009) See the abstract.	1-21,23-37,37(1) ,38
A	NILI, M. et al. 'Soluble repulsive guidance molecule c/hemojuvelin is a broad spectrum bone morphogenetic protein (BMP) antagonist and inhibits both BMP2- and BMP6- mediated signaling and gene expression' Journal of Biological Chemistry. Vol.285(32), pp.24783-24792 (8 June 2010) See the abstract.	1-21,23-37,37(1) ,38
A	ZHANG, A. S. et al. 'The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo' Journal of Biological Chemistry. Vol.285(22), pp.16416-16423 (2 April 2010) See the abstract.	1-21,23-37,37(1) ,38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:      "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance      "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art      "&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  18 SEPTEMBER 2012 (18.09.2012)	Date of mailing of the international search report  <b>19 SEPTEMBER 2012 (19.09.2012)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR   Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer  KIM, JI YUN Telephone No. 82-42-481-8288 	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2012/021829****Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 22,39-71  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Said claims pertain to methods for treatment of the human body, thus relate to a subject-matter which International Searching Authority is not required to search under PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. <b>PCT/US2012/021829</b>
---

Note: The claim 37 was found twice, and this authority renumbered the second claim 37 as claim 37(1).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational application No.  
**PCT/US2012/021829**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008-124768 A1	16.10.2008	US 2012-164140 A1	28.06.2012

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

- (74)代理人 100068526  
弁理士 田村 恒生
- (74)代理人 100100158  
弁理士 鮫島 瞳
- (74)代理人 100138900  
弁理士 新田 昌宏
- (74)代理人 100162684  
弁理士 呉 英燦
- (74)代理人 100176474  
弁理士 秋山 信彦
- (72)発明者 パトリック・ギアリング  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 3 ワシントン州ノース・シアトル、パラタイン・アベニュー 7217 番
- (72)発明者 ハーバート・ワイ・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、スブルース・ストリート 68 番
- (72)発明者 ジョディ・エル・バビット  
アメリカ合衆国 0 2 4 6 1 マサチューセッツ州ニュートン・ハイランズ、アップランド・アベニュー 110 番
- (72)発明者 トラシー・メナル  
アメリカ合衆国 0 2 1 1 4 マサチューセッツ州ボストン、ブルフィンチ・プレイス 7 番、サード・フロア

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA80 CA01 DA02 EA04 GA11 HA08  
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA44  
4C084 AA02 BA01 BA22 BA26 BA34 BA44 NA14 ZA551 ZB261  
4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 DA01 DA75 EA24 FA74