

(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2009-502121

(P2009-502121A)

(43) 公表日 平成21年1月29日(2009.1.29)

(51) Int.Cl.		F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N</b>	<b>15/09</b>	(2006.01) C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
<b>C 07 K</b>	<b>14/47</b>	(2006.01) C 07 K 14/47	4 B 0 6 4
<b>C 07 K</b>	<b>16/00</b>	(2006.01) C 07 K 16/00	4 B 0 6 5
<b>C 07 K</b>	<b>19/00</b>	(2006.01) C 07 K 19/00	4 C 0 8 4
<b>C 12 N</b>	<b>5/10</b>	(2006.01) C 12 N 5/00	B 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-519739 (P2008-519739)	(71) 出願人	506297005 アクセルロン ファーマ インコーポレーテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 139, ケンブリッジ, エミリー ス トリート 24
(86) (22) 出願日	平成18年6月30日 (2006. 6. 30)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月14日 (2008. 2. 14)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/026443	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02007/006025		
(87) 國際公開日	平成19年1月11日 (2007. 1. 11)		
(31) 優先権主張番号	60/696, 226		
(32) 優先日	平成17年7月1日 (2005. 7. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L e f t y 、 L e f t y 誘導体およびそれらの使用

## (57) 【要約】

本開示は、 L e f t y 誘導体、及び例えば N o d a 1 、 G D F - 8 (ミオスタチン) 及び G D F - 1 1 等の特定のリガンドの機能の拮抗物質としての L e f t y ポリペプチドの使用に関する。これらの誘導体は、例えば I g G 、特に I g G の F c 部分のようなその他の機能性異種タンパク質に融合される場合がある。本開示によれば、 L e f t y ポリペプチドは、例えばニューロン疾患、筋肉及び骨の状態、並びに代謝障害を含む種々の障害の処置に有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化学式 - A - X - B - で示されるようなアミノ酸配列を含み、  
 A が、配列番号 1 の領域 2 の配列と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列から本質的に構成され；  
 B が、配列番号 1 の領域 4 の配列と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列から本質的に構成され；  
 X が、0 個、1 個又は複数個のアミノ酸から構成され；且つ  
 N o d a 1 、ミオスタチン及び G D F - 1 1 の 1 つ以上に結合する、組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

ヒト L e f t y ポリペプチドのシステインノット部分と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 3】

配列番号 1 のアミノ酸 22 ~ 353 、及び配列番号 2 のアミノ酸 22 ~ 353 からなる群から選択されるヒト L e f t y ポリペプチド配列と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列を含み、

R X X R 開裂配列の 1 つ又は両方が、改変された配列における開裂を防止するように改変される、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

20

## 【請求項 4】

A が、配列番号 1 の領域 2 の配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列から構成され、B が、配列番号 1 の領域 4 の配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列から構成される、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 5】

A が、C R Q E M Y I D L Q G M K W A K N W V L E P P G F L A Y E C V G T (配列番号 5 ) 、及び C R Q E M Y I D L Q G M K W A E N W V L E P P G F L A Y E C V G T (配列番号 7 ) からなる群から選択され、B が、C I A S E T A S L P M I V S I K E G G R T R P Q V V S L P N M R V Q K C (配列番号 6 ) 、及び C I A S E T D S L P M I V S I K E G G R T R P Q V V S L P N M R V Q K C (配列番号 8 ) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

30

## 【請求項 6】

X が免疫原性の低いアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 7】

X がグリコシル化部位を含む、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 8】

X の長さが 0 ~ 50 アミノ酸である、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 9】

X が二量体化ドメインを含む、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

40

## 【請求項 10】

前記ポリペプチドが更なるドメインに融合している、請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 11】

前記更なるドメインが二量体化ドメインである、請求項 10 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

## 【請求項 12】

前記更なるドメインが、前記 L e f t y ポリペプチドのカルボキシル又はアミノ末端に

50

融合している、請求項 10 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 13】

前記二量体化ドメインが L e f t y プロペプチド配列を含む、請求項 9 又は 11 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 14】

前記二量体化ドメインが免疫グロブリン F a b 定常ドメインを含む、請求項 9 又は 11 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 15】

前記免疫グロブリン F a b 定常ドメインが、免疫グロブリン重鎖定常領域、及び免疫グロブリン軽鎖定常領域から選択される、請求項 14 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。 10

【請求項 16】

前記二量体化ドメインがロイシンジッパードメインである、請求項 9 又は 11 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 17】

前記ロイシンジッパードメインが、少なくとも 4 つのロイシンヘプタドを含む、請求項 16 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 18】

前記ロイシンジッパードメインが、F o s 及び J u n ロイシンジッパードメインからなる群から選択される、請求項 17 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。 20

【請求項 19】

前記 L e f t y ポリペプチドと前記二量体化ドメインの間に介在し、且つ該 L e f t y ポリペプチドと二量体化ドメインを共有結合させるリンカー配列を更に含む、請求項 11 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 20】

X が、N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を結合するドメインを含む、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 21】

前記更なるドメインが、N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を結合するドメインである、請求項 1 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。 30

【請求項 22】

N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を結合する前記ドメインが、I 型受容体への N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 の結合を阻害する、請求項 20 又は 21 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 23】

N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を結合する前記ドメインが、A L K 4 及び A L K 7 からなる群から選択される I 型受容体への N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 の結合を競合的に阻害する、請求項 22 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 24】

N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を結合する前記ドメインが、 40

( a ) A L K 4 の細胞外部分；

( b ) A L K 7 の細胞外部分；

( c ) N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を結合する抗体の抗原結合部分；並びに

( d ) N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 に結合するように選択されたランダム化ポリペプチド

からなる群から選択される、請求項 22 に記載の組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド。

【請求項 25】

前記修飾された L e f t y ポリペプチドが、細胞内で、A c t R I I 受容体、ミオスタ

50

チン、Nodal、及びGDF-11から選択されるタンパク質により媒介されるシグナル伝達を阻害する、請求項1～24の何れか1項に記載の組換えLefty誘導体ポリペプチド。

【請求項26】

前記修飾されたLeftyポリペプチドが、前記組換えLefty誘導体ポリペプチドの分泌を媒介する異種配列を含む、請求項1～25の何れか1項に記載の組換えLefty誘導体ポリペプチド。

【請求項27】

前記組換えLefty誘導体ポリペプチドの分泌を媒介する前記異種配列が、蜜蜂メラチンリーダー配列である、請求項26に記載の組換えLefty誘導体ポリペプチド。

【請求項28】

請求項1～27の何れか1項に記載のLefty誘導体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組換えポリヌクレオチド。

【請求項29】

前記Lefty誘導体ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列に操作可能に結合したプロモーター配列を更に含む、請求項28に記載の組換えポリヌクレオチド。

【請求項30】

請求項29に記載の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項31】

哺乳動物細胞である、請求項30に記載の細胞。

【請求項32】

ヒト細胞である、請求項31に記載の細胞。

【請求項33】

組換えLefty誘導体ポリペプチドを製造する方法であって、

a) 請求項30に記載の細胞を、該組換えLefty誘導体ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養する工程；

b) このようにして発現された該組換えLefty誘導体ポリペプチドを回収する工程を包含する、方法。

【請求項34】

a) 第1のLeftyポリペプチド；及び

b) 第2のLeftyポリペプチド

を含み、

該第1及び第2のLeftyポリペプチドが複合体を形成するように会合し、該複合体が、ミオスタチン、Nodal及びGDF-11からなる群から選択されるTGF-ファミリーメンバーに結合する、単離されたLeftyポリペプチド複合体。

【請求項35】

前記ポリペプチド複合体がホモ二量体である、請求項34に記載のLeftyポリペプチド複合体。

【請求項36】

請求項1～26又は請求項34～35の何れか1項に記載の修飾されたLeftyポリペプチドを含む、薬学的製剤。

【請求項37】

in vivoでGDF-11及び/又はミオスタチンの活性を阻害する方法であって、有効量のLeftyポリペプチドを被験体に投与することを含む、方法。

【請求項38】

筋肉損失又は筋肉増殖不全に関連した障害を有する被験体を処置するための方法であって、Leftyポリペプチドを含む有効量の組成物を該被験体に投与することを含む、方法。

【請求項39】

前記被験体が、筋萎縮、ALS、及び筋肉消耗疾患から選択される状態を有する、請求

10

20

30

40

50

項38に記載の方法。

【請求項40】

前記筋肉消耗疾患が、悪液質、食欲不振、DMD症候群、BMD症候群、AIDS消耗症候群、筋ジストロフィー、神経筋疾患、運動ニューロン疾患、神経筋接合部の疾患、及び炎症性筋障害からなる群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

神経変性に関連した障害を有する被験体を処置するための方法であって、Leftyポリペプチドを含む有効量の組成物を該被験体に投与することを含む、方法。

【請求項42】

前記障害が、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病(HD)からなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

10

【請求項43】

in vitroでGDF-11及び/又はミオスタチンの活性を阻害するための方法であって、有効量のLeftyポリペプチドを該細胞に投与する工程を包含する、方法。

【請求項44】

被験体の体脂肪量を減少させる、又は体脂肪量の増加速度を低下させるための方法であって、該処置を必要とする被験体に有効量のLeftyポリペプチドを投与することを含む、方法。

【請求項45】

被験体の望ましくない体重増加に関連した障害を処置するための方法であって、該処置を必要とする被験体に有効量のLeftyポリペプチドを投与することを含む、方法。

20

【請求項46】

前記障害が、肥満症、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)、心血管系疾患、癌、高血圧、変形性関節症、卒中、呼吸障害、及び胆嚢疾患からなる群から選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記Leftyポリペプチドが、野生型Leftyポリペプチド又はその断片、組換えLefty誘導体ポリペプチド、及び二量体化Leftyポリペプチドから選択される、請求項37～46の何れか1項に記載の方法。

30

【請求項48】

筋肉組織の異常な量、発達又は代謝活性に関連した障害を処置する医薬品の製造のためのLeftyポリペプチドの使用。

【請求項49】

神経変性に関連した障害を処置する医薬品の製造のためのLeftyポリペプチドの使用。

【請求項50】

望ましくない体脂肪量に関連した障害を処置する医薬品の製造のためのLeftyポリペプチドの使用。

【請求項51】

前記障害が、肥満症及びインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)からなる群から選択される、請求項50に記載の使用。

40

【請求項52】

前記Leftyポリペプチドが、野生型Leftyポリペプチド又はその断片、組換えLefty誘導体ポリペプチド、及び二量体化Leftyポリペプチドから選択される、請求項48～51の何れか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

50

ミオスタチン、即ち、増殖／分化因子8（GDF-8）は、トランスフォーミング増殖因子-（TGF-）スーパーファミリーに属する（非特許文献1）。ヒトのミオスタチン遺伝子は、既にクローニングされている（非特許文献2）。ミオスタチンは、ヒト骨格筋の1型及び2型線維の両方に存在する。ミオスタチンは、骨格筋の増殖及び発達を負に調節する（非特許文献2）。

#### 【0002】

ミオスタチンノックアウトマウスは、野生型マウスよりも有意に大きく、骨格筋量が多く且つ広範囲に及んでいる（非特許文献1）。筋肉量の増大により特徴付けられる2品種の牛は、ミオスタチンコード配列内に突然変異を有する（非特許文献3）。免疫反応性ミオスタチンの血清及び筋内濃度は、健康なヒトよりも、筋肉消耗を伴うHIV感染のヒトにおいて増大しており、除脂肪量指数と逆相関している（非特許文献2）。最近、ミオスタチンに明らかな機能喪失型突然変異を伴うヒトの子供が同定された（非特許文献4）。この幼児は、骨格筋量が顕著に増大していた。総じて、これらのデータは、ミオスタチンがヒトの骨格筋増殖の負の調節因子であり、HIV感染のヒトにおける筋肉消耗の一因であるという遺伝学的及び生理学的証拠を示している。

10

#### 【0003】

上記の所見に鑑みて、特に例えば加齢、自己免疫不全症候群（AIDS）、多発性硬化症及び癌等の病態又は疾患状態により筋肉消耗を経験する個体において、ミオスタチン活性を調節する方法が必要とされている。更に、GDF-11は、ミオスタチンと密接に関連し、神経機能に関するタンパク質である。従って、ミオスタチンの調節因子は、GDF-11の調節だけでなく、神経プロセスの調節においても用途を見出す可能性がある。

20

#### 【0004】

本発明は、ミオスタチン及びGDF-11を含めたTGF- ファミリーメンバーにより媒介される、シグナル伝達に関連した種々の病態を有する個体の支援に使用される場合がある方法及び組成物を提供する。

20

【非特許文献1】McPherronら、Nature (1997) 387: 83-90

【非特許文献2】Nestorら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1998) 95: 14938-43

【非特許文献3】McPherronら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1997) 94: 12457-61

30

【非特許文献4】Schuelkeら、N Engl. J. Med. 2004 Jun 24; 350 (26): 2682-8

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

##### （発明の要旨）

本開示内容は、Lefthyポリペプチドの新たな用途を提供し、種々のLefthy誘導体ポリペプチドを提供する。一部において、本開示内容は、ミオスタチン及び／又はGDF-11の拮抗物質としてLefthyポリペプチドを使用する方法を提供する。従って、本開示内容は、筋肉又は神経機能に関連する障害の宿主の処置にLefthyポリペプチドを使用する方法を提供する。一部において、本開示内容は又、Nodal、ミオスタチン及び／又はGDF-11の阻害において機能的に重要となるLefthyポリペプチドの領域、並びにNodal、ミオスタチン及び／又はGDF-11の阻害に実質的な影響を与えることなく容易に修飾される場合がある領域も提供する。従って、本開示内容は、Nodal、ミオスタチン及び／又はGDF-11の拮抗物質機能を保持したLefthy誘導体ポリペプチドを提供する。Lefthy誘導体ポリペプチドは又、溶解性又は薬物動態の向上といった望ましい特徴を示す場合もある。

40

#### 【0006】

特定の態様において、本開示内容は、組換えLefthy誘導体ポリペプチドを提供する。Lefthy誘導体ポリペプチドは、天然のLefthyポリペプチドとの構造的及び機能

50

的関連性を有するが、マウス Lefty-1 及び Lefty-2 ポリペプチド又はヒト Lefty-A 又は Lefty-B ポリペプチドとは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。Lefty 誘導体ポリペプチドは、Nodal、ミオスタチン及び / 又は GDF-11 の 1 つ以上と結合する能力を保持する。より具体的には、Lefty タンパク質が 5 つの領域、即ち、領域 1 ~ 5 を含むと考えられる場合があることを示す。図 1 ~ 5 を参照されたい。一般的なシステインノット構造（主に一連の架橋されたシステイン残基により保持される）、並びに領域 2 及び領域 4 は、主に Nodal、ミオスタチン及び GDF-11 への Lefty の結合に関与することが予想される。領域 1、3 及び 5、並びに特に領域 1 及び領域 3 の C-末端部分は、全体として、結合には有意に関与しないことが予想され、従って、これらの領域は、Lefty タンパク質のアミノ酸配列修飾の魅力的な標的である。好ましくは、組換え Lefty 誘導体ポリペプチドは、生化学的結合試験又は細胞ベースの試験において、例えば ActRII 受容体、ミオスタチン、Nodal 及び / 又は GDF-11 等のタンパク質により媒介されるシグナル伝達を阻害するように選択される。

10

## 【0007】

特定の実施形態において、組換え Lefty 誘導体ポリペプチドは、化学式 - A - X - B - で示されるようなアミノ酸配列を含み、式中、A はヒト Lefty-A 又は Lefty-B の領域 2 の配列（それぞれ配列番号 5 及び配列番号 7）と少なくとも 85%、90%、95%、98% 又は 100% 同一のアミノ酸配列からなり；B は、ヒト Lefty-A 又は Lefty-B の領域 4 の配列（それぞれ配列番号 6 及び配列番号 8）と少なくとも 85%、90%、95%、98% 又は 100% 同一のアミノ酸配列からなる。Lefty-A の領域 2 は、配列 C R Q E M Y I D L Q G M K W A K N W V L E P P G F L A Y E C V G T（配列番号 5）を有する。Lefty-B の領域 2 は、配列 C R Q E M Y I D L Q G M K W A E N W V L E P P G F L A Y E C V G T（配列番号 7）を有する。Lefty-A の領域 4 は、配列 C I A S E T A S L P M I V S I K E G G R T R P Q V V S L P N M R V Q K C（配列番号 6）を有し、Lefty-B の領域 4 は、配列 C I A S E T D S L P M I V S I K E G G R T R P Q V V S L P N M R V Q K C（配列番号 8）を有する。

20

## 【0008】

組換え Lefty 誘導体ポリペプチドは、Nodal、ミオスタチン及び GDF-11 の 1 つ以上と、好ましくは  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  又は  $10^{-9}$  未満の  $K_D$  で結合するのが好ましい。X は、Lefty 誘導体ポリペプチドの機能的活性を維持するように選択する必要がなければ、0 個、1 個又は複数個のアミノ酸から構成される場合がある。X は、免疫原性の低いアミノ酸配列を含む場合がある。X は、翻訳後修飾、好ましくはグリコシリ化のための部位を含む場合がある。X は、500 個、400 個、300 個、200 個、100 個、50 個又は 25 個未満のアミノ酸である場合がある。X は、更なるドメイン、例えば二量体化ドメイン、Nodal、ミオスタチン及び / 又は GDF-11 に結合するドメイン、又は溶解性若しくは薬物動態の向上等の望ましい特性を別様でもたらすドメインを含む場合がある。

30

## 【0009】

組換え Lefty 誘導体ポリペプチドは、化学式 - A - X - B - の A 部分の N-末端であるアミノ酸を含む場合もあれば、含まない場合もあり、又、化学式 - A - X - B - の B 部分の C-末端であるアミノ酸を含む場合もあれば、含まない場合もある。従って、化学式 - A - X - B - の配列を含む Lefty 誘導体ポリペプチドは、場合による実施形態として、A の N-末端である配列、及び / 又は B の C-末端である配列を含むものとして理解されなければならない。これらの部分の具体的な言及が必要な場合は、このような領域が「W」及び「Y」と呼ばれる場合がある。従って、誘導体 Lefty ポリペプチドは、W - A - X - B、A - X - B - Y 又は W - A - X - B - Y として表される配列から本質的に構成される場合がある。W 及び Y の配列は、それらの配列が実際に含まれる場合、比較的制約を受けず、Lefty 誘導体ポリペプチドの望ましい機能的活性の何れかを保持す

40

50

るよう選択される。W及びYは、免疫原性の低いアミノ酸配列を含む場合がある。W及びYは、翻訳後修飾、好ましくはグリコシル化のための部位を含む場合がある。W及びYは、500個、400個、300個、200個、100個、50個又は25個未満のアミノ酸である場合がある。W及びYは、更なるドメイン、例えば二量体化ドメイン、Nod a1、ミオスタチン及び/又はGDF-11に結合するドメイン、又は溶解性若しくは薬物動態の向上等の望ましい特性を別様でもたらすドメインを含む場合がある。一実施形態において、Wは、Leftyタンパク質の最もN-末端のRXXRプロペプチド開裂部位の開裂後に得られる配列に対応する「長い」領域1の配列を含む。一実施形態において、Wは、第2のRXXRプロペプチド開裂部位の開裂後に得られる配列に対応する「短い」配列を含む。更なる実施形態において、Wは、幾つか又は全てのプロペプチド配列を含む場合があり、この場合、Wは一般的に、開裂が低減又は排除されるように第1及び/又は第2のRXXR開裂部位が改変されるように改変される。RXXR開裂部位を改変する好ましい方法は、RXXR部位の配列を改変するか、又は開裂部位を閉塞するグリコシル化を起こすか、又は別様で開裂を阻害する、グリコシル化のための部位を含める方法である。部分W、X又はYの何れも、天然のLeftyポリペプチド、特にヒトLefty A又はLefty Bの領域1、3又は5それぞれと少なくとも85%同一である場合があり、又、このような配列と少なくとも90%、95%、98%、99%又は100%同一である場合もある。

10

## 【0010】

組換えLefty誘導体ポリペプチドは、ヒトLeftyポリペプチドのシステインノット部分と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む場合がある。組換えLefty誘導体ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸22~353及び配列番号2のアミノ酸22~353からなる群から選択されるヒトLeftyポリペプチド配列と少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含む場合があり、この場合、RXXR開裂配列の一方又は両方は、改変された配列における開裂を防止するように改変される。

20

## 【0011】

本明細書に示す通り、第1のRXXR開裂部位又は第2のRXXR開裂部位から開始する成熟Lefty Aポリペプチド、及びそれらのN-又はC-末端Fc融合物は、ミオスタチン結合活性を有する。従って、組換えLeftyポリペプチドは、プロペプチド開裂部位とシステインノットドメイン開始部との間の、領域1に対応する配列の大きさに応じて、「長い」形態（例えば、34kDa形態）又は「短い」形態（例えば、28kDa形態）である場合がある。長い形態は、開裂を排除し、より長い形態を一貫して生成するように第2のRXXR開裂部位が改変されているLefty誘導体ポリペプチドである場合がある。長い形態は、細胞系内に第2のRXXR開裂部位を保持する配列の発現、又は開裂活性を欠いた培養条件により生成される場合もある。

30

## 【0012】

Lefty誘導体ポリペプチドは、翻訳後修飾のための1つ以上の部位を導入する配列改変を1つ以上含む場合がある。グリコシル化は、好ましい翻訳後修飾であり、このような修飾が、好ましくはLefty誘導体ポリペプチドの部分W、X又はYに配置される。

40

## 【0013】

上述の通り、Lefty誘導体ポリペプチドは、アミノ若しくはカルボキシ末端に、又は領域W、X若しくはYの何れかの中に融合した1つ以上の更なるドメインを含む場合がある。本明細書に記載の通り、Leftyは、二量体又は多量体形態の強力な拮抗物質であるため、更なるドメインは、二量体化又は多量体化ドメインである場合がある。又、プロペプチドはLefty二量体化を媒介する天然の機能を有することから、二量体化ドメインは、短い又は長い形態何れかのLeftyプロペプチド配列を含む場合がある。二量体化ドメインは、Fcドメインである場合がある。二量体化ドメインは、免疫グロブリンFab定常ドメインを含む場合があり、Fab定常ドメインは、例えば免疫グロブリン重鎖定常領域、及び免疫グロブリン軽鎖定常領域から選択される場合がある。例えばロイシンジッパードメイン等のようなその他の二量体化又は多量体化ドメインが選択される場合

50

がある。ロイシンジッパードメインは、少なくとも4つのロイシンヘプタドを含む場合があり、例えばF o s又はJ u nロイシンジッパードメインである場合がある。何れかのL e f t yアミノ酸配列と何れかの更なるドメイン(1つ又は複数)の間に、アミノ酸リンカーを介在させる場合がある。更なるドメインは、N o d a 1、ミオスタチン及び/又はG D F - 1 1に結合して、好ましくはこれらを阻害するドメインである場合がある。例えば、L e f t yは、B M Pタンパク質のI I型受容体結合部位を遮断することが予想されることから、I型受容体(例えば、A L K 4又はA L K 7)結合部位を遮断する第2のドメインは、L e f t y分子の拮抗特性を改善するのに有用であると思われる。N o d a 1、ミオスタチン及び/又はG D F - 1 1とA L K 4又はA L K 7との結合を競合的に阻害するドメインは、例えば、(a) A L K 4の細胞外部分；(b) A L K 7の細胞外部分；(c) N o d a 1、ミオスタチン及び/又はG D F - 1 1を結合する抗体の抗原結合部分；並びに(d) N o d a 1、ミオスタチン及び/又はG D F - 1 1に結合するように選択されたランダム化ポリペプチドである場合がある。

10

## 【0014】

特定の態様において、組換えL e f t y誘導体ポリペプチドは、例えば蜜蜂メラチンリーダー配列のような、組換えL e f t y誘導体ポリペプチドの分泌を媒介する異種配列を含む。

20

## 【0015】

本開示内容は更に、本明細書に開示したL e f t y誘導体ポリペプチドをコードする又クレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドも提供する。組換えポリヌクレオチドは、L e f t y誘導体ポリペプチドをコードする又クレオチド配列に操作可能に結合したプロモーター配列を含む場合がある。このような核酸は、例えば哺乳動物細胞(例えば、ヒト又はC H O細胞)等の細胞内に導入される場合がある。このような細胞は、組換えL e f t y誘導体ポリペプチドを製造する方法であって、a)組換えL e f t y誘導体ポリペプチドをコードする細胞を、該組換えL e f t y誘導体ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養して；b)このようにして発現された組換えL e f t y誘導体ポリペプチドを回収することを含む方法で、使用される場合がある。

20

## 【0016】

上述の通り、L e f t yは、二量体又は多量体形態の強力な拮抗物質として作用することが現在予想されている。このため、第1のL e f t yポリペプチド及び第2のL e f t yポリペプチドを含み、第1及び第2のL e f t yポリペプチドが複合体を形成するようには会合し、複合体が、ミオスタチン、N o d a 1及びG D F - 1 1からなる群から選択されるT G F - ファミリーメンバーに結合する、単離されたL e f t yポリペプチド複合体が調製される場合がある。L e f t yポリペプチド複合体は、ヘテロ二量体(若しくは多量体)又はホモ二量体(若しくは多量体)である場合がある。

30

## 【0017】

特定の態様において、本開示内容は、種々のL e f t y誘導体又は二量体L e f t yポリペプチドの何れかを含む薬学的製剤を提供する。

## 【0018】

特定の態様において、本開示内容は、本明細書に開示したL e f t y誘導体ポリペプチドを含むL e f t yポリペプチドの新たな使用を提供する。一実施形態において、本開示内容は、筋肉損失又は筋肉増殖不全に関連した障害を有する被験体を処置する方法であって、L e f t yポリペプチドを含む有効量の組成物を被験体に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態において、本開示内容は、神経変性に関連した障害を処置する方法であって、L e f t yポリペプチドを含む有効量の組成物を被験体に投与することを含む方法を提供する。更なる実施形態において、L e f t yポリペプチドは、体重減少を促進し、体脂肪量又は体重に関連した障害、例えば肥満症及びI I型糖尿病を処置するのに使用される場合がある。特定の実施形態において、L e f t yポリペプチドは、i n v i t r o又はi n v i v oでN o d a 1、ミオスタチン及び/又はG D F - 1 1に結合し、及び/又はこれらの活性を阻害するのに使用される場合がある。L e f t yポリペプ

40

50

チドは、野生型 L e f t y ポリペプチド又はその断片、組換え L e f t y 誘導体ポリペプチド、並びに二量体化 L e f t y ポリペプチドである場合がある。

### 【0019】

本開示内容は更に、筋肉組織の異常な量、発達若しくは代謝活性に関連した障害、又は神経変性に関連した障害、又は体脂肪量若しくは体重に関連した障害を処置する医薬品の製造への L e f t y ポリペプチドの使用も提供する。

### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0020】

##### (発明の詳細な説明)

###### 1. 概要

本開示内容は、 L e f t y タンパク質が、 N o d a 1 だけでなく G D F - 1 1 に結合するという発見に関する。ミオスタチンと G D F - 1 1 の間の配列保存を考慮すると、 L e f t y タンパク質は、ミオスタチン及び G D F - 1 1 の両方に結合して、これらを阻害することが予想される。本開示内容は又、 L e f t y タンパク質が二量体化又は多量体化した場合に、有力な結合剤なるという驚くべき洞察にも関する。従って、本開示内容は、 L e f t y ポリペプチド、並びに二量体又は多量体を形成する融合タンパク質を提供する。更に、本開示内容は、 N o d a 1 、ミオスタチン及び / 又は G D F - 1 1 を阻害する能力を保持する場合がある L e f t y 誘導体を得る際に修飾される場合がある種々の L e f t y ポリペプチドの領域を提供する。このような誘導体は、例えばタンパク質発現の向上、溶解性の向上、表面に対する非特異的な吸収傾向の低下(「取扱い」の向上)、血清半減期の改善、組織分布の改善、及び免疫原性の低下を含めた、1つ以上の望ましい特徴を示す場合がある。

10

20

30

30

### 【0021】

マウス L e f t y - 1 及び L e f t y - 2 遺伝子は、左右( L R )の解剖学的差が現れる前に、非対称的に発現される( M e n o C ら、 1 9 9 6 , N a t u r e 3 8 1 : 1 5 1 - 1 5 5 ; M e n o C ら、 1 9 9 7 , G e n e s C e l l s 2 : 5 1 3 - 5 2 4 ; M e n o C ら、 1 9 9 8 , C e l l , 9 4 : 2 8 7 - 2 9 7 )。何れも、胚の左側の底板内及び側板中胚葉内に発現し； L e f t y - 2 は、底板内よりも側板中胚葉内でより強力に発現するのに対して、 L e f t y - 1 はこれと逆になる。

2 つのヒト L e f t y タンパク質である L e f t y - A 及び L e f t y - B は、マウスタンパク質と相同であることが同定されている( K o s a k i ら、 1 9 9 9 , A m J H u m G e n e t , 6 4 : 7 1 2 - 7 2 1 )。ヒトにおいて、 L e f t y - A の 2 つの突然変異は、左右軸形成異常に関連する。 L e f t y - A は又、 E b a f ( 子宮内膜出血関連因子 ) とも呼ばれる( K o t h a p a l l i ら、 1 9 9 7 , J C l i n I n v e s t , 9 9 : 2 3 4 2 - 2 3 5 0 )。ヒト L e f t y - A 及び L e f t y - B は、アミノ酸配列において 9 6 % 同一である。マウス L e f t y - 1 及び L e f t y - 2 は、アミノ酸配列において 9 0 % 同一である。ヒト L e f t y - A は、各マウス L e f t y タンパク質と 8 1 % 同一であり、ヒト L e f t y - B は、各マウス L e f t y タンパク質と 8 2 % 同一である。

30

40

マウス L e f t y - 1 及び L e f t y - 2 遺伝子は、左右( L R )の解剖学的差が現れる前に、非対称的に発現される( M e n o C ら、 1 9 9 6 , N a t u r e 3 8 1 : 1 5 1 - 1 5 5 ; M e n o C ら、 1 9 9 7 , G e n e s C e l l s 2 : 5 1 3 - 5 2 4 ; M e n o C ら、 1 9 9 8 , C e l l , 9 4 : 2 8 7 - 2 9 7 )。何れも、胚の左側の底板内及び側板中胚葉内に発現し； L e f t y - 2 は、底板内よりも側板中胚葉内でより強力に発現するのに対して、 L e f t y - 1 はこれと逆になる。2 つのヒト L e f t y タンパク質である L e f t y - A 及び L e f t y - B は、マウスタンパク質と相同であることが同定されている( K o s a k i ら、 1 9 9 9 , A m J H u m G e n e t , 6 4 : 7 1 2 - 7 2 1 )。ヒトにおいて、 L e f t y - A の 2 つの突然変異は、左右軸形成異常に関連する。 L e f t y - A は又、 E b a f ( 子宮内膜出血関連因子 ) とも呼ばれる( K o t h a p a l l i ら、 1 9 9 7 , J C l i n I n v e s t , 9 9 : 2 3 4 2 - 2 3 5 0 )。ヒト L e f t y - A 及び L e f t y - B は、アミノ酸配列において 9 6 % 同一である。マウス L e f t y - 1 及び L e f t y - 2 は、アミノ酸配列において 9 0 % 同一である。ヒト L e f t y - A は、各マウス L e f t y タンパク質と 8 1 % 同一であり、ヒト L e f t y - B は、各マウス L e f t y タンパク質と 8 2 % 同一である。

### 【0022】

T G F - ファミリーメンバーは、一般的にプレプロタンパク質としてコードされる。これらのタンパク質では、分泌と開裂が行われてシグナル配列が除去され、更に二塩基性又は R X X R 部位にて開裂して、成熟カルボキシ末端部分とアミノ末端プロペプチド領域の間のペプチド結合が破断する。 L e f t y タンパク質は、カルボキシ末端成熟タンパク質を放出する開裂部位を、推定では 1 つではなく 2 つ有しており、細胞培養物中に L e f t y の開裂形態が複数見出される。本明細書に示す通り、成熟 L e f t y の長い( 3 4 k D a ) 及び短い( 2 8 k D a ) 形態は何れも、特定の鍵となる活性を保持する。 T G F - ファミリーメンバーの中でも、プロペプチドは、異なる機能的属性を有する。プロペプチド部分は、開裂時に放出されて、更なる機能的役割を果たさない場合もあれば、成熟タンパク質と会合して、一般的には成熟部分の生体適合性を向上させる、及び / 又は成熟部

40

50

分の活性を阻害する場合もある。Lefty プロペプチドの役割は、現在のところ提案されていない。しかし、本開示内容を鑑みると、Lefty ポリペプチドのプロペプチド領域は、生理学的条件において、成熟部分と会合して、二量体の形成を媒介する場合があることが予想される。

【0023】

TGF- ファミリーメンバーの成熟部分は一般的に、保存システインノット構造を含む。この構造を、解明された BMP-7 の構造から推定して、図 1 に示す。システインノットは、ループ 1 及びループ 2 と呼ばれる、II 型受容体結合に関与する 2 つのループを含む。第三の領域は、I 型受容体結合に関与するアミノ酸、-ヘリックス、並びにホモ又はヘテロ二量体の形成及びこのような二量体の共有結合安定化に通常必須となる保存システインを含む (Thisse Cら、1999, Development, 126: 229-240; Meno Cら、1996, Nature 381: 151-155; Meno Cら、1997, Genes Cells 2: 513-524)。通常の場合、TGF- リガンドと I 型及び II 型受容体との結合によって、標準的な TGF- シグナル伝達経路が活性化され、これは一般的に 1 つ以上の SMAD タンパク質の活性化により特徴付けられる。Lefty タンパク質は、TGF- ファミリーの非定型メンバーである。他の殆どの TGF- ファミリーメンバーとは異なり、Lefty タンパク質は、-ヘリックス、及び二量体化を媒介する保存システインを有さない。そのため、発表されている殆どの報告では、Lefty タンパク質が単量体であると記載されている (例えば、Sakuma ら、2002 を参照)。従って、Lefty タンパク質が二量体形態の標的分子に結合し、天然において二量体構造の生理学的役割を果たす場合があるという本開示内容の洞察は驚くべきものである。

10

20

30

40

50

【0024】

TGF- ファミリーのメンバーは数多くが、標準的な TGF- 受容体リガンドシグナル伝達経路の拮抗物質として作用する。拮抗物質の Dan ファミリーは、保存システインノットドメインを有する。これらのタンパク質は二量体化して、TGF- ファミリーの標的リガンドに結合し、そのリガンドにより媒介されるシグナル伝達を阻害する。別の拮抗物質である Noggin も同様に機能する。これらの拮抗物質を本明細書では「トラップ」と呼ぶ。

【0025】

Lefty は拮抗物質としても作用する。遺伝学的証拠では、Lefty が Nodal の拮抗物質として機能することが示唆されている。胚のパターン形成において、Lefty は Nodal 活性の範囲及び持続時間を制限すると考えられている (例えば、Meno C ら、1999, Mol Cell, 4: 287-298)。Lefty により誘導される Nodal シグナル伝達の阻害は、過剰な ActRIIA 又は ActRIIB により救済されており、Lefty が、共通する受容体である ActRIIA 又は ActRIIB への競合的結合を介して Nodal シグナル伝達に拮抗することが示唆されている (Sakuma ら、2002, Genes Cells 7: 401-412)。この拮抗作用様式は、Lefty の推定される単量体的性質と一致しており、「トラップ」タンパク質において提案される機序とは異なる拮抗作用のモデルを示す。1 つの報告書では、Lefty が Nodal に直接結合することが報告されている (Chen and Shen, 2004, Curr. Biol. 14: 618-624)。

【0026】

本開示内容では、Lefty が TGF- ファミリーの多数のリガンドに直接結合して、これらと拮抗し、これを二量体として行う場合があるという発見を報告する。従って、本開示内容は、Nodal、ミオスタチン (GDF-8) 及び / 又は GDF-11 の機能を阻害する Lefty ポリペプチドを提供する。本開示内容は更に、Nodal、ミオスタチン及び / 又は GDF-11 を阻害する能力を保持する天然の Lefty ポリペプチドの変異体及び断片である、Lefty ポリペプチド誘導体を提供する。このような誘導体の例には、Lefty の N-末端切断バージョン、領域 1、3 及び 5 の何れか又は全てに

改変を含む L e f t y ポリペプチド（図 1～4 を参照）、L e f t y のグリコシル化（又はその他の翻訳後修飾）形態、並びに本明細書に開示する種々の L e f t y ポリペプチドの何れかを含む融合タンパク質を含む。これらのいわゆる「L e f t y 誘導体」は、N o d a 1、ミオスタチン及び／又は G D F - 1 1 活性の望ましくないレベルにより少なくとも部分的に特徴付けられる病態の重症度を軽減するのに使用してもよい。例えば、本開示内容に記載の薬学的製剤は、神経又は筋肉機能に関連した種々の障害を予防若しくは回復する、又はこれらの重症度を軽減するのに有効な量で投与してもよい。

#### 【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される用語は一般的に、本開示内容の文脈、及び各用語が使用される特定の文脈において、当該技術分野で通常使用される意味を有する。本開示内容の組成物及び方法並びにそれらの製造及び使用方法を実践者が説明するに当たっての更なる手引きとして、特定の用語を以下又は本明細書の他の箇所で考察する。用語の任意の使用の範囲及び意味は、該用語が使用される特定の文脈から明らかとなるであろう。

10

#### 【 0 0 2 8 】

「約」及び「およそ」とは一般的に、測定の性質又は精度を鑑みて、測定された量で許容される誤差の程度を意味するものとする。一般的に、代表的な誤差の程度は、所定の値又は値の範囲の 20 パーセント（%）以内、好ましくは 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内である。

#### 【 0 0 2 9 】

或いは、特に生体系において、「約」及び「およそ」という用語は、所定の値の 1 オーダー以内、好ましくは 5 倍以内、より好ましくは 2 倍以内の値を意味する場合がある。本明細書に示される数多くの数量は、特に指示がない限り近似値であり、明示的な記載がなくても「約」又は「およそ」の用語を想定してもよいことを意味する。

20

#### 【 0 0 3 0 】

本開示内容の方法は、1 つ以上の突然変異／配列変異体の野生型配列を含めた、互いの配列を比較する手順を含む場合がある。このような比較は一般的に、例えば当該技術分野で周知の配列アラインメントプログラム及び／又はアルゴリズム（例えば、数例を挙げると B L A S T 、 F A S T A 及び M E G A L I G N ）を使用して、ポリマー配列をアラインすることを含む。当業者であれば、このようなアラインメントにおいて、突然変異が残基の挿入又は削除を含む場合に、配列アラインメントでは、挿入又は削除された残基を含まないポリマー配列内に、「ギャップ」（通常、ダッシュ又は「A」で表される）を導入することを容易に理解することができる。

30

#### 【 0 0 3 1 】

「相同」とは、同じ生物種内のスーパーファミリーに由来するタンパク質、並びに異なる生物種に由来する相同タンパク質を含めた、共通する進化的起源を有する 2 つのタンパク質又は核酸の間の関係を指す。このようなタンパク質（及びそれらをコードする核酸）は、同一性パーセント、又は特定の残基若しくはモチーフ及び保存された位置の存在の何れかの点から、それらの配列類似性により反映される配列相同性を有する。

#### 【 0 0 3 2 】

「配列類似性」という用語は、共通する進化的起源を共有する場合もあれば、共有しない場合もある核酸又はアミノ酸配列間の同一性又は一致の程度を指す。

40

#### 【 0 0 3 3 】

核酸分子は、温度及び溶液イオン強度の適切な条件下で、核酸分子の一本鎖形態が他の核酸分子に対してアニールできる場合、別の核酸分子、例えば c D N A 、ゲノム D N A 、又は R N A に「ハイブリダイズ可能」である（ S a m b r o o k ら、 M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n ( 1 9 8 9 ) C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . を参照）。温度及びイオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「ストリンジエンシー」を決定する。相同核酸の予備スクリーニングでは、55 の T<sub>m</sub>（融点）に対応する低ストリン

50

ジェンシーのハイブリダイゼーション条件（例えば、 $5 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS、0.25% ミルク、及びホルムアミドなし；又は30% ホルムアミド、 $5 \times \text{SSC}$ 、0.5% SDS）を使用してもよい。

【0034】

中ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、より高い $T_m$ に対応する（例えば、40% ホルムアミド、 $5 \times$  又は  $6 \times \text{SSC}$ ）。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、最高の $T_m$ に対応する（例えば、50% ホルムアミド、 $5 \times$  又は  $6 \times \text{SSC}$ ）。SSCは、0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸Naである。

【0035】

「高ストリンジェンシー条件」とは、構造的に関連するが、構造的に異種ではない核酸のハイブリダイゼーションが可能なハイブリダイゼーション条件を包含するものとして理解される。「ストリンジェンシー」という用語は、高い相補性を有する核酸のみアニーリングが可能な、幾つかの代替となるハイブリダイゼーション及び洗浄条件の何れかを説明するものとして当業者により理解される、当該技術分野の用語である。

【0036】

代表的な高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、約1Mの塩中で形成されるDNA二重鎖の融点（ $T_m$ ）よりも約20～27低い温度に相当する。同等な手順は数多く存在しており、幾つかの著名な分子クローニングの手引き書において、ストリンジェントなハイブリダイゼーションに好適な条件が解説されおり、更にこれらの条件下で安定していると予想されるハイブリッドの長さの計算式も示されている（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6 or 13.3.6；又はSambrook, et al. (1989) Molecular Cloning, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, pages 9.47-9.57を参照）。

【0037】

ハイブリダイゼーションでは、2つの核酸が相補的な配列を含むことが必要とされているが、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに応じて、塩基の不一致も許容される。核酸のハイブリダイズに適切なストリンジェンシーは、当該技術分野で周知の変数である、核酸の長さ及び相補性の程度により異なる。2つのヌクレオチド配列間の類似性又は相同性が大きいほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドの $T_m$ 値も大きくなる。（より高い $T_m$ に対応する）核酸ハイブリダイゼーションの相対的な安定性は、以下の順に低くなる：RNA：RNA、DNA：RNA、DNA：DNA。100ヌクレオチド長を超えるハイブリッドに関しては、 $T_m$ の計算式が導き出されている（Sambrookら、supra, 9.51を参照）。より短い核酸、即ちオリゴヌクレオチドを使用したハイブリダイゼーションの場合には、不一致の位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（Sambrookら、supra, 11.8を参照）。ハイブリダイズ可能な核酸の最小長さは、少なくとも約10ヌクレオチド；好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド；より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドである。

【0038】

指示がない限り、「標準的なハイブリダイゼーション条件」という用語は、約55の $T_m$ を指し、上述のような条件を使用する。好ましい実施形態において、 $T_m$ は60にてあり；より好ましい実施形態において、 $T_m$ は65にてある。特定の実施形態において、「高ストリンジェンシー」とは、0.2×SSC中68の、又は50% ホルムアミド、 $4 \times \text{SSC}$ 中42のハイブリダイゼーション及び／若しくは洗浄条件、又はこれら2つの何れかの条件下で観察されるものと等価のハイブリダイゼーションレベルが得られる条件を指す。

【0039】

オリゴヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー）に好適な

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション条件は、オリゴヌクレオチドの融点がより低いため、一般的には完全長の核酸（例えば、完全長 c D N A ）と幾分異なる。オリゴヌクレオチドの融点は、関与するオリゴヌクレオチド配列の長さにより異なるため、好適なハイブリダイゼーション温度は、使用するオリゴヌクレオチド分子により異なる。代表的な温度は、37（14塩基オリゴヌクレオチドの場合）、48（17塩基オリゴヌクレオチドの場合）、55（20塩基オリゴヌクレオチドの場合）及び60（23塩基オリゴヌクレオチドの場合）である場合がある。オリゴヌクレオチドに適切な代表的なハイブリダイゼーション条件には、6×S S C、0.05%ピロリン酸ナトリウム中の洗浄、又は等価なハイブリダイゼーションレベルが得られるその他の条件が含まれる。

【0040】

10

酵素を含むタンパク質又はポリペプチドは、これらが天然に生じることを意味する「天然」若しくは「野生型」である場合もあれば；これらが予め製造、改変、誘導されているか、又は天然のタンパク質若しくは別の突然変異とは何らかの点で異なるか、若しくはこれらから変化していることを意味する「突然変異」、「変異体」、若しくは「修飾体」である場合もある。

【0041】

「L e f t y タンパク質」又は「L e f t y ポリペプチド」とは、例えばマウスL e f t y タンパク質又はヒトL e f t y タンパク質等の哺乳動物L e f t y タンパク質、及び何れかのL e f t y 誘導体を含めた、哺乳動物L e f t y タンパク質の配列相同性及び機能的属性を共有するその他のタンパク質を指す。L e f t y タンパク質の代表的なアミノ酸配列には以下が含まれる。

20

【0042】

マウスL e f t y - 1タンパク質 ( N C B I R e f S e q I D N P \_ 0 3 4 2 2 4 ) (配列番号3) :

【0043】

【化1】

```

1 mpf1wlcw1 walslvs1re altgeqilgs llqqlql1dqp pvldkadveg
mvipshvrtq
61 yvallqghsha srsrgkrf1sq nlrevagrfl vsetsthllv fgmeqrlppn
selvqav1rl
121 fqepvprt1al rrqkrlsphs ararvtiewl rfrddgsnrt alidsrlvsi
hesgwkafdv
181 teavnfwqql srprqp1llq vsvqreh1gp gtwsshklvr faaqgtpdgk
gggepqlelh
241 tldlkdygaq gn1cdpeapvt egtrccrqem yldlqgmkwa enwileppgf
ltyecvgsc1
301 qlpesltsrw pflgprqcva semts1pmiv svkeggrtrp qvvslpnmrw
qtcscasdg1
361 liprr1lqp

```

30

マウスL e f t y - 2タンパク質 ( N C B I R e f S e q I D N P \_ 7 9 6 0 7 3 ) (配列番号4) :

【0044】

40

【化2】

```

1 mks1wlcw1 wvlplagpg1 amteeqv1ss llqqlql1sqa ptldsadvee
maipthvrsq
61 yvallqgghsha drsrgkrf1sq nfrevagrfl msetsthllv fgmeqrlppn
selvqav1rl
121 fqepvprt1al rrfer1sphs ararvtiewl rvredgsnrt alidsrlvsi
hesgwkafdv
181 teavnfwqql srprqp1llq vsvqreh1gp gtw1ahklvr faaqgtpdgk
gggepqlelh
241 t1dlkdygaq gn1cdpevpvt egtrccrqem yldlqgmkwa enwileppgf
ltyecvgsc1
301 qlpesltigw pflgprqcva semts1pmiv svkeggrtrp qvvslpnmrw
qtcscasdg1
361 liprgidl

```

50

ヒト L e f t y - A タンパク質 ( N C B I R e f S e q I D N P \_ 0 0 3 2 3 1 ) ( 配列番号 1 ) :

【 0 0 4 5 】

【 化 3 】

1 mwplwlctal wvlplagpgal alteeqlrlgs llrqlqlsev pvltradmek  
lvipahvraq  
61 yvvllrrshg drsrgkrfsq sfrevagrfl aseasthllv fgmeqrlppn  
selvqavrlrl  
121 fgepvpkaal hrhgrlsprs aqarvtvewl rvrddgsnrt slidsrlvsv  
hesgwkafdv  
181 teavnfwqql srprqplllq vsvqrehlgp lasgahklvr fasqgapagl  
gepqlelhtl  
241 dlrdygaqgd cdpeapmteg trccrqemyi dlqqmkwakn wvleppgfla  
yecvgtcqgp  
301 pealafnwpf lgprqciase taslpmivsi keggrtrpqv vslpnmrvqk  
cscasdgalv  
361 prrlqp

10

R X X R 開裂部位には、下線が引いてある。システィンノットドメインには、二重下線が引いてある。

【 0 0 4 6 】

ヒト L e f t y - B タンパク質 ( N C B I R e f S e q I D N P \_ 0 6 6 2 7 7 ) ( 配列番号 2 ) :

【 0 0 4 7 】

20

【 化 4 】

1 mgplwlctal wvlplaspgal altgeqlrlgs llrqlqlkev ptldradmee  
lvipthvraq  
61 yvallqrshg drsrgkrfsq sfrevagrfl aleasthllv fgmeqrlppn  
selvqavrlrl  
121 fgepvpkaal hrhgrlsprs ararvtvewl rvrddgsnrt slidsrlvsv  
hesgwkafdv  
181 teavnfwqql srprqplllq vsvqrehlgp lasgahklvr fasqgapagl  
gepqlelhtl  
241 dldygaqgd cdpeapmteg trccrqemyi dlqqmkwaen wvleppgfla  
yecvgtcrqp  
301 pealafkwpf lgprqciase tdslp*mivsi* keggrtrpqv vslpnmrvqk  
cscasdgalv  
361 prrlqp

30

R X X R 開裂部位には、下線が引いてある。システィンノットドメインには、二重下線が引いてある。

【 0 0 4 8 】

マウス L e f t y - 1 c D N A ( N C B I R e f S e q I D N M \_ 0 1 0 0 9  
4 ) ( 配列番号 1 3 ) :

【 0 0 4 9 】

## 【化5】

1 aggacaccc agggacacac acatccaagg ctccctttcc cggacagcac  
 catgccatc  
 61 ctgtggctct gctggcact ctggcactg tcgctggta gcctcaggga  
 agccctgacc  
 121 ggagagcaga tcctggcag cctgctgaa cagctgcagc tcgatcaacc  
 gccagtcctg  
 181 gacaaggctg atgtgaaagg gatggtcatac ccctgcacg tgaggactca  
 gtatgtggcc  
 241 ctgctacaac acagccatgc cagccgtcc cgaaggaaaga qgttcagcca  
 gaacccctcgaa  
 301 gaggtggcag gcagggtcct ggtgtcagag acctccactc acctgctagt  
 gttcggaaatg  
 361 gacgacggc tgccgcctaa cagcagactg gtgcaggctg tgctgcggct  
 gttccaggag  
 421 cctgtgccccaa gaacagctct cccggaggaa aagaggctgt ccccacacag  
 tgcccggtct  
 481 cgggtcacca ttgaatggct ggcgttccgc gacgacggct ccaaccgcac  
 tgccttatac  
 541 gattctaggg tctgtccat ccacgagac ggctgaaagg ctttcgacgt  
 gaccgaggcc  
 601 gtgaacttctt ggcagcagct gagccggccg aggccggcc tgcgtctcca  
 ggtgtcggtg  
 661 cagagggagc atctggggcc gggAACCTGG agtcacaca agttggttcg  
 ttccggcg  
 721 caggggacgc cggatggcaa gggcaggcc gagccacagc tggagctgca  
 cacgctggac  
 781 ctcaaggact atggagctca aggcaattgt gaccccgagg caccagtac  
 tgaaggcacc  
 841 cgatgctgtc gccaggagat gtacctggac ctgcaggga tgaagtggcc  
 cgagaactgg  
 901 atccctagaac cgcgggtt cctgacatat gaatgtgtgg gcagctgcct  
 gcagctaccg  
 961 gagtcctga ccagcagggt gccatttctg gggcctggc agtgtgtcgc  
 ctcaagatgt  
 1021 acctccctgc ccatgattgt cagcgtgaag gagggaggca ggaccaggcc  
 tcaagtggtc  
 1081 agcctgccccaa acatgagggt gcagacgtt agctgcgcct cagatggggc  
 gtcataaccc  
 1141 aggaggctgc agccatagggc gccccgggtgt gttccccaa ggatgtgcct  
 ttcatgcaaa  
 1201 tctgaagtgc tcattatact gggagagctg gggattctaa ctccctaaatg  
 ggcaatccct  
 1261 gtgtgtgctc tttgtttctt ctgaagttagc ctcatcccta aatttttacc  
 ttcgaggaaat  
 1321 gtgactcgct ggcgggtggc ggcgtctga cccagtggtc tctgtcccttc  
 atattgttca  
 1381 ctgcactgtt tgcgaagcac ttacatgtat agatactgca aaccaaggac  
 agaatccccaa  
 1441 attgccattt ttcccttaat ttgtcgctga atctgggtcg agtcccagtc  
 ttgactctgg  
 1501 acctaagcca caagttggc aaacatgtcc aacctaggca atactggctt  
 tgcttagatgt  
 1561 gaataaaaata tgctttgttt tgt

10

20

30

40

マウス L e f t y - 2 c D N A ( N C B I R e f S e q I D N M \_ 1 7 7 0 9

9 ) ( 配列番号 14 ) :

【 0 0 5 0 】

## 【化6】

1 gtcccaagaa ctttcaggg cacttttagg gacgcataata tccacgattc  
 ctcctggca  
 61 ggcgcattgaa gtccctgtgg ctttgctggg cactctgggt actgcccctg  
 gctggccctg  
 121 gggcagcgat gaccgaggaa caggtcctga gcagtctact gcagcagctg  
 cagctcagcc  
 181 aggcccccac cctggacagc gcggatgtgg aggagatggc catccctacc  
 cacgtgaggt  
 241 cccagttatgt ggccctgctg cagggaaagtc acgctgaccg ctcccggaggc  
 aagaggttca  
 301 gccagaattt tcgagaggtg gcaggcaggt tcctgatgtc agagacctcc  
 actcacctgc  
 361 tagtgttgg aatggagcg cggctgccgc ctaacagcga gctggtgcag  
 gctgtgctgc  
 421 ggctgttcca ggagcctgtg cccagaacag ctctccggag gtttgagagg  
 ctgtccccac  
 481 acagtccccg ggctcgggtc accattgaat ggctgagagt cctgaggat  
 ggctccaatc  
 541 gcactgcct catcgactt aggctcggt ccattccacga gagcggctgg  
 aaggccttcg  
 601 acgtgaccga ggccgtgaac ttctggcagc agctgagccg gccgaggcag  
 ccgtgtc  
 661 tccaggtgtc ggtgcagagg gacatctgg ggccggggac ctggagcga  
 cacaagttgg  
 721 tccgtttcgc ggcgcagggg acgccccacg gcaagggca gggcgagcca  
 cagctggc  
 781 tgcacacgct ggacctaag gactacggag ctcaaggcaa ttgtgacccc  
 gaggttaccag  
 841 tgactgaagg cacccatgc tgcgtccagg agatgtaccc ggacctgcag  
 gggatgaagt  
 901 gggccgagaa ctggatccta gaaccgcag ggttcctgac gtatgaatgt  
 gtgggcagct  
 961 gcctgcagct accagatcc ctgaccatcg gggtggccatt tctggggcct  
 cggcagtgtg  
 1021 ttgcctcaga gatgaccccttgc ttgcctcatgttgcgtgttgcgtgt  
 ggcaggacca  
 1081 ggctcaagt ggtcagctg cccaaatgtt ggggcagac ctgtacgtgc  
 gcctcagatg  
 1141 gggcgctcat acccaggggg atagatctgt agtctccctg tccacagatg  
 tatttcgt  
 1201 gagcttgcgtcc taacttagtg ctctcgatgttgc acctttgttgc  
 tttttttgt  
 1261 ccatcacccca gtttaagcac ttacatgggt aaatcatgtc actccagtag  
 gacacactga  
 1321 cccacttag ccaaggacat ggctatgcag tgaacaggtt cgcacatgt  
 tctgtttct  
 1381 ggccagaact cagcttaatg tacaacaaaa ccctacggtg agaacagggg  
 aatcaaaaagc  
 1441 tcgtttactc ttacaccgtt attactggca tcaacgttacc atgtcaggaa  
 ctgccccacag

10

20

30

## 【0051】

## 【化7】

1501 caggctggga gggagacato tcagaagcct gcggcagctc ctgtgaaaa  
 acogttgttc  
 1561 ccatttctcc taaccttagc octagacaag agctgtatag atttcatgtg  
 tgtgactgct  
 1621 tttcagttgg ctttgggttt catagttattt ctatattattt tgactttcct  
 actcctttct  
 1681 ctttctgccc tggtaattc tatgaaacta gatgttcctt gatgtaatga  
 ttcttaaaca  
 1741 attaaaaagt tgaggcatgg gacacagcac agcacagtcc tgatggccca  
 ggtgcatgct  
 1801 gtagatgtat tctgtgtgtc ttatcttgg aaacaatgca ataactttgc  
 aatgttagtt 10  
 1861 cagattaatg ttgacttgc aaagaaagt tgaagaatt attagaaagt  
 gaaatagagc  
 1921 caacactggg atcccgaaaa gaaaaaaagct attgaagtta taaaataagt  
 tttgcacaaa  
 1981 atttgagagt gtttcttggta taagcaagta tagaatacat aaaaatcttat  
 atttagaaaa  
 2041 ctaagccaaa acaccggac tcttaggagg gtcactgctg gcaatgtgca  
 gaagcagaaa  
 2101 gctggcagaa ctggcagtt aagggtgtac ctgagtcctt ctggccattt  
 cctggcagct  
 2161 ttgcccattgt catttattgt cagagcttca cgggaaaaatg caagtagccg  
 acttccggc  
 2221 tctgagctt ggagtataat aagtcaaaaag gtaaagtta aataatgata  
 agtttgcatt 20  
 2281 aatttattttt ttggccagag gcctggaaat agggaaagct tgaaactctg  
 ggggaacaat  
 2341 tataattctt gattcttgcgt tgatgtggg tattgttttgcatttgcattt  
 ggcaacgatt  
 2401 atacaatgtc ttttttcctt atctgcattt ggagtatcaa taaaagactg  
 gggcaagaga  
 2461 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaa  
 2521 aaaaaaaaaa aaaa

ヒトLefthy-A cDNA (NCBI RefSeq ID NM\_003240  
 ) (配列番号15) :

## 【0052】 30

## 【化8】

1 acacccagct gcctgagacc ctccctcaac ctcccttagag gacagccccca  
 ctctgcctcc  
 61 tgctccccca gggcagcacc atgtggcccc tggcgtctg ctggcactc  
 tgggtgctgc  
 121 ccctggctgg ccccgccccg gccctgaccg aggagcagct cctggccagc  
 ctgctgcggc  
 181 agctgcagct cagcgagggtg cccgtactgg acagggccga catggagaag  
 ctggtcattcc  
 241 ccgcccacgt gagggccag tatgttagtcc tgctgcggcg cagccacggg  
 gaccgctcccc  
 301 gcggaaagag gttcagccag agcttccgag aggtggccgg caggttcctg  
 gcgtcggagg 40  
 361 ccagcacaca cctgctgggtt tcggcatgg agcagccgct gcccacaaac  
 agcgagctgg  
 421 tgcaggccgt gctgcggctc ttccaggagc cggccccaa ggccgcgtc  
 cacaggcactg

## 【0053】

## 【化9】

481 ggcggctgtc cccgcgcago gcccaggccc gggtgaccgt cgagtggctg  
 cgcgtccgct  
 541 acgacggctc caaccgcacc tccctcatcg actccaggat ggtgtccgtc  
 cacgagagcg  
 601 gctggaaggc ttgcacgtg accgaggccc tgaacttctg gcagcagctg  
 agccggccccc  
 661 ggcagccgct gctgctacag gtgtcggtgc agagggagca tctggcccg  
 ctggcggtccg  
 721 gcgcccacaa gctggtccgc tttgcctcgc agggggogcc agccgggctt  
 ggggagccccc  
 781 agctggagct gcacaccctg gacctcaggg actatggagc tcagggcgac  
 tgtgaccctg 10  
 841 aagcaccaat gaccgaggc acccgctgt gccgcccaggaa gatgtacatt  
 gacctgcagg  
 901 ggatgaagtg ggccaagaac tgggtgtgg agccccccggg ctccatggct  
 tacgagtgtg  
 961 tgggcacctg ccagcagccc ccggaggccc tggcctcaa ttggccattt  
 ctggggccgc  
 1021 gacagtgtat cgcctcgag actgcctcgc tgcccatgtat cgtcagcatc  
 aaggagggag  
 1081 gcaggaccag gccccaggtg gtcagcctgc ccaacatgag ggtgcagaag  
 tgcagctgtg  
 1141 cctcgatgg ggcgctcgat ccaaggaggg tccagccata ggccctgggt  
 gtatccattt  
 1201 agccctctaa ctgaacgtgt gcatagaggt ggtcttaatg taggtcttaa  
 ctttatactt 20  
 1261 agcaagttac tccatccaa tttagtgtct ctgtgtgacc ttgcgcctgt  
 gtccttccat  
 1321 ttccctgtctt tcccgtccat caccatctt aagcacttac gtgagtaat  
 aatgcagctc  
 1381 agatgtgag ctctagtagg aaatgtggc atgctgatta caagatacag  
 ctgagcaatg  
 1441 cacacatttt cagctggag tttctgttct ctggcaaatt cttcaactgag  
 tctggaaaca  
 1501 taatacccta tgattagaac tggggaaaca gaactgaatt gctgtgttat  
 atgaggaatt  
 1561 aaaaccttca aatctctatt tccccaaat actgaccat tctggacttt  
 tgtaaacata  
 1621 cctaggcccc tggccctgt agagggtgt aagaggaagg atgaaggcct  
 tcaggctggg 30  
 1681 ggcagtggac agggattgg gatacctgga ttctgggtct gacagggcca  
 caagcttagga  
 1741 tctctaacaa acgcagaagg ctgtggctcg tcatttcctc ttaaaaagga  
 ggagctggc  
 1801 ttcaagctcta agaacttcat tgcctgggg atcagacagc ccctacctac  
 ccctgcccc  
 1861 tcctctggag actgaggcatt gcccgtgcatt attaggtca tttcccacac  
 tgtcttagag  
 1921 aacttgcac cagaaaccac atgtatgttgc atgtttttt ttaattttagc  
 taaagcaatt  
 1981 gaatgttagat actcagaaga aataaaaaat gatgtttcaa aaaaaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaaaaa  
 2041 aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaaaaa 40  
 2101 aa

ヒト L e f t y - B c D N A ( N C B I R e f S e q I D N M \_ 0 2 0 9 9 7  
 ) ( 配列番号 16 ) :  
 【 0 0 5 4 】

## 【化10】

1 gcctgagacc ctctgcago ctttcaagg gacagccccca ctctgcctct  
 tgctccatca  
 61 gggcagcacc atgcagcccc tgtggctctg ctgggcactc tgggtgttgc  
 ccctggccag  
 121 ccccgcccccc gcccgtaccg gggagcagct cctgggcagc ctgtctgcggc  
 agctgcagct  
 181 caaagaggtg cccaccctgg acagggccga catggaggag ctggtcatcc  
 ccacccacgt  
 241 gagggccccag tacgtggccc tgctgcagcg cagccacggg gacccgtccc  
 gcgaaagag  
 301 gttcagccag agcttcccgag aggtggccgg caggttccctg gcttggagg  
 ccagcacaca  
 361 cctgtgttg ttccggcatgg agcagccggct gcccccac acggagctgg  
 tgcaggccgt  
 421 gctgcggctc ttccaggagc cggccccaa ggccgcgctg cacaggcacc  
 ggccggctgc  
 481 cccgcgcaga gcccggcccc gggtggaccgt cgagtggctg cggtccgc  
 acgacggctc  
 541 caaccgcacc tccctcatcg actccaggct ggtgtccgtc caagagagcg  
 gctggaaggc  
 601 cttcgacgtg accgaggccg tgaacttctg gcagcagctg agccggcccc  
 ggcagccgc  
 661 gctgctacag gtgtcggtgc agagggagca tctggccccg ctggcggtccg  
 gcccaccaa  
 721 gctggtccgc tttgcctcgc agggggccgc agccgggctt gggagcccc  
 agctggagct  
 781 gcacaccctg gaccttgggg actatggagc tcagggcgac tgtgaccctg  
 aagcaccaat  
 841 gaccgaggggc acccgctgct gccgcaggaa gatgtacatt gacgtgcagg  
 ggatgaagtg  
 901 gccccgagaac tgggtgctgg agccccccggg cttcctggct tatgagtgtg  
 tggccacctg  
 961 cccgcagccc ccggaggcccc tggccttcaa gtggccgttt ctggggccctc  
 gacagtgcatt  
 1021 cccctcgag actgactcgc tgcctatgtat cgtcagcatc aaggagggag  
 gcaggaccag  
 1081 gccccaggtg gtcagcctgc ccaacatgag ggtgcagaag tgcagctgt  
 cctcgatgg  
 1141 tgcgtcggt ccaaggaggc tccagccata ggcgcctagt gtagccatcg  
 agggacttga  
 1201 cttgtgtgtg tttctgaagt gttcgagggt accaggagag ctggcgatga  
 ctgaactgct  
 1261 gatggacaaa tgctctgtgc tctctagtga gcccgtatt tgcttcctct  
 gacaagttac  
 1321 ctcacctaattttgttct caggaatgag aatctttggc cactggagag  
 ccctgtctca  
 1381 gttttctcta ttcttattat tcaactgcact atattctaag cacttacatg  
 tggagatact  
 1441 gtaacctgag ggcagaaaagc ccaatgtgtc attgtttact tgcctgtca  
 ctggatctgg  
 1501 gctaaagtcc tccaccacca ctctggaccc aagacctggg gttaaagtgt  
 gtttgcatt  
 1561 ccccaatcca gataataaag actttgtaaa acatgaataa aacacatattt  
 attctaaaaa  
 1621 aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa  
 aaaaaaaaaaaaaaaa

L e f t y タンパク質は、全ての哺乳動物を含めたその他の種にも存在することが予想される。

## 【0055】

特に明記されない限り、「L e f t y ポリペプチド」には、野生型（天然の対立遺伝子を含む）、及び例えばN o d a l、ミオスタチン又はG D F - 11等のT G F - ファミリーメンバーの活性を阻害する能力を保持する、L e f t y の種々の切断バージョン及び変異体バージョンを含めた改変（「誘導体」）L e f t y 形態の両方が含まれる。

## 【0056】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「L e f t y 活性」という用語は、本開示内容のL e f t y タンパク質により示される1つ以上の活性を指す。より具体的には、「L e f t y 活性」は、N o d a l、ミオスタチン及びG D F - 1 1 の1つ以上に結合する能力を含む。

【0057】

「特異的に結合する」という用語は、標的分子を含まない組成物に関する、リガンドの全て又は一部と特定の標的分子（即ち、「結合パートナー」又は「結合部分」）との優先的な会合の言及を含む。勿論、本発明のL e f t y ポリペプチドとその他の非標的タンパク質との間に、ある程度の非特異的な相互作用が生じる場合があることが認められる。一般的には、特異的な結合によって、L e f t y ポリペプチドと標的タンパク質（例えば、N o d a l、ミオスタチン及び／又はG D F - 1 1 ）の間に、L e f t y ポリペプチドと他のタンパク質の間よりも強い会合が生じる。

10

【0058】

2. L e f t y 誘導体

本開示内容は、L e f t y タンパク質の新規の誘導体を提供する。「L e f t y 誘導体」という用語には、既知のL e f t y タンパク質の改変された形態、例えば変異誘発、挿入又は削除により誘導される変異体、及びL e f t y タンパク質の断片が含まれ、これらの変異体は、N o d a l、ミオスタチン及び／又はG D F - 1 1 の結合活性を保持する。L e f t y 誘導体には、本明細書で詳述するタンパク質を含めた、既知のL e f t y タンパク質と構造的及び／又は機能的類似性を共有するタンパク質も含まれる。このようなタンパク質は、ヒト若しくはマウスL e f t y の完全長、成熟部分、又は少なくとも領域2及び領域4内において、ヒト又はマウスL e f t y タンパク質と有意な配列同一性（例えば、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%又はそれ以上）を共有するアミノ酸配列を有する場合がある。L e f t y 誘導体には又、ヒト又はマウスL e f t y のコード配列、特に成熟部分、特に領域2及び領域4のコード配列の部分とストリンジェントな条件下ハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質も含まれる。「L e f t y 誘導体」という用語からは、配列番号1～4の何れも除外される。

20

【0059】

図1～5に示す通り、L e f t y タンパク質は、シグナル配列、プロペプチド及び成熟部分を含む部分に分割される場合がある。成熟部分は、5つの領域を有すると考えられる。領域1は、C1（システインノットドメインの第1システイン）のN-末端である成熟ポリペプチドの部分である。領域2及び領域4は、ループA及びループBに対応し、リガンド結合（例えばN o d a l、ミオスタチン及びG D F - 1 1 等のリガンド）に関与する。L e f t y タンパク質の領域3は、ヘリックス、及び分子間架橋に関与するシステインを有さない。領域5は、システインノットドメインの最終システインのC-末端である部分である。プロペプチドは、上流（N-末端）又は下流R X X R 開裂部位のどちらが使用されるかによって、それぞれ長くなるか短くなる。反対に、成熟部分は、プロペプチドと共に発現した場合、どちらのR X X R 開裂部位が使用されるかによって、それぞれ短くなるか長くなる。

30

【0060】

領域2及び領域4は、N o d a l、ミオスタチン及びG D F - 1 1 への結合を媒介することから、リガンド結合が保持される限りは、領域1、領域3及び領域5の何れかが改変される場合があることが予想される。又、リガンド結合活性を保持するL e f t y 誘導体において、基本的なシステインノット構造が一般的に保存されることも予想される。

40

【0061】

その他の種に由来するL e f t y タンパク質、特に哺乳動物のL e f t y タンパク質は、例えばP C R、低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション、又は標的の種内で同定されたL e f t y ホモログと抗体とを交差反応させる、発現ライブラリーの抗体媒介によるスクリーニングといった、標準的な分子生物学のプロトコルにより容易に得られる。

【0062】

50

特定の実施形態において、Leftyポリペプチドの単離された断片は、Leftyポリペプチドをコードする核酸の対応する断片から組換えにより生成したポリペプチドをスクリーニングすることによって得られる（例えば、配列番号13～16）。更に、断片は、例えば従来のMerrifieldによる固相f-Moc又はt-Boc法といった、当該技術分野で既知の技法を使用して、化学的に合成することもできる。断片は（組換え又は化学合成により）製造することができ、且つNodal1、ミオスタチン及び/又はGDF-11に結合する作用を有するペプチジル断片を同定する試験、又は例えば筋肉増殖の刺激といった細胞ベースの活性に関する試験を行うことができる。

#### 【0063】

特定の実施形態において、Lefty誘導体は、配列番号1～4、9、10、11、12又は22の何れかに示すようなアミノ酸配列と少なくとも75%同一のアミノ酸配列を有する。特定の場合において、Lefty誘導体は、配列番号1～4、9、10、11、12又は22の何れかに示すようなアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。好ましくは、このような変異体は、Nodal1、ミオスタチン及び/又はGDF-11に結合する能力を保持する。

#### 【0064】

特定の実施形態において、本発明は、Leftyポリペプチドの構造を修飾することによって機能性Lefty誘導体を製造することを考慮する。このような修飾は、例えば治療効果又は安定性（例えば、ex vivoでの有効期間、及びin vivoでのタンパク質分解耐性）を高めるといった目的で行なわれる場合がある。Lefty誘導体は又、例えばアミノ酸の置換、削除又は追加によっても生成することができる。例えば、ロイシンからイソロイシン又はバリンへの、アスパラギン酸からグルタミン酸への、スレオニンからセリンへの単独の代替、又は任意のアミノ酸から構造的に関連するアミノ酸（例えば、保存的突然変異）への同様の代替には、得られる分子の生物学的活性に大きな影響は及ぼさないことが合理的に予想される。保存的代替は、側鎖において関連するアミノ酸のファミリー内で行われる代替である。Lefty誘導体のアミノ酸配列の変化によって機能性ホモログがもたらされるかどうかは、変異体プロペプチドが野生型Leftyと同様に細胞内で応答を生成する能力、又はリガンドに結合する能力を評価することにより容易に判定することができる。

#### 【0065】

特定の実施形態において、本発明は、Lefty配列のタンパク質開裂部位に突然変異を行い、該部位がタンパク質開裂を受けにくくなるようにすることを考慮する。タンパク質開裂部位は、コンピュータ解析（市販のソフトウェア（例えば、MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.）を使用）を使用して同定することができる。当業者により認識されるように、記載した突然変異、変異体又は修飾の殆どは、核酸レベルで、又は場合により翻訳後修飾若しくは化学合成により生成される場合がある。このような技法は、当該技術分野で周知である。

#### 【0066】

特定の実施形態において、本発明は、ポリペプチドのグリコシル化を改変するためにLefty配列の特定の突然変異を考慮する。このような突然変異は、例えばO結合又はN結合グリコシル化部位といった、1つ以上のグリコシル化部位を導入又は排除するために選択される場合がある。アスパラギン結合グリコシル化認識部位は一般的に、適切な細胞内グリコシル化酵素により特異的に認識されるトリペプチド配列である、アスパラギン-X-スレオニン（この場合「X」は、任意のアミノ酸である）を含む。改変は、野生型Leftyの配列（O結合グリコシル化部位の場合）の1つ以上のセリン又はスレオニン残基の追加、又はこれによる置換によっても行われる場合がある。グリコシル化認識部位の第1又は第3のアミノ酸位置の一方又は両方における種々のアミノ酸置換又は削除（及び/又は第2の位置におけるアミノ酸削除）によって、修飾されたトリペプチド配列におけ

10

20

30

40

50

る非グリコシル化が行われる。Leftyポリペプチドの糖部分の数を増やす別の手段としては、グリコシドをLeftyポリペプチドに化学又は酵素結合させる方法がある。使用する結合様式によって、糖は、(a)アルギニン及びヒスチジン；(b)遊離カルボキシル基；(c)例えばシスティン等の遊離スルフヒドリル基；(d)例えばセリン、スレオニン、若しくはヒドロキシプロリン等の遊離ヒドロキシル基；(e)例えばフェニルアラニン、チロシン、若しくはトリプトファン等の芳香族残基；又は(f)グルタミンのアミド基に結合する場合がある。Leftyポリペプチド上に存在する1つ以上の糖部分は、化学的に及び/又は酵素的に除去される場合がある。化学的な脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は等価化合物へのLeftyポリペプチドの暴露を伴う場合がある。この処理により、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除いた殆ど又は全ての糖が開裂される一方で、アミノ酸配列はそのままの状態が維持される。化学的な脱グリコシル化については、Hakimuddin, et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52; 及び Edge, et al. (1981) Anal. Bioc hem. 118:131に詳述されている。Leftyポリペプチド上の糖部分の酵素開裂は、Thotakura, et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350に記載されているような、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを使用することにより達成される場合がある。プロペプチドの核酸及び/又はアミノ酸配列は、哺乳動物、酵母、昆虫及び植物細胞が全て、ペプチドのアミノ酸配列による影響を受ける可能性がある異なるグリコシル化パターンを導入する場合があることから、使用する発現系の種類に応じて適宜調整される場合がある。

10

20

30

40

50

## 【0067】

Lefty-Aで行うことができる配列修飾の例を、以下に示す。

## 【0068】

## 【化11】

LTEEQLLGSLLRQLQLSEVPVLDRADMEKLVIPAHVRAQYVVLLRRS  
 HGDRSRGKRFSQSFREVAGRFLASEASTHLLVFGMEQRLPPNSELVQAVLR  
 LFQEPVPKAAL(N)HR(T/G)HGR(N)LSPRSAQARVTVEWLRVRDDGSNRTSLI  
 DSRLVSVHESGWKAFDVTEAVNFWQQLSRPRQPLLLQVSVQREHLGPLASG  
 AHKLVRFASQGAPAGLGEPQLEHTLDLRDYGAQGDCDPEAP(N)MTE(N)G  
 TRCCRQEMYIDLQGMKWAKNWVLEPPGFLAYECVGTCQQPPEA(N)LA(T)F  
 NW(S)P(T)FLGPRQCIASETASLPMIVSIKEGGRTRPQVVSLPNMRVQKCSA  
 SDGALVPRRLQP

第1及び第2の開裂部位には、下線が引いてある。一緒に、個別に、又は組み合わせて使用される場合がある可能な改変は、改変するアミノ酸に続けて括弧内に示す。このバージョンにおいて、ポリペプチドは、第1の部位で開裂されて、太字フォントのフェニルアラニン(F)で開始する34kDaのLefty-Aポリペプチドが生じる。第2のRXR開裂部位は、開裂を排除する(例えば、RからGへの改変)又は開裂を排除してグリコシル化部位を導入する(図示したその他の変化)ために改変される場合がある。その他の突然変異は、領域1及び領域3のC-末端にグリコシル化部位を導入することが示されている。配列番号2~4の何れかにも、類似の突然変異が生成される場合がある。

## 【0069】

本開示内容は、Leftyポリペプチドのコンビナトリアル突然変異のセット、及び切断型突然変異を含む突然変異を生成する方法を考慮する。コンビナトリアル突然変異のグループは、機能性変異体配列の同定に特に有用である。このようなコンビナトリアルライブラリーのスクリーニングは、例えば、Nodal、ミオスタチン及び/又はGDF-11の拮抗物質として作用し得るLefty誘導体を生成することを目的とする場合がある。

例えば、Lefty ポリペプチド変異体は、Nodal、ミオスタチン及び／若しくは GDF-11 ポリペプチドに結合する能力、或いは例えば ActRIA 若しくは B のような受容体を発現する細胞への Nodal、ミオスタチン及び／若しくは GDF-11 の結合を防止する能力に関してスクリーニングされる場合がある。Lefty ポリペプチド変異体の活性は、細胞ベースの試験又は *in vivo* 試験で試験される場合もある。例えば、筋細胞増殖又はミオスタチン感受性プロモーターに関する遺伝子の発現に対する、Lefty ポリペプチド変異体の効果が評価される場合がある。同様に、Lefty ポリペプチドがマウス又は他の動物に投与されて、1つ以上の骨質、例えば密度又は容積等が評価される場合がある。骨折の治癒率も評価される場合がある。ミオスタチン、Nodal 又は GDF-11 の何れかによる遺伝子発現変化に対する Lefty ポリペプチドの効果が評価される場合がある。例えば、A-204 レポーター遺伝子試験は、GDF-11 及びミオスタチン又は他の TGF- ファミリーメンバーによるシグナル伝達に対する Lefty ポリペプチドの効果を評価するために使用される場合がある。細胞系（例えば、ヒト横紋筋肉腫細胞系）は、TGF- シグナル伝達感受性調節要素（例えば、Dennler ら、1998, EMBO 17: 3091-3100 に記載の pGL3 (CAGA)12 の誘導下で、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）を配置するレポーターベクターでトランسفエクトされる場合がある。CAGA12 モチーフは、TGF- 応答遺伝子（PAI-1 遺伝子）に存在し、この種のベクターは、Smad2 及び 3 を介してシグナル伝達する因子に一般的に使用されている。Lefty ポリペプチドは、レポーター遺伝子活性に対する効果について試験される場合がある。

10

20

30

## 【0070】

組み合わせにより誘導される変異体は、天然の Lefty ポリペプチドに対して選択的効能を有するものを生成することができる。同様に、変異誘発によって、対応する野生型プロペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生じさせることができる。例えば、改変したタンパク質は、タンパク質分解に対してより安定したものにすることもできれば、より不安定なものにすることもできる。

## 【0071】

コンビナトリアルライブラリーは、それぞれ潜在的な Lefty ポリペプチド配列の少なくとも一部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーによって生成される場合がある。例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物は、遺伝子配列内に酵素的に連結して、潜在的な Lefty ポリペプチドヌクレオチド配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、或いはより大きな融合タンパク質のセット（例えば、ファージディスプレイのため）として発現することができる。

40

## 【0072】

縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なホモログのライブラリーを生成することができる方法は数多く存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は自動 DNA 合成装置で行うことができ、次いで、発現に適切なベクターに合成遺伝子を連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当該技術分野で周知である（例えば、Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura ら、(1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symposium. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura ら、(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura ら、(1984) Science 198: 1056; Ike ら、(1983) Nucleic Acid Res. 11:477 を参照）。このような技法は、他のタンパク質の定向進化法で使用されている（例えば、Scott ら、(1990) Science 249: 386-390; Roberts ら、(1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin ら、(1990) Science 249: 404-406; Cwirla ら、(1990) PNAS USA 87: 6378-6382；並びに米国特許第 5,223,409 号、米国特許第 5,198,346

50

号、及び米国特許第5,096,815号を参照)。

【0073】

或いは、変異誘発のその他の形態を使用して、コンビナトリアルライブラリーを生成するも可能である。例えば、Leftyポリペプチド変異体は、例えばアラニン走査変異誘発等を使用したスクリーニングにより(Rufら、(1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572; Wangら、(1994) *J. Biol. Chem.* 269: 3095-3099; Balintら、(1993) *Gene* 137: 109-118; Grodbergら、(1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 597-601; Nagashimaら、(1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2888-2892; Lowmanら、(1991) *Biochemistry* 30: 10832-10838; 及びCunninghamら、(1989) *Science* 244: 1081-1085); リンカー走査変異誘発により(Gustiら、(1993) *Virology* 193: 653-660; Brownら、(1992) *Mol. Cell Biol.* 12: 2644-2652; McKnightら、(1982) *Science* 232: 316); 飽和変異誘発により(Meyersら、(1986) *Science* 232: 613); PCR変異誘発により(Leungら、(1989) *Method Cell Mol Biol* 1: 11-19); 又は化学的変異誘発等を含めたランダム変異誘発により(Millerら、(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 及びGreenerら、(1994) *Strategies in Mol Biol* 7: 32-34)、ライブラリーから生成及び単離することができる。特にコンビナトリアル設定におけるリンカー走査変異誘発は、Leftyポリペプチドの開裂(生理活性)形態を同定する魅力的な方法である。

【0074】

点突然変異及び切断により形成されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする技法、更には、特定の特性を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングする技法は、当該技術分野で幅広く知られている。このような技法は一般的に、Leftyポリペプチドのコンビナトリアル変異誘発により生成される遺伝子ライブラリーの高速スクリーニングに適合させることができる。多くの遺伝子ライブラリーのスクリーニングに最も広く使用されている技法は一般的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター内にクローニングし、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換し、所望の活性を検出することによって、検出した産物の遺伝子をコードするベクターの比較的容易な単離が促進される条件下で、組み合わせ遺伝子を発現させることを含む。以下に記載する例示的な試験は何れも、コンビナトリアル変異誘発法により形成される膨大な縮重配列のスクリーニングで必要とされるような、高スループットの解析を適用することができる。

【0075】

特定の実施形態において、本発明のLeftyポリペプチドは、ペプチド模倣薬を含む。本明細書で使用される「ペプチド模倣薬」という用語は、化学的に修飾されたペプチド、並びに非天然のアミノ酸、ペプトイド等を含むペプチド様分子を含む。ペプチド模倣薬は、被験体に投与された場合に安定性が向上することを含めて、ペプチドを超える種々の利点を提供する。ペプチド模倣薬を同定する方法は、当該技術分野で周知であり、潜在的なペプチド模倣薬のライブラリーを含むデータベースのスクリーニングを含む。例えば、Cambridge Structural Databaseは、既知の結晶構造を有する300,000を超える化合物のコレクションを含む(Allenら、*Acta Crystallogr. Sect. B*, 35: 2331 (1979))。標的分子の結晶構造が得られない場合は、例えばCONCORDプログラムを使用して構造を生成することができる(Rusinkoら、*J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29: 251 (1989))。別のデータベースであるAvailable

ble Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; 米国カリフォルニア州サンロレンゾ) は、市販の約 100,000 の化合物を含んでおり、Lefty ポリペプチドの潜在的なペプチド模倣薬を同定するために検索することができる。例えば、このような残基の非加水分解性ペプチド類似体は、ベンゾジアゼピン(例えば、Freidingerら、Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988 を参照)、アゼピン(例えば、Huffmanら、Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988 を参照)、置換 ラクタム環(Garveyら、Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)、ケト-メチレン擬ペプチド(Ewensonら、(1986) J. Med. Chem. 29:295; 及び Ewensonら、Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptides Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985)、b-ターン・ジペプチドコア(Nagaiら、(1985) Tetrahedron Lett 26:647; 及び Satoら、(1986) J. Chem. Soc. Perkin Trans 1:1231)、及び b-アミノアルコール(Gordonら、(1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419; 及び Dannら、(1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71)を使用して生成することができる。  
10 20 30

## 【0076】

特定の実施形態において、本発明の Lefty ポリペプチドは、プロペプチドに天然に存在するものに加えて、更に翻訳後修飾を含む場合がある。このような修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されない。その結果、修飾された Lefty ポリペプチドは、非アミノ酸要素、例えばポリオキシアルキレングリコール(例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール)、脂質、多糖又は单糖、及びリン酸を含む場合がある。このような非アミノ酸要素が Lefty ポリペプチドの機能性に及ぼす効果は、本明細書に記載の通り試験される場合がある。Lefty ポリペプチドの新生形態を開裂することにより細胞内で Lefty ポリペプチドが生成される場合、翻訳後プロセシングは、タンパク質の適切な折り畳み及び/又は機能に重要な場合もある。異なる細胞(例えば CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 又は HEK293) は、このような翻訳後活性の特定の細胞機構及び特徴的な機序を有し、Lefty ポリペプチドの適切な修飾及びプロセシングを確実にするように選択される場合がある。  
30

## 【0077】

Lefty ポリペプチドは、種々のものが融合タンパク質として調製される場合がある。融合タンパク質は、in vivo における安定性、in vivo における半減期、取込み/投与、組織の局在化若しくは分布、タンパク質複合体の形成、及び/又は精製の 1 つ以上を改善する、1 つ以上の更なるポリペプチド部分を含む場合がある。例えば、融合タンパク質は、免疫グロブリン Fc ドメイン、並びに/又はエピトープタグ、FLAG タグ、ポリヒスチジン配列、及び GST 融合から選択される精製サブ配列を含む場合がある。Lefty 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、脂質部分にコンジュゲートしたアミノ酸、及び有機誘導体化剤にコンジュゲートしたアミノ酸から選択される 1 つ以上の修飾アミノ酸残基を含む場合がある。  
40 50

## 【0078】

融合タンパク質又は結合タンパク質系（例えば、架橋による非融合の共有結合）は、Nod a 1、ミオスタチン及び／又はG D F - 1 1に選択的に結合し、A L K 7又はA L K 4受容体の結合と競合するポリペプチド親和性試薬である第2の拮抗物質ドメインも含む場合がある。親和性試薬は、抗体薬である場合がある。抗体薬は、例えば組換え抗体；モノクローナル抗体；V H ドメイン；V L ドメイン；s c F v；F a b 断片；F a b ' 断片；F ( a b ' ) 2；F v；若しくはジスルフィド結合F v、完全ヒト抗体若しくはヒト化キメラ抗体、又はそれらの抗原結合断片である場合がある。親和性試薬は、Nod a 1、ミオスタチン及び／又はL e f t yに選択的に結合して、A L K 7又はA L K 4受容体の結合と競合するペプチド又は骨格ペプチドである。親和性試薬は、A L K 7又はA L K 4のNod a 1、ミオスタチン及び／又はG D F - 1 1結合ドメインを含む場合がある。例えば、A L K 7又はA L K 4（好ましくはヒトA L K 7又はA L K 4）の細胞外ドメインが使用される場合がある。親和性試薬は、Nod a 1、ミオスタチン及び／又はG D F - 1 1に選択的に結合して、A L K 7又はA L K 4受容体の結合と競合する小有機分子である場合がある。10

【0 0 7 9】

ヒトA L K 7リガンド結合ドメインの例を、以下に示す。

【0 0 8 0】

【化 1 2】

L K C V C L L C D S S N F T C Q T E G A C W A S V M L T N G K E Q V I K S C V S L P E L N A  
Q V F C H S S N N V T K T E C C F T D F C N N I T L H L P ( 配列番号 26) 20

ヒトA L K 4ミオスタチン結合ドメインの例を、以下に示す・

【0 0 8 1】

【化 1 3】

A L L C A C T S C L Q A N Y T C E T D G A C M V S I F N L D G M E H H V R T C I P K V E L V P  
A G K P F Y C L S S E D L R N T H C C Y T D Y ( 配列番号 27)

融合タンパク質の種々の要素は、所望の機能性と矛盾しない任意の様式で配置される場合があることが理解される。例えば、L e f t yポリペプチドが、異種ドメインのC - 末端に配置される場合もあれば、或いは異種ドメインが、L e f t yポリペプチドのC - 末端に配置される場合もある。プロペプチドドメインと異種ドメインは、融合タンパク質中で隣接する必要はなく、何れかのドメインのC - 若しくはN - 末端に、又はこれらのドメインの間に、更なるドメイン又はアミノ酸配列が含まれる場合がある。30

【0 0 8 2】

特定の実施形態において、本発明のL e f t yポリペプチドは、L e f t yポリペプチドを安定化させることができる1つ以上の修飾を含む。例えば、このような修飾は、プロペプチドのi n v i t r o半減期を延長するか、プロペプチドの循環半減期を延長するか、又はプロペプチドのタンパク質分解を低下させる場合がある。このような安定化修飾には、融合タンパク質（例えばL e f t yポリペプチド及び安定化剤ドメインを含む融合タンパク質を含む）、グリコシル化部位の修飾（例えば、L e f t yポリペプチドへのグリコシル化部位の付加を含む）、及び糖部分の修飾（例えばL e f t yポリペプチドからの糖部分の除去を含む）が含まれるが、これらに限定されない。融合タンパク質の場合、L e f t yポリペプチドは、I g G分子（例えば、F c ドメイン）等の安定化剤ドメインに融合される。本明細書で使用される「安定化剤ドメイン」という用語は、融合タンパク質の場合のように融合ドメイン（例えば、F c ）のみを指すだけでなく、糖部分等の非タンパク質性修飾、又はポリエチレングリコール（P E G）等の非タンパク質性ポリマーも含む。P E Gは、ポリマー分子量が1,000D～50,000D以上の、種々の大きさのL e f t yポリペプチドに添加される場合がある。P E Gポリマーは、特にN - 末端アミン又は操作されたシスティンに指向される場合、選択的且つ残基特異的にプロペプチドに添加される場合がある。P E Gポリマーは又、第1級アミン及び／又はスルフヒドリル40

50

基が反応される場合がある比較的非制御の反応で添加される場合がある。化学量論は、1:1 (PEG:ペプチド) ~ 2:1 以上の範囲にわたる場合がある。

【0083】

特定の実施形態において、Leftyポリペプチドは、免疫グロブリンFcドメインと融合される。好ましい実施形態において、Fcドメインは、IgG1 Fc断片である。IgG1 Fc断片は、例えばFc受容体への結合を低下させる突然変異、及びMHCクラスI関連のFc受容体(FcRN)への結合を低下させる突然変異を含めた、種々の改変を含む場合がある。突然変異の例には、Fc部分内の位置265 (AspからAla)、322 (LysからAla)、及び434 (AsnからAla)における突然変異が含まれる。

10

【0084】

特定の実施形態において、本発明は、他のタンパク質から単離された、又はさもなくば他のタンパク質を実質的に含まない、Leftyポリペプチドの単離及び/又は精製形態を提供する。

【0085】

特定の実施形態において、本発明のLeftyポリペプチド(非修飾又は修飾)は、当該技術分野で認識される種々の技法により生成することができる。例えば、このようなLeftyポリペプチドは、Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993); 及びGrant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)に記載されているような標準的なタンパク質化学法を使用して合成することができる。更には、自動ペプチド合成装置も市販されている(例えば、Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。或いは、Leftyポリペプチド、それらの断片又は変異体は、当該技術分野で周知の通り、種々の発現系(例えば、大腸菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞、COS細胞、バキュロウイルス)を使用して組換えにより生成される場合もある(以下も参照)。更なる実施形態において、修飾又は非修飾Leftyポリペプチドは、例えば、プロテアーゼ(例えば、トリプシン、サーモリシン、キモトリプシン、ペプシン、又は対になった塩基性アミノ酸変換酵素(PACE))を使用した、天然の又は組換えにより生成されたLeftyポリペプチドの消化により、生成される場合がある。タンパク質開裂部位は、コンピュータ解析(市販のソフトウェア(例えば、MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)を使用)を使用して同定することができる。

20

【0086】

3. Leftyポリペプチドをコードする核酸

特定の態様において、本発明は、本明細書に開示する誘導体を含めたLeftyポリペプチドの何れかをコードする単離及び/又は組換え核酸を提供する。本発明の核酸は、一本鎖である場合もあれば、二本鎖である場合もある。このような核酸は、DNAである場合もあれば、RNA分子である場合もある。これらの核酸は、例えば、Leftyポリペプチドの製造方法で、又は(例えば、遺伝子療法における)直接の治療薬として使用される場合がある。

30

【0087】

他の実施形態において、本発明の核酸は又、配列番号13~16に指定したヌクレオチド、配列番号13~16の相補性配列、又はそれらの断片と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列も含む。上述の通り、DNAのハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件は変化させることができることを、当業者であれば容易に理解するであろう。例えば、約45にて6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)でハイブリダイゼーションを行い、続いて50にて2.0×SSCの洗浄を行うことができる。例えば、洗浄手順における塩濃度は、50にて約

40

50

2 . 0 × S S C の低ストリンジエンシーから、5 0 にて約 0 . 2 × S S C の高ストリンジエンシーの間で選択することができる。更に、洗浄手順における温度は、室温にてある約 2 2 の低ストリンジエンシー条件から約 6 5 の高ストリンジエンシー条件まで上昇させることができる。温度及び塩を何れも変化させる場合もあれば、温度又は塩濃度を一定に保ち、他方の変数を変化させる場合もある。一実施形態において、本発明は、室温にて 6 × S S C の低ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズした後、室温にて 2 × S S C の洗浄を行う核酸を提供する。

【 0 0 8 8 】

遺伝暗号の縮重により、配列番号 1 3 ~ 1 6 に示す核酸とは異なる単離された核酸も、本発明の適用範囲内に含まれる。例えば、幾つかのアミノ酸は、複数の三つ組により指定される。同一のアミノ酸を特定するコドン、即ち同義語（例えば、C A U 及び C A C はヒスチジンの同義語である）は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント」突然変異を生じる場合がある。しかし、哺乳動物細胞には、本発明のタンパク質のアミノ酸配列における変化を生じる D N A 配列多型が存在すると予想される。当業者であれば、所定の種の個体には、天然の対立遺伝子改変により、特定のタンパク質をコードする核酸の 1 つ以上のヌクレオチド（約 3 ~ 5 % 以下のヌクレオチド）における改変が存在する場合があることを理解するであろう。このようなヌクレオチド改変の何れか及び全て、並びに得られたアミノ酸多型は、本発明の適用範囲内に含まれる。

【 0 0 8 9 】

特定の実施形態において、本発明の組換え核酸は、発現コンストラクト内の 1 つ以上の調節ヌクレオチド配列に操作可能に結合する場合がある。調節ヌクレオチド配列は一般的に、発現に使用される宿主細胞に適切である。種々の宿主細胞の適切な発現ベクター及び好適な調節配列は、数多くの種類のものが当該技術分野で既知である。通常、前記の 1 つ以上の調節ヌクレオチド配列には、プロモーター配列、リーダー又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、並びにエンハンサー又はアクチベーター配列が含まれる場合があるが、これらに限定されない。当該技術分野で既知の構成又は誘導プロモーターが本発明により考慮される。プロモーターは、天然のプロモーターである場合もあれば、複数のプロモーターの要素を組み合わせるハイブリッドプロモーターである場合もある。発現コンストラクトは、細胞内で、例えばプラスミド等のエピソーム上に存在する場合もあれば、染色体内に挿入される場合もある。好ましい実施形態において、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含む。選択マーカー遺伝子は、当該技術分野で周知であり、使用する宿主細胞により異なる。

【 0 0 9 0 】

本発明の特定の態様においては、L e f t y ポリペプチドをコードし、少なくとも 1 つの調節配列に操作可能に結合したヌクレオチド配列を含む本発明の核酸が、発現ベクター内に提供される。調節配列は当該技術分野で認知されており、L e f t y ポリペプチドの発現を誘導するように選択される。従って、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、及びその他の発現制御要素を含む。代表的な調節配列については、G o e d d e l ; G e n e E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y : M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A ( 1 9 9 0 ) に記載されている。例えば、操作可能に結合されると D N A 配列の発現を制御する広範な発現制御配列の何れかが、これらベクターで使用され、L e f t y ポリペプチドをコードする D N A 配列を発現させる場合がある。このように有用な発現制御配列は、例えば C M V プロモーター、S V 4 0 の e a r l y 及び l a t e プロモーター、t e t プロモーター、アデノウイルス又はサイトメガロウイルス i m m e d i a t e e a r l y プロモーター、R S V プロモーター、l a c 系、t r p 系、T A C 又は T R C 系、発現が T 7 R N A ポリメラーゼにより誘導される T 7 プロモーター、ファージの主オペレーター及びプロモーター領域、f d コートタンパク質の制御領域、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ又はその他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ（例え

10

20

30

40

50

ば、Pho5)のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系の多面体プロモーター、及び原核生物若しくは真核生物細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られるその他の配列、並びにそれらの種々の組み合わせを含む。発現ベクターの設計は、形質転換する宿主細胞の選択、及び/又は発現が所望されるタンパク質の種類等の因子により異なる場合があることを理解しなければならない。更に、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、及び例えば抗生物質マーカー等、ベクターによりコードされるその他何れかのタンパク質の発現も考慮する必要がある。

【0091】

本発明の組換え核酸は、クローン遺伝子又はその一部を、原核生物細胞、真核生物細胞(酵母、鳥類、昆虫又は哺乳動物)の何れか、又はそれらの両方における発現に好適なベクターに連結することにより、生成することができる。組換えLeftyポリペプチドを生成する発現ビヒクルは、プラスミド及びその他のベクターを含む。例えば、好適なベクターは、大腸菌等の原核生物における発現のための、pBR322誘導プラスミド、pEMBL誘導プラスミド、pEX誘導プラスミド、pBTac誘導プラスミド、及びpUC誘導プラスミドといった種類のプラスミドを含む。

10

【0092】

幾つかの哺乳動物発現ベクターは、細菌内でベクターの増殖を促進する原核生物配列と、真核生物細胞内で発現される1つ以上の真核生物転写単位との両方を含む。pCDNAI/amp、pCDNAI/neo、pRC/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、PTK2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及びpHyg由来のベクターは、真核生物細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらベクターの幾つかは、例えばpBR322等の細菌プラスミドからの配列で修飾されて、原核生物及び真核生物細胞の両方内で複製及び薬物耐性選択を促進する。或いは、ウシ乳頭腫ウイルス(BPV-I)、又はEpstein-Barrウイルス(pHEBo、pREP誘導及びp205)等のウイルス誘導体を、真核生物細胞でのタンパク質の一過性発現に使用される場合がある。他のウイルス(レトロウイルスを含む)発現系の例は、以下の遺伝子療法送達系の記載に見出すことができる。プラスミドの調製、及び宿主有機体の形質転換に使用される種々の方法は、当該技術分野で周知である。原核生物及び真核生物細胞の両方に関するその他の好適な発現系、並びに一般的な組換え手順については、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 and 17を参照されたい。ある場合に、バキュロウイルス発現系を使用して組換えSLC5A8ポリペプチドを発現させることが所望される場合がある。それらのバキュロウイルス発現系の例は、pVL誘導ベクター(例えばpVL1392、pVL1393及びpVL941等)、pAcUW誘導ベクター(例えばpAcUW1等)、及びpBlueBac誘導ベクター(例えば-gal含有pBlueBacI等)を含む。

20

30

【0093】

特定の実施形態において、ベクターは、例えばPcmv-Scriptベクター(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pCDNA4ベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)及びpCI-neoベクター(Promega, Madison, Wise)等のCHO細胞内での本発明のLeftyポリペプチドの生成のために設計されるであろう。明らかとなるように、本発明の遺伝子コンストラクトは、培地内で増殖した細胞内で本発明のLeftyポリペプチドを発現させて、例えば、精製のための融合タンパク質又は変異体タンパク質を含むタンパク質を生成するために使用される場合がある。

40

【0094】

本発明は、本発明のLeftyポリペプチドの1つ以上のコード配列を含む、組換え遺伝子をトランスフェクトした宿主細胞にも関する。宿主細胞は、任意の原核生物又は真核

50

生物細胞である場合がある。例えば、本発明の L e f t y ポリペプチドは、例えば大腸菌等の細菌細胞、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現系を使用）、酵母、又は哺乳動物細胞内で発現される場合がある。その他の好適な宿主細胞は、当業者に既知である。

【 0 0 9 5 】

従って、本発明は、更に、本発明の L e f t y ポリペプチドの製造方法に関する。例えば、 L e f t y ポリペプチドをコードする発現ベクターをトランスフェクトした宿主細胞を、適切な条件下で培養して、 L e f t y ポリペプチドを発現させる。 L e f t y ポリペプチドは、プロペプチドを含有する細胞と培地との混合物から分泌及び単離される場合がある。或いは、ポリペプチドは、細胞質内又は膜画分中に保持され、細胞を回収し、溶解し、タンパク質を単離してもよい。細胞培養物は、宿主細胞、培地、及び他の副生物を含有する。細胞培養のための好適な培地は、当該技術分野で周知である。ポリペプチドは、イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、超濾過、電気泳動、及び L e f t y ポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体による免疫親和精製を含む、好適なタンパク質精製法を使用して、宿主細胞、細胞培地、又は両方から単離することができる。好ましい実施形態において、 L e f t y ポリペプチドは、その精製を促進するドメイン（精製ドメイン）を含む融合タンパク質である。例えば、例えば組換え L e f t y ポリペプチドの所望の部分の N - 末端におけるポリ - ( H i s ) / エンテロキナーゼ開裂部位配列等、精製リーダー配列又は C - 末端テールをコードする融合遺伝子は、 N i <sup>2+</sup> 金属樹脂を使用した親和性クロマトグラフィーによる、発現した融合タンパク質の精製を可能にする。次に、精製配列をエンテロキナーゼで処理して除去し、精製 L e f t y ポリペプチドを提供する（例えば、 Hochuli ら、（ 1987 ） J. Chromatography 411 : 177 ; 及び Janknecht ら、 PNAS USA 88 : 8972 を参照）。

10

20

30

30

【 0 0 9 6 】

融合遺伝子の製造法は周知である。基本的に、異なるポリペプチド配列をコードする種々の DNA 断片は、連結のための平滑末端又はねじれ型末端、適切な末端を提供する制限酵素消化、付着末端の適宜の埋込み、望ましくない連結を避けるアルカリフィオスファターゼ処理、及び酵素的連結を使用して、従来の技法に従って連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動 DNA 合成装置を含む従来の技法により合成してもよい。或いは、2つの連続した遺伝子断片間に相補的なオーバーハングを生じさせるアンカープライマーを使用して、次にこれらをアニールしてキメラ遺伝子配列を生成する、遺伝子断片の PCR 増幅を実施してもよい（例えば、 Current Protocols in Molecular Biology , eds. Ausubel ら、 John Wiley & Sons : 1992 を参照）。

【 0 0 9 7 】

4. 例示的な治療用途

例えば完全長及び N - 末端開裂 L e f t y 誘導体等の本発明の L e f t y ポリペプチドは、ミオスタチン、 Nodal 又は GDF - 11 の存在により生じる又は増悪する多数の疾患の多数の治療的設定にて使用される場合がある。

40

【 0 0 9 8 】

特定の実施形態において、本発明の L e f t y ポリペプチドは、筋ジストロフィー処置の一部として使用される。「筋ジストロフィー」という用語は、骨格筋、時には心筋及び呼吸筋の漸進的な衰弱及び悪化により特徴付けられる変性性筋肉疾患の群を指す。筋ジストロフィーは、進行性の筋肉消耗、及び筋肉の顕微鏡的变化で開始される衰弱により特徴付けられる遺伝性疾患である。ある時間にわたり筋肉が変性すると、患者の筋肉強度が減退する。本発明のミオスタチンを含む療法で処置可能な代表的な筋ジストロフィーは：デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ DMD ）、ベーカー型筋ジストロフィー（ BMD ）、エメリ・ドレフュス筋ジストロフィー（ E D M D ）、肢帶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 又は F S H D ）（顔面肩甲上腕型（ L a n d o u z y - D e j e r i n e ）としても知られる）、筋緊張性ジストロフィー（ M M D ）

50

(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 )を含む。

【 0 0 9 9 】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー( D M D )は、最初に、1860年にフランスの神経学者 G u i l l a u m e B e n j a m i n A m a n d D u c h e n n e により説明された。ベーカー型筋ジストロフィー( B M D )は、1950年にこの D M D の変異体を最初に記載したドイツ人医師 P e t e r E m i l B e c k e r にちなんで付けられた。 D M D は、少年 3,500 人の 1 人に発症する、男性で最も頻度の高い遺伝病である。 D M D は、X 染色体の短腕上に位置するジストロフィン遺伝子が破損した場合に発生する。男性は、X 染色体のコピーを 1 つのみ保有するため、ジストロフィン遺伝子のコピーを 1 つのみ有する。ジストロフィンタンパク質なしでは、筋肉は、収縮と弛緩の周期中に容易に損傷される。疾患の早期において、筋肉は再生により補償し、その後、筋肉前駆細胞は、進行中の損傷に追いつけず、健康な筋肉が非機能性線維脂肪組織で代替される。

10

【 0 1 0 0 】

D M D において、少年は、早くも 3 歳で筋肉衰弱の徴候が開始する。疾患は、徐々に腕、足及び体幹の骨格筋又は随意筋を衰弱させる。十代初期又はそれより早期までは、少年の心臓及び呼吸筋も罹患する場合がある。 B M D は、 D M D よりもかなり軽度である。これは通常、十代又は成人早期に発症し、経過は D M D と比較すると遅く、かなり予想不可能である( D M D 及び B M D は、殆ど少年に排他的に発症するが、まれに少女にも発症する)。

20

【 0 1 0 1 】

1980 年まで、何れの種類の筋ジストロフィーの原因も、殆ど知られていなかった。1986 年に、 D M D の原因として、ジストロフィン遺伝子欠損が同定された。 B M D は、同一の遺伝子内の異なる突然変異から生じる。 B M D 患者は、幾つかのジストロフィンを有するが、量が不十分であり、又は品質が乏しい。幾つかのジストロフィンを有することは、 B M D の人の筋肉を、 D M D の人と同様に酷く又は急速に変性することから保護する。

20

【 0 1 0 2 】

最近の報告では、 D M D 及び B M D 患者において、 in vivo でミオスタチン機能を遮断又は排除することにより、少なくとも特定の症状を効果的に処置できることが示されている( B o g d a n o v i c h ら、 supra ; W a g n e r ら、 supra )。従って、本発明の L e f t y 誘導体、特にその N - 末端開裂バージョンは、 D M D 及び B M D 患者において、 in vivo でミオスタチンの機能を遮断する代替手段を構成する。

30

【 0 1 0 3 】

同様に、本発明の L e f t y 誘導体、特にその N - 末端開裂バージョンは、筋肉増殖が必要な他の疾患状態に、筋肉量を増大させる有効な手段を提供する。例えば、 G o n z a l e z - C a d a v i d , e t a l . ( supra ) は、ヒトにてミオスタチン遺伝子の発現が除脂肪量と逆相関し、ミオスタチン遺伝子の発現の増大は、 A I D S 消耗症候群を有する人にて体重減少と関連することを報告した。 A I D S 患者のミオスタチンの機能を阻害することにより、完全に排除せずとも、少なくとも特定の A I D S の徴候が緩和され、 A I D S 患者の生活の質が有意に改善される場合がある。

40

【 0 1 0 4 】

ミオスタチン機能の損失は又、栄養摂取の低下なしでの脂肪消失と関連し( Z i m m e r s ら、 supra ; M c P h e r r o n a n d L e e , supra )、本発明の L e f t y 誘導体、特にその N - 末端開裂バージョンは、更に、肥満症及び I I 型糖尿病の発症を遅延又は予防する治療薬として使用される場合がある。 L e f t y 誘導体は、ミオスタチンと関連がない理由により、肥満症に影響を及ぼす場合があることも留意るべきである。

【 0 1 0 5 】

癌食欲不振 - 悪液質症候群は、癌の最も衰弱性の、且つ生命を脅かす態様である。癌食

50

欲不振 - 悪液質症候群における進行性の体重減少は、多種の癌にて共通する特徴であり、乏しい生活の質及び化学療法に対する乏しい応答だけでなく、体重減少を伴わない同様の腫瘍を有する患者に見出される生存期間と比較して短い生存期間の原因もある。食欲不振、脂肪及び筋肉組織の萎縮、精神的苦痛、並びにより低い生活の質に関連して、悪液質は、癌と宿主との間の複雑な相互作用から発生する。これは癌患者の間で最も普遍的な死因の1つであり、死の80%に存在する。悪液質は、タンパク質、炭水化物、及び脂肪代謝に作用する代謝カオスの複合例である。腫瘍は、間接異常及び直接異常の両方を生成し、食欲不振及び体重減少を引き起こす。現在、この過程を制御又は逆転する処置は、全く存在しない。

## 【0106】

10

癌食欲不振 - 悪液質症候群は、サイトカイン産生、脂質動員及びタンパク質分解誘導因子の放出、並びに中間代謝の変化に影響を与える。食欲不振は一般的であるが、摂食の減少単独では、癌患者に見られる身体組成物の変化の原因となり得ず、栄養摂取の増大は、消耗症候群を逆転し得ない。悪液質は、6ヶ月の期間内に、発病前の体重の5%を超える不随意の体重減少が起こる場合、癌の患者に疑う必要がある。

## 【0107】

20

成体マウスにおけるミオスタチンの全身の過剰発現が、ヒト悪液質症候群に見出されるものと類似する筋肉及び脂肪損失を誘導することが見出されたことから (Zimmersら、supra)、医薬組成物としての本発明のLefty誘導体、特にそのN-末端開裂バージョンは、筋肉増殖が所望される悪液質症候群の症状を予防、処置、又は緩和するための、ミオスタチン拮抗物質 / 遮断薬として有利に使用される場合がある。

## 【0108】

特定の実施形態において、本発明のLeftyポリペプチドは、神経変性に関する疾患の宿主の症状の予防、処置、又は緩和に有利に使用される場合がある医薬組成物の製造に使用される場合がある。医薬組成物としての本発明のLeftyポリペプチドは、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ハンチントン病等を含む神経変性を伴う疾患の症状の予防、処置、又は緩和に有利に使用される場合がある。

## 【0109】

30

アルツハイマー病 (AD) は、徐々に発生して、記憶損失、異常行動、人格変化、及び思考能力の低下に至る、慢性且つ不治の、制止不可能な中枢神経系 (CNS) 疾患である。これらの損失は、特定のタイプの脳細胞の死、及びそれら間の接続の崩壊に関連する。

## 【0110】

40

ADは、幼児期の発達の逆として説明されている。ADを有する殆どの患者にて、症状は60歳以後に出現する。最も早期の症状は、近時記憶の損失、誤った判断、及び人格の変化を含む。疾患の後期になると、AD患者は、手を洗うというような単純な作業の方法を忘れる場合がある。最終的には、AD患者は、全ての推論能力を失い、毎日の世話に関して他人に依存するようになる。そして遂に、疾患は寝たきりになるほど患者を衰弱させ、通常は共存疾患を発症させる。AD患者の殆どは、通常、疾患発症から8~20年後に、肺炎で死亡する。

## 【0111】

パーキンソン病 (PD) は、徐々に発生して、制御されない身体の動き、強剛性、振戦、及び歩行困難に至る慢性且つ不治の、制止不可能なCNS疾患である。これら運動ニューロン系の問題は、筋肉活性の制御を補助する化合物であるドーパミンを生成する脳の領域内の、脳細胞の死に関連する。

## 【0112】

50

PDを有する殆どの人にて、症状は50歳以後に出現する。PDの最初の症状は、手又は唇で顕著な、四肢に発症する重度の振戦である。続くPDの特徴的 symptom は、硬直又は動きの遅さ、引きずり歩行、前屈姿勢、及び平衡障害である。例えば記憶損失、痴呆症、鬱、感情変化、嚥下困難、異常発語、性機能不全、並びに膀胱及び腸管障害等の種々の二次

症状がある。これらの症状は、例えばフォークを掴む又は新聞を読む等の日常的活動を妨げ始める。最終的に、P D の人は、寝たきりとなる程、重度の身体障害者となる。P D の人は、通常、肺炎により死亡する。

【 0 1 1 3 】

筋萎縮性側索硬化症 ( A L S ; ルー・ゲーリック病 ; 運動ニューロン疾患 ) は、脳を骨格筋と接続する C N S の構成要素である運動ニューロンを攻撃する、慢性且つ不治の、制止不可能な C N S 疾患である。 A L S において、運動ニューロンは悪化して最終的に死に至り、患者の脳が完全な機能を維持し俊敏であっても、動佐の命令は、筋肉に決して到達しない。

【 0 1 1 4 】

A L S 患者の殆どは、40 ~ 70 歳である。衰弱する最初の運動ニューロンは、腕又は足に至るニューロンである。 A L S 患者は、歩行が困難になり、物を落とし、転倒し、発語が不明瞭になり、笑い又は涙が止まなくなる場合がある。最終的には、四肢の筋肉が、不使用から萎縮を開始する。この筋肉弱化は衰弱となり、患者は車椅子が必要となり、又は床の外で働くことが不可能となる。殆どの A L S 患者は、疾患発症から 3 ~ 5 年後に、呼吸不全、又は肺炎のような心室補助装置の合併症から死亡する。 A L S 徴候は、筋肉機能の損失に関連するため、例えば抗ミオスタチン処置等、筋肉線維増殖又は保持を高める処置が有効である場合がある。

10

【 0 1 1 5 】

これら神経疾患の原因は、殆どが未知のままである。これらは従来より、異なる疾患として定義されているが、基本的過程において非常な類似性を明白に示し、通常、偶然のみで、予想されるよりも相当重複した症状を示す。現在の疾患の定義は、神経変性疾患の重複の問題に適切に対処しておらず、新しい分類が必要とされる。

20

【 0 1 1 6 】

ハンチントン病 ( H D ) は、脳の特定の領域内の神経の、遺伝的にプログラムされた変性から生じる他の神経変性疾患である。この変性は、制御されない動き、知的能力の損失、及び感情障害を引き起こす。 H D は、野生型遺伝子内のドミナントな突然変異を介して親から子へ受け渡される家族性疾患である。 H D の幾つかの初期症状は、気分変動、鬱、易刺激性、又は運動、新しい物事の学習、事実の記憶、若しくは決心における障害である。疾患が進行するにつれて、知的作業への集中が次第に困難になり、患者は自身で摂食及び嚥下できなくなる場合がある。疾患の進行速度及び発症年齢は、人により異なる。

30

【 0 1 1 7 】

ティ・サックス病及びサンドホフ病は、リソソーム性 - ヘキソサミニダーゼの欠乏を原因とする糖脂質貯蔵疾患である ( G r a v e l ら、 M e t a b o l i c B a s i s o f I n h e r i t e d D i s e a s e , e d s . S c r i v e r ら、 M c G r a w - H i l l , N e w Y o r k , p p . 2 8 3 9 - 2 8 7 9 , 1 9 9 5 ) 。両疾患において、 G M 2 ガングリオシドと、 - ヘキソサミニダーゼの関連する糖脂質基質が神経系内に蓄積し、急性神経変性を引き起こす。最も重篤な形態では、症状の発症は、幼児期の早期に開始する。次いで、罹患した幼児は、運動不全、てんかん、視力損失、及び聴覚損失を示し、急峻な神経変性過程が後続する。死は、通常 2 ~ 5 歳までに起こる。

40

アポトーシス機序を介したニューロンの消失が示されている ( H u a n g ら、 H u m . M o l . G e n e t . 6 : 1 8 7 9 - 1 8 8 5 , 1 9 9 7 ) 。

【 0 1 1 8 】

免疫系内の A I D S 発病にアポトーシスが役割を果たすことが周知である。しかし、 H I V - 1 は、神経疾患も誘導する。 S h i 等 ( J C l i n . I n v e s t . 9 8 : 1 9 7 9 - 1 9 9 0 , 1 9 9 6 ) は、 i n v i t r o モデルで及び A I D S 患者からの脳組織内で、 H I V - 1 感染により誘導される中枢神経系 ( C N S ) のアポトーシスを試験し、 i n v i t r o で神経細胞及び星状細胞内で、一次脳培養物の H I V - 1 感染がアポトーシスを誘導することを見出した。神経細胞及び星状細胞のアポトーシスは、 H I V - 1 痴呆症の 5 / 5 患者、及び認知障害のない患者 4 / 5 を含む 1 0 / 1 1 A I

50

D S 患者からの脳組織内でも検出された。

【 0 1 1 9 】

ニューロン欠損は、例えばヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病、牛の B S E (狂牛病)、羊の及び山羊のスクレイピー疾患、並びに猫海綿状脳症 ( F S E ) 等のプリオン疾患の顕著な特徴である。

【 0 1 2 0 】

本発明の L e f t y ポリペプチドは、例えば以下に記載する疾患等、種々の P N S 疾患の徴候の予防、処置、及び緩和に有用である。P N S は、C N S に至り又はC N S から分岐する神経から構成される。末梢神経は、感覚、運動、及び自律機能を含む、身体内での多様な機能を扱う。個体が末梢神経障害を有する場合、P N S の神経が損傷されている。神経損傷は、疾患、物理的傷害、中毒、又は栄養障害等の幾つかの原因から生じる可能性がある。これらの因子は、求心性又は遠心性神経に作用する場合がある。傷害の原因に応じて、神経細胞軸索、その保護ミエリン鞘、又は両方が傷害又は破壊される場合がある。

10

【 0 1 2 1 】

末梢神経障害という用語は、脳及び脊髄外の神経 - 末梢神経 - が損傷されている広範な疾患を包含する。末梢神経障害は、末梢神経炎と呼ばれる場合もあれば、多数の神経が関与する場合、多発神経障害又は多発神経炎という用語が使用される場合もある。

20

【 0 1 2 2 】

末梢神経障害は、広範な疾患であり、多数の内在する原因が存在する。これら原因の幾つかは、例えば糖尿病等、一般的であり、他は、例えばアクリルアミド中毒及び特定の遺伝性疾患等、非常にまれである。末梢神経障害の世界中で最も一般的な原因是、ハンセン病である。ハンセン病は、罹患した人々の末梢神経を攻撃する細菌 *M y c o b a c t e r i u m l e p r a e* を原因とする。世界保健機関が収集した統計によれば、世界中でおよそ 1.15 百万人がハンセン病を有する。

30

【 0 1 2 3 】

糖尿病が末梢神経障害の最も良く知られる原因となっている米国では、ハンセン病は非常にまれな疾患である。欧米では、17百万人を超える人が、糖尿病関連の多発神経障害を有すると概算されている。多くの神経障害は突発性であり、その原因は不明である。米国で最も一般的な遺伝性末梢神経障害は、約 125,000 人が罹患しているシャルコ・マリー・トゥース病である。

30

【 0 1 2 4 】

より周知の他の末梢神経障害は、例えばサイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウィルス、及びヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) 等のウイルス疾患、又はカンピロバクター・ジェジュニ及びライム病を含む細菌感染に関連した合併症から生じるギラン・バレー症候群である。世界での発症率は、年間、100,000 人中約 1.7 人である。末梢神経障害のその他の周知の原因には、慢性アルコール症、水痘退場痘瘍ウイルス、ボツリヌス中毒、及び灰白隋炎の感染が含まれる。末梢神経障害は、一次症状として発生する場合もあれば、別の疾患が原因となる場合もある。例えば、末梢神経障害は、例えばアミロイド神経障害、特定の癌、又は遺伝性神経性疾患等の疾患の唯一の症状である。このような疾患は、末梢神経系 ( P N S ) 及び中枢神経系 ( C N S ) 、並びにその他の身体組織を冒す場合がある。

40

【 0 1 2 5 】

本発明の L e f t y 誘導体、特に N - 末端開裂 L e f t y 誘導体で処置可能な他の P N S 疾患には、腕神経叢障害 ( 頸部及び第 1 胸根、神経幹、索、及び腕神経叢の末梢神経成分の疾患 ) が含まれる。臨床的症状には、局所疼痛、錯覚；筋脱力、及び上肢の感覚低下が含まれる。これらの疾患は、出生時外傷を含む外傷；胸郭出口症候群；新生物、神経炎、放射線療法；及びその他の病態 ( A d a m s ら、 P r i n c i p l e s o f N e u r o l o g y , 6<sup>th</sup> e d , p p 1 3 5 1 - 2 を参照 ) ；糖尿病性神経痛 ( 糖尿病に関連する末梢、自律、及び脳神経疾患 ) に関連する場合がある。これらの病態は、通常、神経を供給する小血管 ( 神経の脈管 ) に関与する糖尿病性微小血管障害から生じる。

50

糖尿病性神経痛に関連する場合がある比較的一般的な病態には、第三脳神経麻痺；単神経障害；多神経障害；糖尿病性筋萎縮症；有痛性の多発神経障害；自律神経障害；及び胸腹部神経障害 (Adamsら、Principles of Neurology, 6th ed, pi 325 を参照)；分離した単一末梢神経に関与する単神経障害 (疾患若しくは外傷、又は末梢神経障害拡散の証拠の不釣り合いである。多発性単神経炎は、多数の分離した神経損傷により特徴付けられる病態を指す。単神経障害は、虚血；外傷性障害；圧迫；結合組織病；累積外傷性障害；及び他の病態)；神経痛 (末梢神経又は脳神経の経路又は分布に沿って起こる激痛又はうずく痛み)；末梢神経系新生物 (末梢神経組織から生じる新生物。これは、神経線維腫；シュワン腫；顆粒細胞腫瘍；及び悪性末梢神経鞘腫瘍を含む。DeVita Jr.ら、Cancer : Principles and Practice of Oncology, 5th ed, pp 1750-1 を参照)；神経圧迫症候群 (内因又は外因による神経又は神経根の機械的圧迫。これらは、例えばミエリン鞘障害、又は軸索消失による神経インパルスの伝導ブロックから生じ得る。神経及び神経鞘損傷は、虚血；炎症；又は直接的な機械的作用を原因とし得る)；神経炎 (末梢又は脳神経の炎症を示す一般的な用語。臨床的症状は、疼痛；四肢知覚異常；感覚異常；又は感覚過敏 (hyperesthesia) を含む場合がある)；多発神経障害 (複数の末梢神経の疾患。種々の形態は、罹患した神経の種類 (例えば、感覚、運動、又は自律)、神経損傷の分布により (例えば、近位対遠位)、主に罹患した神経成分により (例えば、脱髓対軸索)、病因により、又は遺伝パターンにより分類される) を含めた幅広い原因から生じる場合がある。

10

20

30

## 【0126】

ミオスタチン阻害剤は又、骨増殖、及び骨と筋肉強化の組み合わせを促進し、本明細書に開示するLeftyポリペプチドを、例えば骨粗鬆症、虚弱、低い骨密度、及び腫瘍による骨量の減少等の疾患の処置に有用にする場合もある。

## 【0127】

上記の説明は、それによりLefty誘導体を含むLeftyポリペプチドが、所望の治療効果を達成する場合があると思われる作用機序を提供する一方、これらの効果は、代替的な機序又は幾つかの異なる機序からも生じる場合がある。LeftyポリペプチドがTGF- ファミリーの更なるメンバーを阻害したことから、このような活性が治療効果に寄与する可能性も高い。

## 【0128】

## 5. 代表的な製剤

本発明の組成物は、単独で、又は他の化合物／医薬組成物との共同療法の一部として使用される場合がある。特定の実施形態において、Leftyポリペプチドを含有する薬学的製剤は、関連する規制機関 (例えば、米国内の食品医薬品局) により確立されたガイドラインに順守するであろう。それらの製剤は、通常、実質的に発熱物質を含有しない (pyrogen-free) であろう。

## 【0129】

本発明の方法に使用するためのLeftyポリペプチドは、例えば水、緩衝生理食塩水、ポリオール (例えば、グリセリン、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール及び同様物) 又はそれらの好適な混合物等の生物学的に許容される媒体と共に投与するよう処方される場合がある。選択した媒体中の活性成分 (一種又は複数種) の最適濃度は、医薬品化学者に周知の手順に従って経験的に決定することができる。本明細書で使用される「生物学的に許容される媒体」は、薬学的製剤の所望の投与経路に適切である場合がある任意の及び全ての溶媒、分散媒体、及び同様物を含む。薬学的に活性な物質のためのそれら媒体の使用は、当該技術分野で既知である。任意の従来の媒体又は薬剤は、ホスホペプチド治療薬の活性と適合しない場合を除き、本開示内容の薬学的製剤中でのその使用が想定される。好適なビヒクリル及び他のタンパク質を含むそれらの製剤は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Pu

40

50

blushing Co., Easton, Pa., USA 1985) に記載されている。これらのビヒクルは、注射用の「沈殿製剤 (deposit formulations)」を含む。

#### 【0130】

本開示内容の薬学的製剤は、獣医用組成物、例えば家畜(雌牛、羊、山羊、豚、及び馬等)又は家庭内動物、例えば猫及び犬の処置に好適な Lefty 治療薬の薬学的製剤も含む場合がある。

#### 【0131】

本開示内容の方法は、再充填型又は生分解性デバイスによっても提供される場合がある。近年、タンパク性生物製剤を含む薬物の制御送達のための種々の遅延放出ポリマー-デバイスが開発され、in vivo で試験されている。生分解性及び非分解性ポリマーの両方を含む多様な生体適合性ポリマー(ハイドロゲルを含む)を使用して、特定の標的部位で治療薬を持続放出する移植片を形成することができる。

10

#### 【0132】

本開示内容に従った医薬組成物は、単一用量として又は多数回用量で投与される場合がある。本開示内容の医薬組成物は、個々の治療薬として、又はその他の治療薬との組み合わせで投与される場合がある。本開示内容の処置は、連続的に又は同時に投与される場合がある従来の治療薬と組み合わせてもよい。本開示内容の医薬組成物は、Lefty ポリペプチドを標的細胞/組織/器官へ到達させる任意の手段により投与される場合がある。幾つかの実施形態において、投与経路は、経口、膀胱内、静脈内、動脈内、腹腔内、標的細胞が存在する器官の血液供給への局所投与、又は細胞への直接投与からなる群から選択される。好み投与モードは、静脈内投与である。静脈内投与は、輸液ポンプの補助により達成される場合がある。

20

#### 【0133】

本明細書で使用される「非経口投与」及び「非経口的に投与」という用語は、腸内及び局所投与以外の、通常、注入による投与モードを意味し、静脈内、筋内、動脈内、くも膜下腔内、囊内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、皮膜下、くも膜下、髄腔内及び胸骨内 (intrasternal) 注入及び点滴を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0134】

本明細書で使用される「全身投与」、「全身に投与」、「末梢投与」及び「末梢的に投与」という用語は、化合物、薬物又は他の物質が中枢神経系に直接ではなく投与され、患者の系に入って代謝及び他の同様の過程を受ける、例えば皮下投与を意味する。

#### 【0135】

これらの化合物は、口腔及び舌下を含む、経口、膀胱内、例えば噴霧による経鼻的、直腸的、経膣的、非経口的、大槽内及び局所的、粉末として、軟膏又は液滴による投与を含めた何れかの好適な投与経路により、ヒト及び他の動物に治療のために投与される場合がある。

#### 【0136】

選択される投与経路に係わらず、好適な水和形態で使用される場合がある本開示内容の化合物、及び/又は本開示内容の医薬組成物は、例えば以下に記載する薬学的に許容される剤形に、又は当業者に既知の他の従来の方法により調製される。

40

#### 【0137】

本開示内容の医薬組成物中の活性成分の実際の用量レベルは、特定の患者において該患者に毒性を付与せずに、所望の治療応答、組成物、及び投与モードを達成するに有効な活性成分の量を得るように改変される場合がある。

#### 【0138】

選択される用量レベルは、使用する本開示内容の特定の化合物、又はそのエステル、塩若しくはアミドの活性、使用する特定の化合物の投与経路、投与時間、排泄速度、処置の持続時間、使用する特定のホスホペプチド治療薬との組み合わせで使用される他の薬物、

50

化合物及び／又は材料、処置する患者の年齢、性別、体重、病態、一般的健康及び以前の病歴、並びに医学分野で周知の同様の因子を含む種々の因子に依存するであろう。

【0139】

当該技術分野の医師又は獣医は、必要な医薬組成物の有効量を容易に決定及び処方することができる。例えば、医師又は獣医は、所望の治療効果を達成するために、医薬組成物中に使用される本開示内容の化合物の投与を、必要とするより低いレベルで開始して、所望の効果が達成されるまで、用量を徐々に増加させる。

【0140】

一般的に、本開示内容の化合物の好適な一日用量は、治療効果を生じるに有効な最低用量である化合物の量であろう。このような有効用量は、概して上述した因子に依存するであろう。一般的に、患者のための本開示内容の化合物の静脈内、脳室内及び皮下用量は、体重1キログラム当たり約0.0001～約100mg／日の範囲であろう。

10

【0141】

所望であれば、活性化合物の一日有効用量を、2、3、4、5、6又はそれ以上のサブ用量として、場合により単位剤形で、一日を通して適切な間隔にて別々に投与してもよい。

【0142】

「処置」という用語は、予防、治療及び治癒も包含することを意図する。

【0143】

この処置を受ける患者は、一般的に靈長類、特にヒト、並びに例えば馬、牛、豚及び羊等の他の非ヒト哺乳動物；並びに家禽類及びペットを含む、処置を必要とする任意の動物である。

20

【0144】

本開示内容の化合物は、そのまま又は薬学的に許容される担体との混合物で投与してもよく、例えばペニシリン、セファロスポリン、アミノグリコシド及びグリコペプチド等の他の抗菌薬と併せて投与してもよい。従って、併用療法は、最初に投与した1つの治療薬の効果が、続く1つの投与時に完全に排除されていない、活性化合物の連続、同時及び個別投与を含む。

【0145】

一般的に、本明細書に使用した用語、及び本開示内容にて使用した研究室での手順は、分子、生化学、微生物学及び組換えDNA技法を含む。それらの技法は、文献に完全に説明されている。例えば、全て参照により本明細書に組み入れられる以下を参照されたい。

“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrookら、(1989)；“Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)；Ausubelら、“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)；Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988)；Watsonら、“Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York；Birrenら、(eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)；米国特許第4,666,828号；米国特許第4,683,202号；米国特許第4,801,531号；米国特許第5,192,659号及び米国特許第5,272,057号；“Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Celis, J. E., ed. (1994)；“Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Colig

30

40

50

an J. E., ed. (1994); Stitesら (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980) に開示されている方法体系; 利用可能なイムノ試験は、例えば米国特許第3,791,932号; 米国特許第3,839,153号; 米国特許第3,850,752号; 米国特許第3,850,578号; 米国特許第3,853,987号; 米国特許第3,867,517号; 米国特許第3,879,262号; 米国特許第3,901,654号; 米国特許第3,935,074号; 米国特許第3,984,533号; 米国特許第3,996,345号; 米国特許第4,034,074号; 米国特許第4,098,876号; 米国特許第4,879,219号; 米国特許第5,011,771号及び米国特許第5,281,521号; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. L., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, Calif. (1990); Marshakら, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996) の特許及び科学文献に広範に記載されている。本明細書を通して、他の一般的な参考文献が提供されている。それらに記載されている手順は、当該技術分野で周知と思われ、読者の利便性のために提供する。それらに含まれる全情報は、参照により本明細書に組み入れられる。  
10  
20  
30

【実施例】

【0146】

本発明を一般的に説明し、本発明は、特定の実施形態及び本発明の実施形態の例示のみを目的として含まれ、本発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照することにより容易に理解されるであろう。

【0147】

(実施例1 Leftyポリペプチドの構築、発現及び精製)

図6に記載した種々のLefty-AコンストラクトをpAID4ベクター内にサブクローニングし、プラスミドcDNAを、リポフェクタミン法により、Cos細胞内に一過的にトランスフェクト(10ug DNA)した。6時間後、増殖培地を加えた。24時間後、培地を血清フリー培地と交換し、48時間後に回収した。遠心分離後、上清を収集し、-20に保持した。  
40

【0148】

生成及び試験したコンストラクトは、Lefty-Aシグナル配列を蜜蜂メラチン配列で置き換えている。以下のLefty-A配列は、34kDa(長い)形態の発現のためのメラチンに融合された:

【0149】

## 【化14】

LTEEQLLGSLLRQLQLSEVPVLDRADMEKLVIPAHVRAQYVVLRRSHGDR  
 SRGKRFSQSFRREVAGRFLASEASTHLLVFGMEQLPPNSELVQAVLRLFQEP  
 VPKAALHGHGRRLSPRSAQARVTVEWLRVRDDGSNRTSLIDSRLVSVHESGW  
 KAFDVTEAVNFWQQLSRPRQPLLLQSVQREHLGPLASGAHKLVRFASQG  
 APAGLGEPEQLELHTLDLRDYGAQGDPEAPMTEGTRCCRQEMYIDLQGM  
 KWAKNWVLEPPGFLAYECVGTCCQPPEALAFNWPFLGPRQCIASETASLPM  
 IVSIKEGGRTRPQVVS LPNMRVQKCSCASDGALVPRRLQP

10

太字の「F」は、成熟34kDa形態の予想される第1のアミノ酸を指す。下線を引いた「G」は、第2のRXXR開裂部位を排除するR-G改变部位を示す。

## 【0150】

以下の配列は、Lefty-Aの28kDa(短い)形態の発現のためのメラチンリーダーに融合された:

## 【0151】

## 【化15】

LSPRSAQARVTVEWLRVRDDGSNRTSLIDSRLVSVHESGWKAFDVTEAVNF  
 WQQLSRPRQPLLLQSVQREHLGPLASGAHKLVRFASQGAPAGLGEPEQLEL  
 HTLDLRDYGAQGDPEAPMTEGTRCCRQEMYIDLQGMKWAKNWVLEPP  
 GFLAYECVGTCCQPPEALAFNWPFLGPRQCIASETASLPMIVSIKEGGRTRPQ  
 VVSLPNMRVQKCSCASDGALVPRRLQP

20

図6に記載した種々のFc融合は、上記の「Lefty 34」及び「Lefty 28」コンストラクトに基づき生成された。

## 【0152】

(実施例2 Lefty-Aポリペプチドは、ミオスタチンに結合する)

Leftyコンストラクトを使用して、Biacoreチップ分析を行った。GDF-11は、神経過程を調節するミオスタチンの密接したホモログである。標準的なアミン結合手順を使用して、GDF-11をBiacore CM5チップ上に固定化した。図7に示す通り、各Leftyコンストラクトは、ミオスタチンに結合する。

30

## 【0153】

本明細書に言及した全ての刊行物及び特許は、個々の各刊行物又は特許が特に及び個別に参照により組み入れられることを示すかのように、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0154】

主題の特定の実施形態を説明してきたが、上記の説明は例示であり、網羅的なものではない。当業者には、本明細書及び特許請求の範囲を検討することにより、多数の改変が明白となるであろう。本発明の完全な範囲は、特許請求の範囲をその等価物の完全な範囲と共に、明細書をそれらの改変と共に参照して決定するべきである。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0155】

【図1】BMP-7の構造に基づいた、TGF-スーパーファミリーのメンバーの保存システインノット構造の概略図である。構造のコアを形成するシステインは、C1~C6として示す。このファミリーの従来の受容体リガンドメンバーでは、ループA及びループBが、II型受容体への結合を媒介するのに対し、C3とC4間の領域は、ヘリックス、並びに二量体化及びI型受容体への結合を媒介するその他のアミノ酸を含む。C3とC4間の領域は、単量体間のジスルフィド結合の形成に不可欠なシステインも含む。リган

50

ド結合「トラップ」のDanファミリーでは、ループA及びループBが、標的BMPリガンドへの結合に関与するのに対して、C3とC4間の領域は、一般的に受容体リガンド内の領域よりも小さい。本明細書に記載の通り、Leftyタンパク質は、この構造上にマッピングされ、5つの機能的領域に分割される場合がある。領域1は、C1(システインノットドメインの第1システイン)のN-末端である成熟ポリペプチドの部分である。領域2及び領域4は、ループA及びループBに対応し、リガンド結合(例えばNodal、ミオスタチン及びGDF-11等のリガンド)に関与する。Leftyタンパク質の領域3は、ヘリックス、及び分子間架橋に関与するシステインを有さない。領域5は、システインノットドメインの最終システインのC-末端である部分である。

【図2】TGF- ファミリーの幾つかのメンバーのシステインノットドメインの配列を示す。PDRC、Gremlin、Cerberus及びNogginは、TGF- ファミリーの種々の受容体リガンドメンバーに結合して、これらの活性を阻害するタンパク質である、リガンド「トラップ」グループのメンバーである。BMP-2、GDF-8及びTGF- は、ジスルフィド架橋二量体を形成して、I型及びII型受容体媒介シグナル伝達を結合及び活性化する、従来の受容体リガンドである。真ん中に示すLeftyは、Leftyポリペプチドである。BMP受容体リガンド内におけるII型受容体の結合を媒介する、ループA及びループBに対応する領域には、下線が引いてある。「二量体化ループ」に対応する領域には、上線が引いてあり、四角の囲みは、BMP-2のI型受容体結合ヘリックスを示す。単量体 - 単量体ジスルフィド結合形成に関するシステインは、赤色で示す。注目すべき点として、二量体化ループは、Lefty又はトラップファミリーメンバーよりもBMP-2、GDF-8及びTGF- において長い。保存システインは、緑色で示す。これら各配列の配列番号は、以下の通りである：PDRC(配列番号17)；Gremlin(配列番号18)；Cerberus(配列番号19)；Dan(配列番号20)；Noggin(配列番号21)；ヒトLefty A(配列番号22)；BMP-2(配列番号23)；GDF-8(配列番号24)；TGF- (配列番号25)。

【図3】ヒトLefty - A及びLefty - B並びにマウスLefty - 1及びLefty - 2からなるLeftyタンパク質の配列を示す。シグナルペプチド、RXR開裂部位(プロペプチドC-末端の印となる部位)、システインノットの保存システイン(「C」)、及びヒトの障害(R314K5、S342K)に関連した配列改変の位置に対応する領域を示す。配列番号1～4。

【図4】ヒトLefty A及びLefty Bアミノ酸配列(それぞれ、NCBIRefSeq ID NP\_003231及びNP\_066277；それぞれ、配列番号1及び配列番号2)を示す。シグナル配列には、点線で下線が引いてある。RXR開裂部位は、下線が引いてある。システインノットドメインには、二重下線が引いてある。

【図5】第1のRXR開裂部位における開裂により得られたヒトLefty A及びLefty Bの34kDa成熟形態のアミノ酸配列を示す(それぞれ、配列番号9及び配列番号10)。図1に示したような領域1～5を示す。領域1及び領域5には、破線で下線が引いてある。領域2及び領域4には、一重下線が引いてある。領域3には、二重下線が引いてある。網掛けを付けた領域は、Nodal、ミオスタチン及び/又はGDF-11阻害活性を保持するLefty変異体を生成する際に修飾又は削除する場合がある領域に対応する。

【図6】調製後にミオスタチン結合に関して試験を行った種々のヒトLefty Aコンストラクトを示す概略図である。大きい方の形態(34kDa、即ち「Lefty 34」)は、第2のRXR開裂部位を不活性化する改変を含んでいた。天然のシグナル配列は、(そのC-末端の2つのアラニン残基と共に)蜜蜂メラチンリーダー配列で置き換えられた。短い方の形態(28kDa、即ち「Lefty 28」)は、第2のRXR開裂配列の直前のロイシンで開始される、アミノ末端にて切断したLefty配列に続くメラチンリーダー配列を含んでいた。N-及びC-末端のFc融合は、図示の通り調製した。

10

20

30

40

50

【図7】Biacore<sup>TM</sup>結合試験のデータを示す。GDF-11をBiacoreチップに固定化し、このチップにより種々のLeftyコンストラクトを発現する細胞由来のならし培地を継代培養した。上昇する曲線は、タンパク質の結合を示しており、この曲線はその後の洗浄段階で下降している。対照試料は、結合を殆ど又は全く示していない。これらのデータは、Lefty 34及びLefty 28が、ミオスタチンに直接結合することを示している。

【図1】

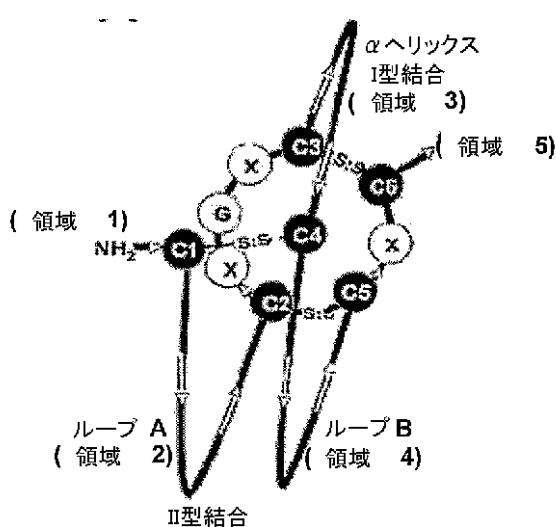


Figure 1

【図2】

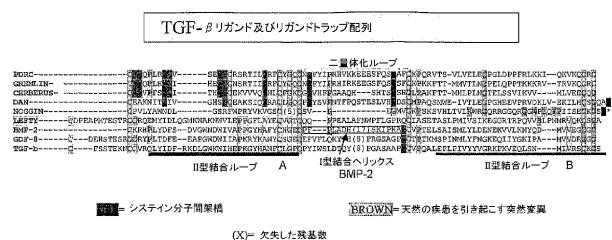


Figure 2

【図3】

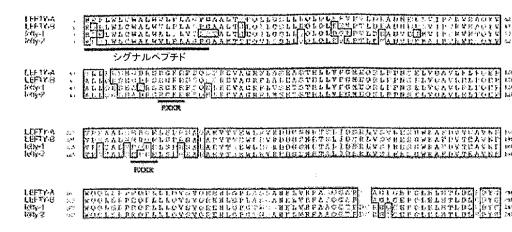


Figure 3

## 【図4】

ヒトLefty-A タンパク質 (NCBI RefSeq ID NP\_003231):

```

1 MWPLNLQWAI WVLPLLAGPGLA ALTERQLLGS LLRQLQLSEV PVLDRADMEK LIVIPAHVRAQ
61 YVALLQLRSHG DRSGKGRPSQ SFKEVAGRPL ASEAATHLLV PGMEQLPPN SELVQAVLRL
121 PQEPVVKAAI HRRGRLSPRS AQRARVTVEWL RVDDGGSNRT SLIDSLRLSVH HESGWKAQDV
181 TEAVNFWQQD SRPFPQLLQ VSQREHSLGP LASGAHKLVR PASQQAPAGL GEPOLELHTL
241 DLQDYGAGGD CDEPAPMTEG TRCCRQEMYI DLQGMKWAEN WVLBEPGFLA YECVGTQCOQ
301 PEALAPNQPF LGPROCIASE TASLPMIVSI KEGGTRKPOV VSLPNMVRQK CSCASGALV
361 PRRLQP

```

ヒトLefty-B タンパク質 (NCBI RefSeq ID NP\_066277):

```

1 MQPLNLQWAI WVLPLASPGV ALTGEQLLGS LRLQIQLKEV PTLDRADMEW LVIPTHVRAG
61 YVALLQLRSHG DRSGKGRPSQ SFKEVAGRPL ASEAATHLLV PGMEQLPPN SELVQAVLRL
121 PQEPVVKAAI HRRGRLSPRS AQRARVTVEWL RVDDGGSNRT SLIDSLRLSVH HESGWKAQDV
181 TEAVNFWQQD SRPFPQLLQ VSQREHSLGP LASGAHKLVR PASQQAPAGL GEPOLELHTL
241 DLQDYGAGGD CDEPAPMTEG TRCCRQEMYI DLQGMKWAEN WVLBEPGFLA YECVGTQCOQ
301 PEALAPNQPF LGPROCIASE TDSDLMLIVSI KEGGTRKPOV VSLPNMVRQK CSCASGALV
361 PRRLQP

```

Figure 4

## 【図5】

ヒトLefty-A タンパク質 (34 kDa 成熟形態):

```

1 FSQSFREVGAG RFLASEASTH LLVFGMEOQL PPNSELVQAVL RLRFLQEPVPK AALHRHGRLL
61 PRSAQARVTVW EWLVRVDDGNS NRTSLIDSRVLSVHESGWKAQDV (領域 1)
121 LLQVSQREH LGPLASGAKL LVRFASQGAP AGLGEPOLEL HTLDLRLDYGA QGDCDPEAPM
181 TEGTRCCRQEMYI DLQGMKWAEN WVLBEPGFLA YECVGTQCOQ (領域 2) (領域 3)
241 ASETASLPM_ VS1KEGGRTT PQQVSLPNMR VQKCSASCSDG ALVPRRLQP (領域 4) (領域 5)

```

ヒトLefty-B タンパク質 (34 kDa 成熟形態):

```

1 FSQSFREVGAG RFLASEASTH LLVFGMEOQL PPNSELVQAVL RLRFLQEPVPK AALHRHGRLL
61 PRSARARVTVW EWLVRVDDGNS NRTSLIDSRVLSVHESGWKAQDV (領域 1, 続き)
121 LLQVSQREH LGPLASGAKL LVRFASQGAP AGLGEPOLEL HTLDLRLDYGA QGDCDPEAPM
181 TEGTRCCRQEMYI DLQGMKWAEN WVLBEPGFLA YECVGTQCOQ (領域 2) (領域 3)
241 ASETDSLPM_ VS1KEGGRTT PQQVSLPNMR VQKCSASCSDG ALVPRRLQP (領域 4) (領域 5)

```

Figure 5

## 【図6】

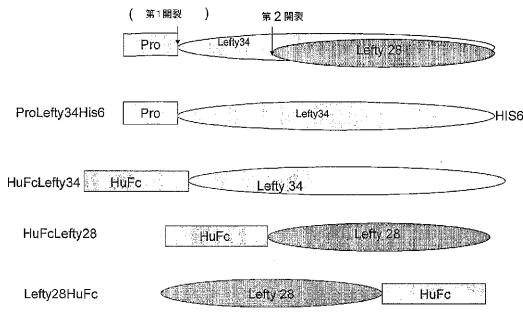


Figure 6

## 【図7】

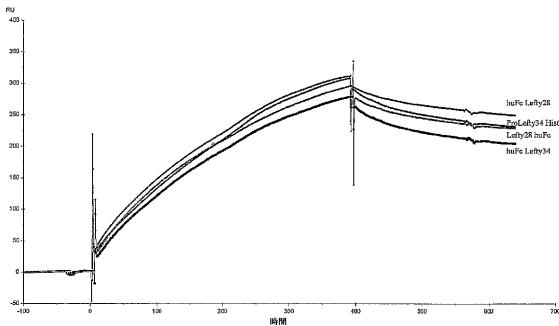


Figure 7

【手続補正書】

【提出日】平成20年2月27日(2008.2.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009502121000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/026443

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOSAKI K ET AL: "Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, US, vol. 64, no. 3, May 1999 (1999-05), pages 712-721, XP002102239 ISSN: 0002-9297 figures 2,3 & DATABASE NCBI 17 November 2006 (2006-11-17), "Homo sapiens left-right determination factor 1 (LEFTY1), mRNA" retrieved from EBI Database accession no. NM_020997.2 the whole document -/-	1,2,4-9, 13, 20-25,28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* 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 document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 March 2007	10/04/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Turri, Matteo	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/026443

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>&amp; DATABASE EMBL  17 November 2006 (2006-11-17), "Homo sapiens left-right determination factor 2 (LEFTY2), mRNA"  retrieved from EBI  Database accession no. NM_003240  the whole document</p> <p>WO 02/12336 A2 (CURIS INC [US]; WANG MONICA [US]; PANG KEVIN [US])  14 February 2002 (2002-02-14)  sequence 9</p>	1,2,4-9
P,A	<p>LAPRAZ FRANCOIS ET AL: "RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome"  DEVELOPMENTAL BIOLOGY,  vol. 300, no. 1, December 2006 (2006-12),  pages 132-152, XP002425119  ISSN: 0012-1606</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/US2006/026443**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 37-42 and 44-47 are directed to a method of treatment practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/026443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0212336	A2 14-02-2002	AU 3809101 A	18-02-2002

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (April 2005)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
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 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	

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

(72) 発明者 クノップ, ジヨン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01741, カーライル, ロビンズ ドライブ 147

(72) 発明者 セーラ, ジャスピー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421-6818, レキシントン, リンカーン テラス 3

(72) 発明者 クマール, ラビンドラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, アーリントン ストリート 421

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA07 DA02 GA11

4B064 AG01 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DB52 NA14 ZA02 ZA16

ZA36 ZA42 ZA59 ZA70 ZA75 ZA94 ZA96 ZB26 ZC03 ZC35

ZC42

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA21 FA74