

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7654402号
(P7654402)

(45)発行日 令和7年4月1日(2025.4.1)

(24)登録日 令和7年3月24日(2025.3.24)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/04	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
請求項の数 51 (全117頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-542842(P2020-542842)	(73)特許権者	509125475 アクセルロン ファーマ インコーポレイ テッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , シドニー ス トリート 1 2 8
(86)(22)出願日	平成31年2月8日(2019.2.8)	(73)特許権者	509009692 ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァシテ ィ オブ ミシガン アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 ミシガン州 アナーバー ヒューロン パークウェイ 1 6 0 0 ビルディング 5 2 0 セカンド フロア
(65)公表番号	特表2021-512919(P2021-512919 A)	(74)代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(43)公表日	令和3年5月20日(2021.5.20)		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/017297		
(87)国際公開番号	WO2019/157342		
(87)国際公開日	令和1年8月15日(2019.8.15)		
審査請求日	令和4年2月8日(2022.2.8)		
(31)優先権主張番号	62/666,235		
(32)優先日	平成30年5月3日(2018.5.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/628,649		
(32)優先日	平成30年2月9日(2018.2.9)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 異所性骨化を処置するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

形質転換成長因子 - (T G F) アンタゴニストを含む、異所性骨化 (H O) を処置するための組成物であって、

前記 T G F アンタゴニストが、以下を含む形質転換成長因子 - 受容体 I I (T R I I) 融合ポリペプチドである：

- a . T R I I 細胞外ドメイン部分であって、
 - i) 配列番号 1 の 2 3 ~ 3 5 位のいずれかで開始し、配列番号 1 の 1 5 3 ~ 1 5 9 位のいずれかで終了する配列、または
 - i i) 配列番号 2 の 2 3 ~ 6 0 位のいずれかで開始し、配列番号 2 の 1 7 8 ~ 1 8 4 位のいずれかで終了する配列

と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むもの、

- b . 免疫グロブリン F c ドメインを含む異種部分、並びに
- c . 配列番号 4 ~ 6、2 5 及び 2 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列であるリンカードメイン、

組成物。

【請求項2】

前記異所性骨化が、脊髄損傷、外傷、脳損傷、熱傷、骨折、筋肉挫傷、関節形成術 / 関節置換術、股関節手術 / 人工股関節置換術、寛骨臼手術 / 寛骨臼置換術、肘の骨折、下腿の長骨の骨折、戦闘関連外傷、肢切断、成人の呼吸促進症候群を管理するために使用され

る神経筋遮断、非外傷性脊髄症からなる群から選択される1つもしくは複数の障害または状態と関連する、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

異所性骨化が、骨、皮膚、皮下組織、骨格筋、関節の近傍の線維症組織、血管壁および靭帯からなる群から選択される1つまたは複数の組織で起こる、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

異所性骨化、進行性骨化性線維異形成症（FOP）、進行性骨性異形成症（POH）または線維性骨異形成症を処置するための追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて投与されることを特徴とし、

前記追加の活性薬剤または支持療法が、イソトレチノイン、エチドロネートと経口コルチコステロイド、マレイン酸ペルヘキシリン、パロパロテン、アクチビン抗体（例えば、REGN 2477などのアクチビンA抗体）、ALK2の対立遺伝子特異的RNA干渉、ビスホスホネート、放射線療法、抗炎症剤（例えば、インドメタシン、イブプロフェンおよびアスピリン）および他動可動域の訓練または他の可動化技術などの保存的処置からなる群から選択される、

請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

前記追加の活性薬剤または支持療法が、アクチビン抗体による処置である、

請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記アクチビン抗体が、アクチビンA抗体である、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記融合ポリペプチドが、配列番号1の23～35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153～159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1から6のいずれかに記載の組成物。

【請求項8】

前記融合ポリペプチドが、配列番号1の23～35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153～159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記融合ポリペプチドが、配列番号1の23～35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153～159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

前記融合ポリペプチドが、配列番号1の23～35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153～159位のいずれか1つで終了するアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項11】

前記融合ポリペプチドが、配列番号2の23～60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178～184位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1から6のいずれかに記載の組成物。

【請求項12】

前記融合ポリペプチドが、配列番号2の23～60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178～184位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記融合ポリペプチドが、配列番号2の23～60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178～184位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 2 の 23 ~ 60 位のいずれか 1 つで開始し、配列番号 2 の 178 ~ 184 位のいずれか 1 つで終了するアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 18 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 16】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の組成物。

10

【請求項 17】

前記 T R I I 細胞外ドメイン部分が、配列番号 1 の 23 ~ 35 位のいずれかで開始し、配列番号 1 の 153 ~ 159 位のいずれかで終了する配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列からなる、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 18】

前記 T R I I 細胞外ドメイン部分が、配列番号 2 の 23 ~ 60 位のいずれかで開始し、配列番号 2 の 178 ~ 184 位のいずれかで終了する配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列からなる、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 19】

前記 T R I I 細胞外ドメイン部分が、配列番号 18 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列からなる、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

20

【請求項 20】

前記免疫グロブリン Fc ドメインが、ヒト免疫グロブリン Fc ドメインである、請求項 1 から 19 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 21】

前記異種部分が、配列番号 49 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 20 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 22】

前記異種部分が、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記リンカードメインが、10 ~ 25 アミノ酸長の間である、請求項 1 から 22 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 24】

前記リンカードメインが、(GGGS)_n (式中、n 5) を含む、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 11 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 26】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 13、65 または 68 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 27】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 15 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 28】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 185 ~ 592 を含まない、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 29】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 22 を含まない、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 30】

前記融合ポリペプチドが、

- a) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む、T R I I 部分の細胞外ドメイン；
- b) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む、異種部分；
- c) 前記細胞外ドメインおよび前記異種部分を連結するリンカードメインであって、配列番号 6 のアミノ酸配列を含むものを含む、

請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 31】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 32】

前記融合ポリペプチドが、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 33】

前記融合ポリペプチドが、リーダー配列を含まないか、または前記リーダー配列が、除去されている、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

前記融合ポリペプチドが、グリコシル化アミノ酸、ペグ化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、および脂質部分とコンジュゲートされたアミノ酸から選択される 1 つまたは複数の改変アミノ酸残基を含む、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 35】

前記融合ポリペプチドが、グリコシル化される、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記融合ポリペプチドが、CHO 細胞におけるポリペプチドの発現のグリコシル化パターン特性を有する、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記融合ポリペプチドが、TGF β 1 および TGF β 3 に結合する、請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 38】

前記融合ポリペプチドが、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、TGF β 1 および TGF β 3 のシグナル伝達を阻害する、請求項 1 から 37 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記融合ポリペプチドが、ホモ二量体である、請求項 1 から 38 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

形質転換成長因子 - (TGF β) アンタゴニストおよびアクチビンアンタゴニストを含む、異所性骨化 (HO) を処置するための組合せ物であって、

40

前記 TGF β アンタゴニストが、以下を含む形質転換成長因子 - 受容体 II (T R I I) 融合ポリペプチドであり：

- a. T R I I 細胞外ドメイン部分であって、
 - i) 配列番号 1 の 23 ~ 35 位のいずれかで開始し、配列番号 1 の 153 ~ 159 位のいずれかで終了する配列、または
 - ii) 配列番号 2 の 23 ~ 60 位のいずれかで開始し、配列番号 2 の 178 ~ 184 位のいずれかで終了する配列

と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含むもの、及び

- b. 免疫グロブリン Fc ドメインを含む異種部分、

ここで前記融合ポリペプチドが、リンカードメインであって配列番号 4 ~ 6、25 及び

50

2.6のいずれか1つのアミノ酸配列を含むものを含み、

前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビン抗体である、
組合せ物。

【請求項41】

前記TGFアンタゴニストが、請求項7から39に定義されるいずれか1つに対応する、請求項40に記載の組合せ物。

【請求項42】

前記アクチビン抗体が、アクチビンAを阻害する、請求項40又は41に記載の組合せ物。

【請求項43】

前記アクチビン抗体が、アクチビンAに結合する、請求項40から42のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項44】

前記TGFアンタゴニストが、TRIIポリペプチドおよびALK5ポリペプチドを含むヘテロ多量体である、請求項1から39のいずれかに記載の組成物または請求項40から43のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項45】

前記TGFアンタゴニストが、TRIIポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチドを含むヘテロ多量体である、請求項1から39のいずれかに記載の組成物または請求項40から44のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項46】

前記TGFアンタゴニストが、ALK5ポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチドを含むヘテロ多量体である、請求項1から39のいずれかに記載の組成物または請求項40から45のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項47】

前記ベータグリカンポリペプチドが、配列番号51もしくは55と少なくとも90%、91%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物活性断片を含む、請求項45または46に記載の組成物または組合せ物。

【請求項48】

前記ALK5ポリペプチドが、配列番号70もしくは74と少なくとも90%、91%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物活性断片を含む、請求項44または46に記載の組成物または組合せ物。

【請求項49】

前記ヘテロ多量体が、ヘテロ二量体である、請求項44から46のいずれか一項に記載の組成物または組合せ物。

【請求項50】

形質転換成長因子 - (TGF)アンタゴニストを含む、異所性骨化(HO)を処置するための組成物であって、アクチビンアンタゴニストと組み合わせて投与されることを特徴とし、

前記TGFアンタゴニストが、以下を含む形質転換成長因子 - 受容体II(TRII)融合ポリペプチドであり：

- a. TRII細胞外ドメイン部分であって、
 - i) 配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列、または
 - ii) 配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了する配列

と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むもの、及び

b. 免疫グロブリンFcドメインを含む異種部分、

ここで前記融合ポリペプチドが、リンカードメインであって配列番号4~6、2.5及び

10

20

30

40

50

2.6のいずれか1つのアミノ酸配列を含むものを含み、

前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビン抗体である、
組成物。

【請求項51】

アクチビンアンタゴニストを含む、異所性骨化（HO）を処置するための組成物であって、形質転換成長因子 - （TGF）アンタゴニストと組み合わせて投与されることを特徴とし、

前記TGFアンタゴニストが、以下を含む形質転換成長因子 - 受容体II（TRII）融合ポリペプチドであり、

a. TRII細胞外ドメイン部分であって、

i) 配列番号1の23～35位のいずれかで開始し、配列番号1の153～159位のいずれかで終了する配列、または

ii) 配列番号2の23～60位のいずれかで開始し、配列番号2の178～184位のいずれかで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むもの、及び

b. 免疫グロブリンFcドメインを含む異種部分、

ここで前記融合ポリペプチドが、リンカードメインであって配列番号4～6、2.5及び2.6のいずれか1つのアミノ酸配列を含むものを含み、

前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビン抗体である、
組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年2月9日に出願された米国仮出願第62/628,649号および2018年5月3日に出願された米国仮出願第62/666,235号の優先権の利益を主張する。前述の出願は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

異所性骨化（HO）は、軟組織における骨外性（extra-skeletal）の骨の病的形成である。Vanden Bossche and Vanderstraeten, J Rehabil Med 27, 129 (2005)。一般に、このプロセスは、広い表面積の熱傷、筋骨格損傷、整形外科手術および脊髄損傷を含む重度の外傷を有する患者集団、ならびに進行性骨化性線維異形成症（FOP）として公知の遺伝性疾患を有する患者集団において起こる。FOPは、I型骨形成タンパク質（BMP）受容体のACVR1における過剰活性化突然変異によって引き起こされ、FOPを有する患者は、任意の実質的な外傷の非存在中で異所性骨病変を発生する。これらの病的な異所性の骨の形成の臨床の続発症は、外傷または遺伝的突然変異の状況に関わらず、非治癒性の創傷、慢性疼痛および関節の非可動性を含む。FOPの場合において、進行性骨化は、胸郭の伸展性の喪失が原因で、死をもたらすことがある。

HOのための処置の選択肢は、骨が、多くの場合、外科的切除後に再発するので、限定されており、一部の患者は、その感覚がある場所に起因して、切除不能のHOを有し得る。手術の危険性は、特に、再発を前にすると、切除の利益を上回り得る。したがって、HOを処置するための有効な治療のための満たされていない高い必要性が存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】Vanden Bossche and Vanderstraeten, J Rehabil Med 27, 129 (2005)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0004】

一部分では、本開示は、TGF アンタゴニスト（阻害剤）が異所性骨化（HO）を処置するために使用することができるという発見に関する。特に、本明細書において提示されるデータは、TGF 1およびTGF 3に結合する可溶性のT R I Iポリペプチドが、HOのマウスモデルにおいて、骨沈着および骨髓腔の形成の減少を伴うHO原基（anlagen）の発生の減弱に有効であることを示す。さらにまた、T R I Iポリペプチドによる処置は、この動物モデルにおいて、成熟HOの体積を顕著に低減させた。任意の特定の機構に拘束されることを望まないが、T R I Iポリペプチドの効果は、TGF のシグナル伝達のアンタゴニスト効果、特に、TGF 1および/またはTGF 3のシグナル伝達のアンタゴニスト効果によって主に引き起こされると予想される。したがって、他のTGF アンタゴニスト〔例えば、T R I I受容体のアンタゴニスト、1つもしくは複数のT R I I結合リガンド（例えば、TGF 1、TGF 2およびTGF 3）のアンタゴニスト、1つもしくは複数のT R I I関連I型受容体（例えば、ALK5）のアンタゴニスト、1つもしくは複数のT R I I関連共受容体（ベータグリカン）のアンタゴニスト、1つもしくは複数のT R I Iの下流のシグナル伝達成分（例えば、Smad）のアンタゴニスト、またはこのようなアンタゴニストの組合せ〕がHOの処置において有用であると予想される。このような薬剤は、本明細書において、まとめて「TGF アンタゴニスト」または「TGF 阻害剤」と称する。

10

【0005】

ある特定の態様では、本開示は、有効量の形質転換成長因子 - （TGF）アンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、HOを処置するための方法に関する。一部の実施形態では、この方法は、HOの1つまたは複数の合併症の重症度および/または期間を予防または低減する。例えば、TGF アンタゴニストによる処置は、関節拘縮、関節強直、疼痛、痙縮、腫脹の発熱、神経血管圧迫症候群および褥瘡からなる群から選択されるHOの1つまたは複数の合併症の重症度ならびに/または期間を予防または低減し得る。一部の実施形態では、この方法は、脊髄損傷、外傷、脳損傷、熱傷、骨折、筋肉挫傷、関節形成術/関節置換術、股関節手術/人工股関節置換術、寛骨臼手術/寛骨臼置換術、肘の骨折、下腿の長骨の骨折、戦闘関連外傷、肢切断、成人の呼吸促進症候群を管理するために使用される神経筋遮断、非外傷性脊髄症からなる群から選択される1つもしくは複数の障害または状態と関連するHOを処置することに関する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、進行性骨化性線維異形成症（FOP）を処置する方法に関する。例えば、この方法は、FOPの1つまたは複数の合併症（例えば、異所性骨化）の重症度および/または期間を予防または低減する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、進行性骨化性線維異形成症（FOP）を処置する方法に関する。例えば、この方法は、FOPの1つまたは複数の合併症（例えば、異所性骨化）の重症度および/または期間を予防または低減する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、線維性骨異形成症を処置する方法に関する。例えば、この方法は、線維性骨異形成症の1つまたは複数の合併症（例えば、異所性骨化）の重症度および/または期間を予防または低減する。一部の実施形態では、異所性骨化は、骨、皮膚、皮下組織、骨格筋、関節の近傍の線維症組織、血管壁および靭帯からなる群から選択される1つまたは複数の組織で起こる。必要に応じて、このような本明細書に記載の方法は、有効量のHOを処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法を患者に投与することをさらに含む。例えば、このような追加の活性薬剤または支持療法としては、イソトレチノイン、エチドロネートと経口コルチコステロイド、マレイン酸ペルヘキシリン、ALK2低分子阻害剤、パロパロテン、レチノイン酸受容体ガンマアンタゴニスト、レチノイン酸受容体アルファアンタゴニスト、アクチビン抗体（例えば、REGN 2477などのアクチビンA抗体）、ALK2の対立遺伝子特異的RNA干渉、ビスホスホネート、放射線療法、抗炎症剤（例えば、インドメタシン、イブプロフェンおよびアスピリン）および他動可動域の訓練または他の可動化技術などの保存

20

30

40

50

的処置が挙げられる。一部の実施形態では、追加の活性薬剤または支持療法は、アクチビンアンタゴニストによる処置である。一部の実施形態では、アクチビンアンタゴニストは、アクチビン抗体である。一部の実施形態では、アクチビン抗体は、アクチビンA抗体である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストは、TGF 1、TGF 2およびTGF 3の1つまたは複数に結合し、これらの1つまたは複数によって媒介されるシグナル伝達を阻害し、ならびにアクチビン（例えば、アクチビンA）にさらに結合および阻害する、多重特異性抗体である。

【0006】

ある特定の態様では、本明細書に記載の方法および使用に従って使用されるTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともTGF 1を阻害する薬剤（例えば、TGF 1アンタゴニスト）である。TGF 1阻害に対する効果は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む細胞に基づくアッセイ（例えば、Smadシグナル伝達アッセイ）を使用して、決定され得る。したがって、一部の実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともTGF 1に結合し得る。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む結合親和性アッセイを使用して、決定され得る。一部の実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくともTGF 1に結合する。本明細書に記載するように、TGF 1を阻害する様々なTGF アンタゴニストは、例えば、リガンドトラップ（例えば、TRIIポリペプチドおよびそのバリエーション）、抗体、低分子、ヌクレオチド配列およびこれらの組合せを含む本明細書に記載の方法および使用に従って使用することができる。ある特定の実施形態では、TGF 1を阻害するTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 2、TGF 3、TRII、ALK5およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害し得る。一部の実施形態では、TGF 1を阻害するTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 3をさらに阻害する。一部の実施形態では、TGF 1を阻害するTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 2を阻害しないか、またはTGF 2を実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF 1を阻害するTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 3をさらに阻害するが、TGF 2を阻害しないか、またはTGF 2を実質的に阻害しない。

【0007】

ある特定の態様では、本明細書に記載の方法および使用に従って使用されるTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともTGF 2を阻害する薬剤（例えば、TGF 2アンタゴニスト）である。TGF 2阻害に対する効果は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む細胞に基づくアッセイ（例えば、Smadシグナル伝達アッセイ）を使用して、決定され得る。したがって、一部の実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともTGF 2に結合し得る。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む結合親和性アッセイを使用して、決定され得る。一部の実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくともTGF 2に結合する。本明細書に記載するように、TGF 2を阻害する様々なTGF アンタゴニストは、例えば、リガンドトラップ（例えば、TRIIポリペプチドおよびそのバリエーション）、抗体、低分子、ヌクレオチド配列およびこれらの組合せを含む本明細書に記載の方法および使用に従って使用することができる。ある特定の実施形態では、TGF 2を阻害するTGF アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 1、TGF 3、TRII、ALK5およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害し得る。

【0008】

10

20

30

40

50

ある特定の態様では、本明細書に記載の方法および使用に従って使用される TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも TGF α 3 を阻害する薬剤（例えば、TGF α 3 アンタゴニスト）である。TGF α 3 阻害に対する効果は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む細胞に基づくアッセイ（例えば、Smad シグナル伝達アッセイ）を使用して、決定され得る。したがって、一部の実施形態では、本開示の TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも TGF α 3 に結合し得る。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む結合親和性アッセイを使用して、決定され得る。一部の実施形態では、本開示の TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくとも TGF α 3 に結合する。本明細書に記載するように、TGF α 3 を阻害する様々な TGF α アンタゴニストは、例えば、リガンドトラップ（例えば、T β RII ポリペプチドおよびそのバリエーション）、抗体、低分子、ヌクレオチド配列およびこれらの組合せを含む本明細書に記載の方法および使用に従って使用することができる。ある特定の実施形態では、TGF α 3 を阻害する TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF α 1、TGF α 2、T β RII、ALK5 およびベータグリカンの 1 つまたは複数をさらに阻害し得る。一部の実施形態では、TGF α 3 を阻害する TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF α 1 をさらに阻害する。一部の実施形態では、TGF α 3 を阻害する TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF α 2 を阻害しないか、または TGF α 2 を実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF α 3 を阻害する TGF α アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF α 1 をさらに阻害するが、TGF α 2 を阻害しないか、または TGF α 2 を実質的に阻害しない。

【0009】

ある特定の態様では、本明細書に記載の方法および使用に従って使用される TGF β アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも T β RII を阻害する薬剤（例えば、T β RII 受容体アンタゴニスト）である。T β RII 阻害に対する効果は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む細胞に基づくアッセイ（例えば、Smad シグナル伝達アッセイ）を使用して、決定され得る。したがって、一部の実施形態では、本開示の TGF β アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも T β RII に結合し得る。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む結合親和性アッセイを使用して、決定され得る。一部の実施形態では、本開示の TGF β アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくとも T β RII に結合する。本明細書に記載するように、T β RII を阻害する様々な TGF β アンタゴニストは、例えば、リガンドトラップ（例えば、T β RII ポリペプチドおよびそのバリエーション）、抗体、低分子、ヌクレオチド配列およびこれらの組合せを含む本明細書に記載の方法および使用に従って使用することができる。ある特定の実施形態では、T β RII を阻害する TGF β アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、ALK5 およびベータグリカンの 1 つまたは複数をさらに阻害し得る。一部の実施形態では、T β RII を阻害する TGF β アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF β 2 を阻害しないか、または TGF β 2 を実質的に阻害しない。

【0010】

ある特定の態様では、本明細書に記載の方法および使用に従って使用される TGF γ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも ALK5 を阻害する薬剤（例えば、ALK5 アンタゴニスト）である。ALK5 阻害に対する効果は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む細胞に基づくアッセイ（例えば、Smad シグナル伝達アッセイ）を使用して、決定され得る。したがって、一部の実施形態では、本開示の TGF γ アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも ALK5 に結合し得る。リガ

ンド結合活性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む結合親和性アッセイを使用して、決定され得る。一部の実施形態では、本開示のALK5アンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくともALK5に結合する。本明細書に記載するように、ALK5を阻害する様々なTGFアンタゴニストは、例えば、リガンドトラップ（例えば、TRIIポリペプチドおよびそのバリエーション）、抗体、低分子、ヌクレオチド配列およびこれらの組合せを含む本明細書に記載の方法および使用に従って使用することができる。ある特定の実施形態では、ALK5を阻害するTGFアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 1、TGF 2、TGF 3、TRIIおよびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害し得る。一部の実施形態では、ALK5を阻害するTGFアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 2を阻害しないか、またはTGF 2を実質的に阻害しない。

10

【0011】

ある特定の態様では、本明細書に記載の方法および使用に従って使用されるTGFアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともベータグリカンを阻害する薬剤（例えば、ベータグリカンアンタゴニスト）である。ベータグリカン阻害に対する効果は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む細胞に基づくアッセイ（例えば、Smadシグナル伝達アッセイ）を使用して、決定され得る。したがって、一部の実施形態では、本開示のTGFアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくともベータグリカンに結合し得る。リガンド結合活性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む結合親和性アッセイを使用して、決定され得る。一部の実施形態では、本開示のベータグリカンアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、少なくとも 1×10^{-7} M（例えば、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} M）の K_D で、少なくともベータグリカンに結合する。本明細書に記載するように、ベータグリカンを阻害する様々なTGFアンタゴニストは、例えば、リガンドトラップ（例えば、TRIIポリペプチドおよびそのバリエーション）、抗体、低分子、ヌクレオチド配列およびこれらの組合せを含む本明細書に記載の方法および使用に従って使用することができる。ある特定の実施形態では、ベータグリカンを阻害するTGFアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 1、TGF 2、TGF 3、TRIIおよびALK5の1つまたは複数をさらに阻害し得る。一部の実施形態では、ベータグリカンを阻害するTGFアンタゴニストまたはアンタゴニストの組合せは、TGF 2を阻害しないか、またはTGF 2を実質的に阻害しない。

20

30

【0012】

ある特定の態様では、本開示は、TRIIポリペプチド、ならびにTGF 1および/またはTGF 3のための選択的アンタゴニストとしてのこのようなTRIIポリペプチドの使用を提供する。本明細書に記載するように、TRIIの細胞外ドメイン（ECD）の一部またはすべてを含むポリペプチドは、追加の突然変異ありまたはなしで、親和性の変化を有するTGF 1および/もしくはTGF 3に結合ならびに/または阻害する。したがって、ある特定の態様では、本開示は、TGFスーパーファミリー関連障害の選択的な阻害における使用のためのTRIIポリペプチドを提供する。

40

【0013】

一部分では、本開示は、TRIIポリペプチドの融合タンパク質、およびTGF 1またはTGF 3のための選択的アンタゴニストとしてのこのような融合タンパク質の使用を提供する。本明細書に記載するように、TRIIの細胞外ドメイン（ECD）の一部またはすべてを含むポリペプチドは、追加の突然変異ありまたはなしで、親和性の変化を有するTGF 1もしくはTGF 3に結合および/または阻害する。特に、異種部分（例えば、Fc免疫グロブリンドメイン）を含むTRIIポリペプチド、および少なくとも10アミノ酸長のリンカー（例えば、配列番号6のアミノ酸配列を有するリンカー）

50

は、より短いリンカーを有する T R I I ポリペプチドと比較して、驚くほど優れた T G F 1 および T G F 3 結合特性と関連する。したがって、ある特定の態様では、本開示は、T G F スーパーファミリー関連障害の選択的な阻害における使用のための T R I I ポリペプチドを提供する。

【0014】

一部の実施形態では、本開示は、a) T R I I 部分の細胞外ドメイン；b) 異種部分；およびc) リンカー部分を含む形質転換成長因子 - 受容体 I I (T R I I) 融合ポリペプチドであって、リンカーが、少なくとも10アミノ酸長であり、T R I I 部分の細胞外ドメインが、i) 配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列、またはi i) 配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了する配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む、形質転換成長因子 - 受容体 I I (T R I I) 融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了する配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了する配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23~60位のいずれかで開始し、配列番号2の178~184位のいずれかで終了するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも97%同一のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I 部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のいずれかで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態で

10

20

30

40

50

は、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23～35位のいずれかで開始し、配列番号1の153～159位のいずれかで終了する配列と少なくとも97%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号1の23～35位のいずれかで開始し、配列番号1の153～159位のいずれかで終了するアミノ酸配列からなる。

一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23～60位のいずれかで開始し、配列番号2の178～184位のいずれかで終了する配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23～60位のいずれかで開始し、配列番号2の178～184

10

位のいずれかで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23～60位のいずれかで開始し、配列番号2の178～184位のいずれかで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号2の23～60位のいずれかで開始し、配列番号2の178～184位のいずれかで終了するアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも80%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも90%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T

20

R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも95%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号18と少なくとも97%同一のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、T R I I部分の細胞外ドメインは、配列番号18のアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、N末端リーダー配列を含む。一部の実施形態では、N末端リーダー配列は、配列番号22～24のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、N末端リーダー配列は、配列番号23のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、異種部分は、免疫グロブリンFcドメインである。一部の実施形態では、免疫グロブリンFcドメインは、ヒト免疫グロブリンFcドメインである。一部の実施形態では、異種部分は、配列番号49と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、異種部分は、配列番号49と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、異種部分は、配列番号49と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の

30

実施形態では、異種部分は、配列番号49と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、異種部分は、配列番号49のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、25アミノ酸長未満である。一部の実施形態では、リンカーは、10～25アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、15～25アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、17～22アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、21アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、(GGGS)_n (式中、n = 2)を含む。一部の実施形態では、リンカーは、(GGGS)_n (式中、n = 3)を含む。一部の実施形態では、リンカーは、(GGGS)_n (式中、n = 4)を含む。一部の実施形態では、リンカーは、(GGGS)_n (式中、n = 5)を含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号21のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号4～7のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。一部の

40

実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を含む。一部の

実施形態では、ポリペプチドは、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であ

50

るアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 63 のアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 63 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 63 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 63 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 65 のアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 65 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 65 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 65 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 68 のアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 68 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 68 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 68 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 15 のアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 15 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、T R I I ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸 185 ~ 592 を含まない。一部の実施形態では、T R I I ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 22 を含まない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、a) 配列番号 18 のアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列、および 10、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む T R I I ポリペプチド部分； b) 配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列、および 5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含むリンカー部分； c) 配列番号 49 のアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列、および 25、20、15、10、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む異種部分；ならびに d) 必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号 23）からなるか、またはこれらから本質的になる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、a) 配列番号 18 のアミノ酸配列、および 10、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む T R I I ポリペプチド部分； b) 配列番号 6 のアミノ酸配列、および 5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含むリンカー部分； c) 配列番号 49 のアミノ酸配列、および 25、20、15、10、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む異種部分；ならびに d) 必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号 23）からなるか、またはこれらから本質的になる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、a) 配列番号 18 の配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、T R I I 部分の細胞外ドメイン； b) 配列番号 49 の配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、異種部分； c)

10

20

30

40

50

細胞外ドメインおよび異種部分を連結するリンカー部分であって、リンカーが、配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、リンカー部分を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、a) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む、T R I I 部分の細胞外ドメイン；b) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む、異種部分；c) 細胞外ドメインおよび異種部分を連結するリンカー部分であって、リンカーが、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、リンカー部分を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、95%、97% または 99% 同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、リーダー配列を含まないか、またはリーダー配列は、除去されている。一部の実施形態では、ポリペプチドは、グリコシル化アミノ酸、ペグ化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ピオチン化アミノ酸、脂質部分とコンジュゲートされたアミノ酸、および有機誘導体化剤とコンジュゲートされたアミノ酸から選択される 1 つまたは複数の改変アミノ酸残基を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドはグリコシル化される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CHO 細胞におけるポリペプチドの発現のグリコシル化パターン特性を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、100 pM 未満の平衡解離定数 (KD) でヒト TGF β 1 に結合する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、75 pM 未満の平衡解離定数 (KD) でヒト TGF β 1 に結合する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、60 pM 未満の平衡解離定数 (KD) でヒト TGF β 3 に結合する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、50 pM 未満の平衡解離定数 (KD) でヒト TGF β 3 に結合する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、1.0 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 1 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.25 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 1 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.1 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 1 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.05 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 1 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.3 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 3 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.1 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 3 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.05 nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 3 を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、0.04

nM 未満の IC $_{50}$ で TGF β 3 を阻害する。一部の実施形態では、レポーター遺伝子アッセイは、CAGA レポーターアッセイである。

【0015】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるいずれか 2 つのポリペプチドを含むホモ二量体を提供する。

【0016】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるいずれかのポリペプチドに対するコード配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるいずれかのポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 10、12、14、46 または 47 のいずれか 1 つと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97% または 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0017】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるいずれかのポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、細胞は、CHO 細胞またはヒト細胞である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、本開示は、薬学的に許容される賦形剤、および本明細書に開示されるいずれかのポリペプチドまたは本明細書に開示されるいずれかのホモ二量体を含む、医薬調製物を提供する。

【 0 0 1 9 】

ある特定の態様では、TGF アンタゴニストは、抗体または抗体の組合せである。ある特定の態様では、抗体は、少なくともT R I Iに結合する。一部の実施形態では、T R I Iに結合するTGF アンタゴニスト抗体は、必要に応じて、本明細書に記載のアッセイなどの細胞に基づくアッセイで測定される、T R I Iのシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、T R I Iに結合するTGF アンタゴニスト抗体は、1つもしくは複数のTGF ベータスーパーファミリーのリガンド、TGF スーパーファミリーI型受容体、またはTGF スーパーファミリー共受容体がT R I Iに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、T R I Iに結合するTGF アンタゴニスト抗体は、TGF 1、TGF 2およびTGF 3からなる群から選択される1つまたは複数のTGF ベータスーパーファミリーのリガンドがT R I Iに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、抗体は、少なくともALK5に結合する。一部の実施形態では、ALK5に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、必要に応じて、本明細書に記載のアッセイなどの細胞に基づくアッセイで測定される、ALK5のシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、ALK5に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、1つもしくは複数のTGF ベータスーパーファミリーのリガンド、TGF スーパーファミリーII型受容体、またはTGF スーパーファミリー共受容体がALK5に結合するのを阻害する。一部の実施形態では、ALK5に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、TGF 1、TGF 2およびTGF 3からなる群から選択される1つまたは複数のTGF ベータスーパーファミリーのリガンドがALK5に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、抗体は、少なくともベータグリカンに結合する。一部の実施形態では、ベータグリカンに結合するTGF アンタゴニスト抗体は、必要に応じて、本明細書に記載のアッセイなどの細胞に基づくアッセイで測定される、ベータグリカンのシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、ベータグリカンに結合するTGF アンタゴニスト抗体は、1つもしくは複数のTGF ベータスーパーファミリーのリガンド、TGF スーパーファミリーI型受容体、またはTGF スーパーファミリーII型受容体がベータグリカンに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、ベータグリカンに結合するTGF アンタゴニスト抗体は、TGF 1、TGF 2およびTGF 3からなる群から選択される1つまたは複数のTGF ベータスーパーファミリーのリガンドが、ベータグリカンに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト抗体は、少なくともTGF 1に結合する。一部の実施形態では、TGF 1に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、必要に応じて、本明細書に記載のアッセイなどの細胞に基づくアッセイで測定される、T R I Iのシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、TGF 1に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、TGF 1 - T R I I、TGF 1 - ALK5、および/またはTGF 1 - ベータグリカン (beta glycan) の結合を阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト抗体は、少なくともTGF 2に結合する。一部の実施形態では、TGF 2に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、必要に応じて、本明細書に記載のアッセイなどの細胞に基づくアッセイで測定される、T R I Iのシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、TGF 2に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、TGF 2 - T R I I、TGF 1 - ALK5、および/またはTGF 1 - ベータグリカンの結合を阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト抗体は、少なくともTGF 3に結合する。一部の実施形態では、TGF 3に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、必要に応じて、本明細書に記載のアッセイなどの細胞に基づくアッセイで測定される、T R I Iのシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、TGF 3に結合するTGF アンタゴニスト抗体は、TGF 3 - T R I I、TGF 1 - ALK5、および/またはTGF 1 - ベータグリカンの結合を阻害する。一部の実施形態で

10

20

30

40

50

は、TGF アンタゴニスト抗体は、TGF 1、TGF 2、TGF 3、TRII、ALK5およびペータグリカンの1つまたは複数の細胞に基づくアッセイにおいてシグナル伝達を阻害する、多重特異性抗体または多重特異性抗体の組合せである。一部の実施形態では、抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である。一部の実施形態では、抗体は、一本鎖抗体、F(ab')₂断片、一本鎖抗体、タンデム一本鎖Fv断片、タンデム一本鎖ダイアボディ、または一本鎖ダイアボディおよび免疫グロブリン重鎖定常領域の少なくとも一部分を含む融合タンパク質である。

【0020】

ある特定の態様では、TGF アンタゴニストは、低分子阻害剤または低分子阻害剤の組合せである。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの低分子阻害剤は、少なくともTRIIの阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの低分子阻害剤は、少なくともALK5の阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの低分子阻害剤は、少なくともペータグリカンの阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの低分子阻害剤は、少なくともTGF 1の阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの低分子阻害剤は、少なくともTGF 2の阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの低分子阻害剤は、少なくともTGF 3の阻害剤である。

10

【0021】

ある特定の態様では、TGF アンタゴニストは、核酸阻害剤または核酸阻害剤の組合せである。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの核酸阻害剤は、少なくともTRIIの阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの核酸阻害剤は、少なくともALK5の阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの核酸阻害剤は、少なくともペータグリカンの阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの核酸阻害剤は、少なくともTGF 1の阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの核酸阻害剤は、少なくともTGF 2の阻害剤である。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストの核酸阻害剤は、少なくともTGF 3の阻害剤である。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、ヒトTGF 受容体II型(hTRII)(NP_003233.4)のB(短い)アイソフォームのための天然前駆体のアミノ酸配列を示す。実線下線は、成熟細胞外ドメイン(ECD)(残基23~159)を示し、二重下線は、A(長い)アイソフォームにおいて置き換えられたバリンを示す。点線下線は、リーダー(残基1~22)を表す。

30

【0023】

【図2】図2は、ヒトTRII(NP_001020018.1)のA(長い)アイソフォームのための天然前駆体のアミノ酸配列を示す。実線下線は、成熟ECD(残基23~184)を示し、二重下線は、スプライスで生じたイソロイシン置換を示す。点線下線は、リーダー(残基1~22)を表す。

【0024】

【図3】図3は、5つの異なるTRII構築物のリンカー配列の比較を示す。

40

【0025】

【図4-1】図4Aおよび4Bは、TGF 1およびTGF 3、ならびにいくつかの異なるTRII-Fc融合タンパク質構築物の1つとの間の結合親和性を表形式で示す。

【図4-2】同上。

【0026】

【図5-1】図5Aおよび5Cは、いくつかの異なるTRII-Fc融合タンパク質構築物の1つに対するTGF 1の親和性を試験するレポーター遺伝子アッセイからの結果をグラフで表す。図5Bおよび5Dは、いくつかの異なるTRII-Fc融合タンパク質構築物の1つに対するTGF 3の親和性を試験するレポーター遺伝子アッセイからの

50

結果をグラフで表す。図 5 E および 5 F は、これらの同じ実験からの IC₅₀ のデータを表形式で提示する。

【図 5 - 2】同上。

【図 5 - 3】同上。

【図 5 - 4】同上。

【図 5 - 5】同上。

【図 5 - 6】同上。

【0027】

【図 6】図 6 A、6 B および 6 C は、*in vitro* 炎症モデルおよび異所性骨化の動物モデルにおける mT R I I - m F c の効果を示す。図 6 A は、mT R I I - m F c が、*in vitro* の炎症環境において、再生 M2 マクロファージによる TGF- β 1 分泌を抑制することができることを示す。図 6 B は、mT R I I - m F c による処置が、外傷性異所性骨化の動物モデルにおいて、骨沈着および骨髓腔の形成を減少させることを示す。図 6 C は、mT R I I - m F c による処置が、外傷性異所性骨化の動物モデルにおいて、成熟 HO の体積を顕著に減少させることを示す。

10

【0028】

【図 7】図 7 は、Clustal 2.1 を使用する、ヒト IgG アイソタイプからの Fc ドメインの多重配列アラインメントを示す。ヒンジ領域は、点線下線によって示される。二重下線は、非対称鎖の対形成を促進するための IgG1 Fc において設計された位置の例、ならびに他のアイソタイプである IgG2、IgG3 および IgG4 に関して対応する位置を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0029】

1. 概要

本明細書に記載のタンパク質は、他に規定のない限り、ヒト形態である。タンパク質についての NCBI 参照は以下の通りである：ヒト T R I I アイソフォーム A (hT R I I_{long})、NP_001020018.1 およびヒト T R I I アイソフォーム B (hT R I I_{short})、(NP_003233.4)。ヒトからの天然 T R I I タンパク質の配列は、図 1 および 2 において説明される。一部の実施形態では、T R I I タンパク質は、マウス、ラット、ウシまたはサルなどの非ヒト動物由来である。

30

【0030】

TGF- β スーパーファミリーは、共通の配列エレメントおよび構造モチーフを共有する種々の成長因子を含有する。これらのタンパク質は、脊椎動物および無脊椎動物の両方における多種多様な細胞型に対する生物学的効果を発揮することが公知である。スーパーファミリーのメンバーは、胚発生の間に、パターン形成および組織の特定化において重要な機能を果たし、脂肪形成、筋形成、軟骨形成、心発生、造血、神経形成および上皮細胞分化を含む種々の分化プロセスに影響を与え得る。TGF- β ファミリーのメンバーの活性を操作することによって、多くの場合、生物体における顕著な生理学的変化を引き起こすことが可能である。例えば、ウシ品種のピエモンテ・ブルーおよびベルジャン・ブルーは、筋肉量の著しい増加を引き起こす GDF8 (ミオスタチンとも呼ばれる) 遺伝子における機能欠失突然変異を持つ。Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4。同様に、ヒトにおいて、GDF8 の不活性対立遺伝子は、筋肉量の増加、および報告によれば非常に優れた強度と関連する。Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8。

40

【0031】

TGF- β のシグナルは、I 型 (例えば、T R I) および II 型 (例えば、T R I I) のセリン/トレオニンキナーゼ受容体の異種複合体によって媒介され、リガンド刺激の際に下流の SMAD タンパク質をリン酸化および活性化する (Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178)。これらの I 型および II 型受容体は、システインリッチ領域を有するリガンド結合性細胞外

50

ドメイン、膜貫通ドメイン、および予測されるセリン/トレオニン特異性を有する細胞質ドメインで構成される膜貫通タンパク質である。I型受容体は、シグナル伝達のために必須であり、II型受容体は、リガンドと結合するため、およびI型受容体の発現のために必要である。I型およびII型受容体は、リガンドと結合した後、安定な複合体を形成し、II型受容体によるI型受容体のリン酸化をもたらす。TGFは、*in vivo*でそれぞれ明確に異なる機能を有するTGF₁、TGF₂およびTGF₃の3つの哺乳動物のアイソフォームを有する。TGFのTRIIへの結合は、TGFのシグナル伝達経路の活性化の開始、SMAD2のリン酸化の主導、および遺伝子発現を調節するための活性化されたSMAD2/SMAD4複合体の核への移行における重要なステップである。

10

【0032】

したがって、ある特定の態様では、本開示は、様々なTGF₁またはTGF₃関連障害の処置における使用のための、TGF₁またはTGF₃のアンタゴニストとしてのTRIIポリペプチドを提供する。任意の特定の作用機構に拘束されることを望まないが、このようなポリペプチドは、TGF₁またはTGF₃に結合することによって、および3つのシグナル伝達複合体を形成するこれらのリガンドの能力を阻害することによって、作用すると予想される。

【0033】

本開示は、TRIIポリペプチドおよび異種部分（例えば、Fc部分）を含む融合タンパク質を提供する。特定の実施形態では、TRII部分および異種部分は、リンカーによって融合される。下記により詳細に記載するように、本開示は、ある特定の長さのリンカー（例えば、21アミノ酸を有するリンカー）を含むTRII-Fc融合タンパク質が、驚くべきことに、4アミノ酸のみのリンカーを有するTRII-Fc融合タンパク質よりも強い親和性で、TGF₁およびTGF₃に結合することが可能であったことを実証する。

20

【0034】

本明細書において実証されるように、TGF₁およびTGF₃に結合する可溶性のTRIIポリペプチドは、異所性骨化（HO）のマウスモデルにおいて、骨沈着および骨髓腔の形成の減少を伴うHO原基の発生の大幅な減弱に有効である。さらにまた、TRIIポリペプチドによる処置は、この動物モデルにおいて、成熟HOの体積を顕著に低減した。任意の特定の機構に拘束されることを望まないが、TRIIポリペプチドの効果は、TGFのシグナル伝達のアンタゴニスト効果、特に、TGF₁および/またはTGF₃のシグナル伝達のアンタゴニスト効果によって主に引き起こされると予想される。機構に関わらず、本明細書に提示されるデータから、TGFシグナル伝達アンタゴニストが、HOにおける骨沈着の重症度を低減することは明らかである。異所性骨化が動的であり、HOを増加させる因子およびHOを減少させる因子のバランスに依存して変化することに留意しなければならない。HOは、HOを低減させる因子の増加、HOを増加させる因子の減少、または両方によって、減少し得る。したがって、HOを減少する（低減する）という用語は、骨沈着における観察可能な物理的変化を指し、変化が起こる機構に関して中立であることが意図される。

30

40

【0035】

本明細書に記載の研究において使用されるHOのための動物モデルは、ヒトにおける有効性を叙述すると考えられ、したがって、本開示は、HOを処置するためにTGFシグナル伝達アンタゴニストを使用するための方法、特に、ヒトにおいて、1つまたは複数のHOの合併症の重症度または期間を予防または低減するための方法を提供する。本明細書に開示されるように、TGFアンタゴニストという用語は、例えば、1つまたは複数のTGFリガンド[例えば、TGF₁、TGF₂および/またはTGF₃]を阻害するアンタゴニスト；1つまたは複数のTGFと相互作用するI型、II型または共受容体（例えば、TRII、ALK5およびベータグリカン）を阻害するアンタゴニスト；ならびに1つまたは複数の下流のシグナル伝達成分（例えば、Smad2および3など

50

の S m a d タンパク質) を阻害するアンタゴニストを含む、 T G F シグナル伝達をアンタゴナイズするために使用され得る種々の薬剤を指す。本開示の方法および使用に従って使用される T G F アンタゴニストは、種々の形態、例えば、リガンドトラップ(例えば、可溶性 T R I I ポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチド)、抗体アンタゴニスト(例えば、 T G F 1、 T G F 2、 T G F 3、 T R I I およびベータグリカンの 1 つまたは複数を阻害する抗体)、低分子アンタゴニスト[例えば、 1 つまたは複数の T G F 1、 T G F 2、 T G F 3、 T R I I、ベータグリカン、および 1 つまたは複数の S m a d タンパク質(例えば、 S m a d 2 および 3) の 1 つまたは複数を阻害する低分子]、およびヌクレオチドアンタゴニスト[例えば、 T G F 1、 T G F 2、 T G F 3、 T R I I、ベータグリカン、および 1 つまたは複数の S m a d タンパク質(例えば、 S m a d 2 および 3) の 1 つまたは複数を阻害するヌクレオチド配列]を含む。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される用語は、一般に、本発明の文脈内およびそれぞれの用語が使用される特定の文脈において、当技術分野におけるそれらの通常の意味を有する。ある特定の用語は、本発明の組成物および方法、ならびにこれらを作成および使用する方法の記載において、技術者に追加的な指針を提供するために、下記で、または本明細書の他の箇所でも議論される。用語の任意の使用の範囲または意味は、その用語が使用される特定の文脈から明らかであろう。

【 0 0 3 7 】

「相同」とは、すべてのその文法的形態および綴りの変化において、「共通の進化上の起源」を持つ 2 つのタンパク質間の関係を指し、同じ生物種におけるスーパーファミリー由来のタンパク質、および異なる生物種由来の相同タンパク質を含む。このようなタンパク質(およびこれらのコード核酸)は、同一性パーセントの用語に関わらず、それらの配列類似性を反映するか、または特定の残基またはモチーフおよび保存位置の存在を反映する、配列相同性を有する。

20

【 0 0 3 8 】

「配列類似性」という用語は、すべてのその文法的形態において、共通の進化上の起源を共有していてもよく、または共有していなくてもよい核酸またはアミノ酸配列の間の同一性または対応の程度を指す。しかしながら、通常の使用および本出願において、「相同」という用語は、「高い」などの副詞で修飾される場合、配列類似性を指してもよく、共通の進化上の起源に関連していてもよく、または関連していなくてもよい。

30

【 0 0 3 9 】

参照ポリペプチド(またはヌクレオチド)配列に関する「配列同一性パーセント(%)」または「同一性パーセント(%)」は、配列をアラインメントさせ、必要により、最大配列同一性パーセントを達成するようにギャップを導入した後、配列同一性の一部として任意の保存的置換を考慮せずに、参照ポリペプチド(ヌクレオチド)配列中のアミノ酸残基(または核酸)と同一である候補配列中のアミノ酸残基(または核酸)のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のアラインメントは、当技術分野の技量内の様々な方法、例えば、 B L A S T、 B L A S T - 2、 A L I G N または M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアなどの公に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。本明細書における目的のために、しかしながら、アミノ酸(核酸)配列同一性%の値は、配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用して生成される。 A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムは、 G e n e t e c h , I n c . により作成され、ソースコードは米国著作権局、 W a s h i n g t o n D . C . , 2 0 5 5 9 にユーザー文書とともに提出されており、そこで、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 として登録されている。 A L I G N - 2 プログラムは、 G e n e t e c h , I n c . , S o u t h S a n F r a n c i s c o , C a l i f . から公に利用可能であり、またはソースコードからコンパイ

40

50

ルされてもよい。ALIGN - 2プログラムは、デジタルUNIX（登録商標）V4.0Dを含むUNIX（登録商標）オペレーティングシステムにおける使用のためにコンパイルされなければならない。すべての配列比較パラメーターは、ALIGN - 2プログラムによって設定され、変化させない。

【0040】

「アゴナイズする」とは、すべてのその文法的形態において、タンパク質および/または遺伝子を（例えば、タンパク質の遺伝子発現を活性化もしくは増幅することによって、または不活性のタンパク質を活性状態となるように誘導することによって）活性化するプロセス、あるいはタンパク質および/または遺伝子の活性を増加させるプロセスを指す。

【0041】

「アンタゴナイズする」とは、すべてのその文法的形態において、タンパク質および/または遺伝子を（例えば、タンパク質の遺伝子発現を阻害もしくは減少させることによって、または活性のタンパク質を不活性状態となるように誘導することによって）阻害するプロセス、あるいはタンパク質および/または遺伝子の活性を減少させるプロセスを指す。

【0042】

本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって数値に関して使用される「約」および「およそ」という用語は、当業者によく知られ、許容される精度区間を意味する。

【0043】

本明細書に開示される数値範囲は、範囲を規定する数を含む。

【0044】

「a」および「an」という用語は、この用語が使用される文脈が明らかに他を指示しない限り、複数の対象物を含む。「a」（または「an」）という用語、ならびに「1つまたは複数」および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書において、互換可能に使用することができる。さらにまた、本明細書において使用される「および/または」は、他のものを伴うか、もしくは伴わない、2つまたはそれよりも多くの特定の特定の特徴または成分のそれぞれの特定の開示とすべきである。したがって、本明細書において「Aおよび/またはB」などの語句において使用される「および/または」という用語は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」（単独）および「B」（単独）を含むことが意図される。同様に、「A、Bおよび/またはC」などの語句において使用される「および/または」という用語は、以下の態様のそれぞれを包含することが意図される：A、BおよびC；A、BまたはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

【0045】

本明細書全体にわたって、「含む（comprise）」という語、または「含む（comprises）」または「含むこと（comprising）」などの変形は、言及された整数または整数の群の包含という意味を含むが、任意の他の整数または整数の群の除外という意味を含まないことが理解されるであろう。本明細書で使用される場合、「含む（comprises）」という用語は、より狭い「からなる（consisting）」および「本質的にからなる（consisting essentially of）」という用語の使用も包含する。

【0046】

「本質的にからなる（consisting essentially of）」という用語は、特定の材料またはステップ、および本明細書に開示される本発明の基本および新規の特性に著しく影響を与えないものに限定される。

【0047】

本明細書で使用される「認識可能な親和性」という用語は、50 nM未満の解離定数（ K_D ）での結合を意味する。

【0048】

「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸の鎖を指すために、本明細書において互換可能に使用される

10

20

30

40

50

鎖は、直鎖状または分岐状であってもよく、これは、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、および/または非アミノ酸によって中断されていてもよい。この用語は、天然で、または介入によって修飾されたアミノ酸鎖も包含し；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、標識成分とのコンジュゲーションなど。また、この定義内には、例えば、アミノ酸の1つまたは複数のアナログ（例えば、非天然アミノ酸などを含む）および当技術分野において公知の他の修飾を含有する、ポリペプチドも含まれる。ポリペプチドは、一本鎖または会合鎖として存在し得ることが理解される。

2. TGF アンタゴニスト

【0049】

本明細書に開示されるように、TGF アンタゴニストという用語は、例えば、1つまたは複数のTGF リガンド〔例えば、TGF₁、TGF₂および/またはTGF₃〕を阻害するアンタゴニスト；1つまたは複数のTGF と相互作用するI型、II型または共受容体（例えば、TRII、ALK5およびベータグリカン）を阻害するアンタゴニスト；ならびに1つまたは複数の下流のシグナル伝達成分（例えば、Smad2および3などのSmadタンパク質）を阻害するアンタゴニストを含む、TGF が媒介するシグナル伝達をアンタゴナイズするために使用され得る種々の薬剤を指す。本開示の方法および使用に従って使用されるTGF アンタゴニストは、種々の形態、例えば、リガンドトラップ（例えば、可溶性TRIIポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチド）、抗体アンタゴニスト（例えば、TGF₁、TGF₂、TGF₃、TRIIおよびベータグリカンの1つまたは複数を阻害する抗体）、低分子アンタゴニスト〔例えば、1つまたは複数のTGF₁、TGF₂、TGF₃、TRII、ベータグリカン、および1つまたは複数のSmadタンパク質（例えば、Smad2および3）の1つまたは複数を阻害する低分子〕、およびヌクレオチドアンタゴニスト〔例えば、TGF₁、TGF₂、TGF₃、TRII、ベータグリカン、および1つまたは複数のSmadタンパク質（例えば、Smad2および3）の1つまたは複数を阻害するヌクレオチド配列〕を含む。

A. TRIIポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチド

【0050】

天然に存在するTRIIタンパク質は、細胞の外側に位置するタンパク質の部分（細胞外部分）および細胞の内側に位置するタンパク質の部分（細胞内部分）を有する膜貫通タンパク質である。本開示の態様は、TRIIの細胞外ドメイン内の突然変異、および/またはTRIIの細胞外ドメインの切断された部分を含むバリエーションTRIIポリペプチドを包含する。上記に記載するように、ヒトTRIIは、細胞外ドメイン（ECD）における選択的スプライシングによって生じた、A（長い）およびB（短い）の少なくとも2つのアイソフォームで天然に存在する（図1および2、配列番号1および2）。配列番号1の残基23～159に対応する配列番号27は、TRIIの天然の全長細胞外ドメインの短いアイソフォームを表す。配列番号2の残基23～184に対応する配列番号18は、TRIIの天然の全長細胞外ドメインの長いアイソフォームを表す。他に言及されない限り、TRIIの短いアイソフォームおよび長いアイソフォームに基づくバリエーションに関するアミノ酸位置の番号付けは、それぞれ、天然前駆体の配列番号1および配列番号2における対応する位置を指す。

【0051】

ある特定の実施形態では、本開示は、バリエーションTRIIポリペプチドを提供する。本開示のTRIIポリペプチドは、限定されるものではないが、TGF₁またはTGF₃などのTGF スーパーファミリーのメンバーと結合し得、これらの機能を阻害し得る。TRIIポリペプチドは、天然に存在するTRIIポリペプチドの切断ECDドメインと少なくとも70%同一のアミノ酸配列、必要に応じて、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一のアミノ酸配列からなるか、またはこれらのア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含み、そのC末端が、配列番号1のアミノ酸153～159のいずれかに存在する、ポリペプチドを含み得る。T R I Iポリペプチドは、天然に存在するT R I Iポリペプチドの切断ECDドメインと少なくとも70%同一のアミノ酸配列、必要に応じて、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一のアミノ酸配列からなるか、またはこれらのアミノ酸配列を含み、そのC末端が、配列番号2のアミノ酸178～184のいずれかに存在する、ポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列、必要に応じて、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一のアミノ酸配列を含む。必要に応じて、T R I Iポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸160～567からなる配列から、または配列番号2のアミノ酸185～592からなる配列から、5より多くの連続したアミノ酸、あるいは10、20、30、40、50、52、60、70、80、90、100、150もしくは200またはそれよりも多くの連続したアミノ酸を含まない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸160～567を含まない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸1～22を含まない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸1～22および160～567を含まない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸185～592を含まない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸1～22を含まない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸1～22および185～592を含まない。プロセッシングされていないT R I Iポリペプチドは、任意のシグナル配列、および任意のN末端からシグナル配列への配列を、含むか、または除かれているかのいずれかであり得る。本明細書で詳細に述べるように、成熟(プロセッシングされた)T R I IポリペプチドのN末端は、配列番号1のアミノ酸23～35または配列番号2のアミノ酸23～60のいずれかに存在し得る。成熟T R I Iポリペプチドの例としては、限定されるものではないが、配列番号1のアミノ酸23～159(配列番号27に記述)、配列番号1のアミノ酸29～159(配列番号28に記述)、配列番号1のアミノ酸35～159(配列番号29に記述)、配列番号1のアミノ酸23～153(配列番号30に記述)、配列番号1のアミノ酸29～153(配列番号31に記述)、配列番号1のアミノ酸35～153(配列番号32に記述)、配列番号2のアミノ酸23～184(配列番号18に記述)、配列番号2のアミノ酸29～184(配列番号33に記述)、配列番号2のアミノ酸60～184(配列番号29に記述)、配列番号2のアミノ酸23～178(配列番号34に記述)、配列番号2のアミノ酸29～178(配列番号35に記述)、および配列番号2のアミノ酸60～178(配列番号32に記述)が挙げられる。T R I Iの長いアイソフォームに基づく対応するバリエーションが、挿入に隣接するC末端位で保存的なVal-Ile置換とともに25アミノ酸挿入をコードするヌクレオチド配列を含むことは当業者によって理解される。したがって、T R I Iポリペプチドは、単離されたT R I Iポリペプチドの細胞外部分を含んでいてもよく、これは、短いアイソフォームおよび長いアイソフォームの両方、これらのバリエーション(例えば、配列番号1のアミノ酸23～159または配列番号2のアミノ酸23～184に対応する配列中に、2、3、4、5、10、15、20、25、30または35以下のアミノ酸置換を含むバリエーションを含む)、これらの断片、および前述のいずれかを含む融合タンパク質を含むが、それぞれの場合において、好ましくは、前述のT R I Iポリペプチドのいずれかは、TGF β 1もしくはTGF β 3の少なくとも1つまたは両方について実質的に親和性を維持する。一般に、T R I Iポリペプチドは、生物学的に関連する温度、pHレベルおよびオスモル濃度で、水溶液に可溶性であるように設計される。

【0052】

一部の実施形態では、本開示のバリエーションT R I Iポリペプチドは、変更されたりリガンド結合プロファイルを付与する1つまたは複数の突然変異を細胞外ドメイン中に含む。

10

20

30

40

50

T R I Iポリペプチドは、天然に存在するT R I Iポリペプチドの対応する部分に対して、アミノ酸配列中に1つ、2つ、5つまたはそれよりも多くの変更を含んでもよい。一部の実施形態では、突然変異は、配列番号1の70位に対応する位置で、置換、挿入または欠失をもたらす。一部の実施形態では、突然変異は、配列番号1の110位に対応する位置で、置換、挿入または欠失をもたらす。例としては、限定されるものではないが、配列番号1のそれぞれ70位および110位に対応する位置における、NからDへの置換、またはDからKへの置換が挙げられる。このようなバリエーションT R I Iポリペプチドの例としては、限定されるものではないが、配列番号36~39に記述される配列が挙げられる。T R I Iポリペプチドは、配列番号8、10、12、14、16、46もしくは47、またはこれらのサイレントバリエーション、あるいはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でこれらの相補体とハイブリダイズする核酸のいずれか1つによってコードされる、ポリペプチドまたはその部分を含んでもよい。特定の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号12、またはこのサイレントバリエーション、あるいはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でこれらの相補体とハイブリダイズする核酸のいずれか1つによってコードされる、ポリペプチドまたはその部分を含んでもよい。

10

【0053】

一部の実施形態では、本開示のバリエーションT R I Iポリペプチドは、ヒトT R I IアイソフォームCにおいて天然に存在するように(Konrad et al., BMC Genomics 8:318, 2007)、ヒトT R I I E C DのC末端の近くに位置するグルタミン酸残基の対(配列番号1の151位および152位、または配列番号2の176位および177位)の間の36アミノ酸(配列番号41)の挿入をさらに含む。

20

【0054】

T R I Iポリペプチドが、T R I Iリガンドを選択的にアンタゴナイズするように改変され得ることが実証されている。N70残基は、可能性があるグリコシル化部位を表す。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、グリコシル化されていない。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、グリコシル化されていないか、またはAsn157位でのグリコシル化が低減されている。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、グリコシル化されていないか、またはAsn73位でのグリコシル化が低減されている。

30

【0055】

ある特定の実施形態では、T R I IポリペプチドはTGF β 1に結合し、T R I Iポリペプチドは、TGF β 3への実質的な結合を示さない。ある特定の実施形態では、T R I IポリペプチドはTGF β 3に結合し、T R I Iポリペプチドは、TGF β 1への実質的な結合を示さない。結合は、溶液中、またはBiacore(商標)システムなどの表面プラズモン共鳴システムにおいて、精製されたタンパク質を使用して評価され得る。

【0056】

ある特定の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、TGF β 1細胞内シグナル伝達を阻害し、T R I Iポリペプチドは、TGF β 3シグナル伝達に対する中程度または限定的な阻害効果を有する。ある特定の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、TGF β 3細胞内シグナル伝達を阻害し、T R I Iポリペプチドは、TGF β 1シグナル伝達に対する中程度または限定的な阻害効果を有する。細胞シグナル伝達に対する阻害効果は、当技術分野において公知の方法によってアッセイすることができる。

40

【0057】

これらを基に、T R I Iポリペプチドの活性部分は、配列番号1のアミノ酸配列23~153、23~154、23~155、23~156、23~157または23~158、および配列番号1のアミノ酸24~35のいずれかで開始するこれらの配列のバリエーションを含んでもよい。同様に、T R I Iポリペプチドの活性部分は、配列番号2のアミノ酸配列23~178、23~179、23~180、23~181、23~182

50

または23～183、および配列番号2のアミノ酸24～60のいずれかで開始するこれらの配列のバリエーションを含んでもよい。例示的なT R I Iポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列29～159、35～159、23～153、29～153および35～153、または配列番号2のアミノ酸配列29～184、60～184、23～178、29～178および60～178を含む。これらの範囲内のバリエーション、特に、配列番号1または配列番号2の対応する部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するものも企図される。配列番号1のアミノ酸160～567または配列番号2のアミノ酸185～592からなる配列を含まないT R I Iポリペプチドが選択されてもよい。特定の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列、必要に応じて、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0058】

「ベータグリカンポリペプチド」という用語は、任意の天然に存在するベータグリカンタンパク質（T G F B R 3、またはその非ヒトオルソログの1つによってコードされる）、および有用な活性を維持した任意のこれらのバリエーション（突然変異体、断片、融合体およびペプチド模倣形態を含む）を含むポリペプチドを含む。

【0059】

ヒトベータグリカンのアイソフォームAの前駆体タンパク質配列（N C B I参照配列N P_003234.2）は以下の通りである。

20

【化1】

```

1  MTSHYVIAIF ALMSSCLATA GPEPGALCEL SPVSASHPVQ ALMESFTVLS GCASRGTTGL
61 QPEVHVLNLR TAGQGPGQLQ REVTLHLNPI SSVHIHHSV VLLNSPHPL VWHLKTERLA
121 TGVSRLFLVS EGSVVQFSSA NFSLTAETEE RNFPHGNEHL LNWARKEYGA VTSFTELKIA
181 RNIYIKVGED QVFPKCNIG KNFLSLNYLA EYLQPKAEG CVMSQPQNE EVHIIELITP
241 NSNPYSAFQV DITIDIRPSQ EDLEVKNLI LILKCKKSVN WVKSFDVKG SLKIIAPNSI
301 GFGKESERSM TMTKSIIRDDI PSTQGNLVKW ALDNGYSPIT SYTMAPVANR FHLRLNNAE
361 EMGDEEVHTI PEELRILLDP GALPALQNP IRGGEGQNGG LPFPFDISR RVWNEEGEDG
421 LPRPKDPVIP SIQLFPGLRE PEEVQGSVDI ALSVKCDNEK MIVAVEKDSF QASGYSGMDV
481 TLLDPTCKAK MNGTHFVLES PLNGCGTRPR WSALDGVVYY NSIVIQVPAL GDSSGWPDPY
541 EDLESGDNGF PGDMDEGDAS LFTRPEIVVF NCSLQQVRNE SSFQEQPHGN ITFNMELYNT
601 DLFLVPSQGV FSPVENGHVY VEVSVTKAEQ ELGFAIQTCF ISPYSNPDRM SHYTIENIC
661 PKDESVKFYS PKRVHFPIQ ADMDKRFSS VFKPVFNTSL LFLQCELTLC TKMEKHPQKL
721 PKCVPPDEAC TSLDASIIWA MMQNKKTFTK PLAVIHHEAE SKEKGPSMKE PNPISPPIFH
781 GLDTLTVMGI AFAAFVIGAL LTGALWYIYS HTGETAGRQQ VPTSPPASEN SSAAHSIGST
841 QSTPCSSSST A (配列番号 50)

```

30

【0060】

シグナルペプチドは一重下線によって示され、細胞外ドメインは太字フォントで示され、膜貫通ドメインは点線下線によって示される。このアイソフォームは、二重下線によって上記で示された単一のアラニンの挿入によって、ベータグリカンのアイソフォームBと異なる。

40

【0061】

プロセッシングされたベータグリカンのアイソフォームAのポリペプチド配列は以下の通りである。

50

【化 2】

GPEPGALCELSPVASHPVQALMESFTVLSGCASRGTTGLPQEVHVLNLRRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHI
 HHKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGA
 VTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNSNPY
 SAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSVNWWIKSFDVKGSLKI IAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDI
 PSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGGE

【化 3】

QONGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSF
 QASGYSGMDVTLLEDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVVYNSIVIQVPALGDSSGWPDPGYEDLES
 GDNGFPDMDDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQQVRNPSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVY
 VEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSHYTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPPIQADMDKKRFSFVFKPV
 FNTSLLFLQCELTLCMKMKHPQKLPKCVFPDEACTSLDASIIWAMMQNKKFTKPLAVIHHEAESKEKGPMSMKE
 PNPISPPIFHGLDITLV

10

(配列番号 51)

【0062】

ヒトベータグリカンのアイソフォーム A のプロセシングされていない前駆体タンパク質
 をコードする核酸配列を下記に示し(配列番号 52)、これは、NCBI 参照配列 NM_
 003243.4 のヌクレオチド 516 ~ 3068 に対応する。シグナル配列は実線下線
 によって示され、膜貫通領域は点線下線によって示される。

20

30

40

50

【化4】

ATGACTTCCCATTATGTGATTGCCATCTTTGCCCTGATGAGCTCCTGTTTAGCCACTGCAGGTCCAGAGCCTGGT
 GCACTGTGTGAACTGTACCTGTGAGTGCCCTCCCATCCTGTCCAGGCCCTTGATGGAGAGCTTCACTGTTTTGTCA
 GGCTGTGCCAGCAGAGGCACAACCTGGGCTGCCACAGGAGGTGCATGTCTGAATCTCCGCACTGCAGGCCAGGGG
 CCTGGCCAGCTACAGAGAGAGGTACACTTCACCTGAATCCCATCTCCTCAGTCCACATCCACCACAAGTCTGTT
 GTGTTCTGTCTCAACTCCCCACACCCCTGGTGTGGCATCTGAAGACAGAGAGACTTGCCACTGGGGTCTCCAGA
 CTGTTTTTGGTGTCTGAGGGTCTGTGGTCCAGTTTTCAICAGCAAACCTTCTCCTTGACAGCAGAAACAGAAGAA
 AGGAACTTCCCCCATGGAATGAACATCTGTTAAATTTGGGCCCGAAAAAGATATGGAGCAGTTACTTTCATTCC
 GAACTCAAGATAGCAAGAAACATTTATATTAAGTGGGGGAAGATCAAGTGTTCCTCCAAAGTGAACATAGGG
 AAGAATTTTCTCTCACTCAATTACCTTGCTGAGTACCTTCAACCCAAAGCAGCAGAAGGGTGTGTGATGTCCAGC
 CAGCCCCAGAATGAGGAAGTACACATCATCGAGTAATCACCCCCAACTCTAACCCCTACAGTGCTTCCAGGTG
 GATATAACAATTGATATAAGACCTTC CAAGAGGATCTTGAAGTGGTCAAAAATCTCATCCTGATCTTGAAGTGC
 AAAAAGTCTGTCAACTGGGTGATCAAATCTTTTGATGTTAAGGGAAGCCTGAAAAATTATTGCTCCTAACAGTATT
 GGCTTTGGAAAAGAGAGTGAAGATCTATGACAAATGACCAAATCAATAAGAGATGACATTCTTCAACCCAAGGG
 AATCTGGTGAAGTGGGCTTTGGACAATGGCTATAGTCCAATAACTTCATACACAATGGCTCCTGTGGCTAATAGA
 TTTTCTTCCGGCTTGAATAATGCAGAGGAGATGGGAGATGAGGAAGTCCACACTATTCTCCTGAGCTACGG
 ATCCTGCTGGACCCTGGTGCCTGCTGCCCCTGCAGAACCCGCCATCCGGGGAGGGGAAGGCCAAAATGGAGGC
 CTTCCGTTTCTTCCCAGATAATTCAGGAGAGTCTGGAATGAAGAGGGAGAAGATGGGCTCCCTCGGCCAAAG
 GACCTGTCAATCCCAGCATACAACIGTTTCTGGTCTCAGAGAGCCAGAAGAGGTGCAAGGGAGCGTGGATATT
 GCCCTGTCTGTCAAATGTGACAATGAGAAGATGATCGTGGCTGTAGAAAAGATTCTTTTCAGGCCAGTGGCTAC
 TCGGGGATGGACGTCACCCTGTGGATCTTACCTGCAAGGCCAAGATGAATGGCACACACTTTGTTTTGGAGTCT
 CCTCTGAATGGCTGCGGTACTCGGCCCGGTGGTTCAGCCCTGATGGTGTGGTCTACTATAACTCCATTGTGATA
 CAGGTTCCAGCCCTTGGGGACAGTAGTGGTTGGCCAGATGGTTATGAAGATCTGGAGTCAGGTGATAATGGATTT
 CCGGGAGATATGGATGAAGGAGATGCTTCCCTGTTTACCCGACCTGAAATCGTGGTGTTTAATTGCAGCCCTCAG
 CAGGTGAGGAACCCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCACGGAAACATCACCTTCAACATGGAGCTATAACAACAT
 GACCTCTTTTTGGTGCCTCCCAGGGCGTCTTCTGTGCCAGAGAATGGACACGTTTATGTTGAGGTATCTGTT
 ACTAAGGCTGAACAAGAACITGGGATTTGCCATCAAACGTGCTTTATCTCTCCATATTCGAACCCTGATAGGATG
 TCTCATTACCAATTATTGAGAATATTTGCTTAAAGATGAATCTGTGAAATTTACAGTCCCAAGAGAGTGCAC
 TTTCTATCCCGCAAGCTGACATGGATAAGAAGCGATTAGCTTTGTCTTCAAGCCTGTCTTCAACACCTCACTG

10

20

30

【化5】

CTCTTTCTACAGTGTGAGCTGACGCTGTGTACGAAGATGGAGAAGCACCCCCAGAAGTGCCTAAGTGTGIGCCT
 CCTGACGAAGCCTGCACCTCGCTGGACGCCCTCGATAATCTGGGCCATGATGCAGAATAAGAAGACGTTCACTAAG
 CCCCTTGCTGTGATCCACCATGAAGCAGAATCTAAAGAAAAAGGTCCAAGCATGAAGGAACCAAATCCAATTCT
 CCACCAATTTTCCATGGTCTGGACACCCCTAACCGTGTGGGCAITGGGTTTGGAGCCTTTGTGATCGGAGCACTC
 CTGACGGGGGCTTGTGGTACATCTATTCTCACACAGGGGAGACAGCAGGAAGGCAGCAAGTCCCCACCTCCCCG
 CCAGCCTCGGAAAACAGCAGTGTGCCACAGCATCGGCAGCACGCAGAGCACGCCTTGTCCAGCAGCAGCAGC
 GCC (配列番号 52)

【0063】

プロセシングされたベータグリカンのアイソフォームAの細胞外ドメインをコードする
 核酸配列を下記に示す(配列番号53)。

40

50

【化6】

GGTCCAGAGCCTGGTGCAGTGTGTAAGTGTACCTGTGAGTGCCTCCCATCCTGTCCAGGCCTTGATGGAGAGC
 TTCACTGTTTTGTGTCAGGCTGTGCCAGCAGAGGCACAACCTGGGCTGCCACAGGAGGTGCATGTCTGAATCTCCGC
 ACTGCAGGCCAGGGGCTGGCCAGCTACAGAGAGAGGTACACTTCACCTGAATCCCATCTCCTCAGTCCACATC
 CACCACAAGTCTGTGTGTTCTGCTCAACTCCCCACACCCCTGGTGTGGCATCTGAAGACAGAGAGACTTGCC
 ACTGGGGTCTCCAGACTGTTTTGGTGTCTGAGGGTCTGTGGTCCAGTTTTCAATCAGCAAACCTCTCCTTGACA
 GCAGAAACAGAAGAAAGAACTTCCCCATGAAAATGAACATCTGTTAAATTTGGGCCGAAAAGAGTATGGAGCA
 GTTACTTCATTCACCGAATCAAGATAGCAAGAAACATTTATATTAAGTGGGGGAAGATCAAGTGTTCCTCCA
 AAGTGCACATAGGGAAGAAATTTCTCTCACTCAATTACCTTGCTGAGTACCTTCAACCCAAAGCAGCAGAAGGG
 TGTGTGATGTCCAGCCAGCCCAGAATGAGGAAGTACACATCATCGAGCTAATCAGCCCCAATCTAACCCTTAC
 AGTGCTTCCAGGTGGATATAACAATGATATAAGACCTTCTCAAGAGGATCTTGAAGTGGTCAAAAAATCTCATC
 CTGATCTTGAAGTGCAAAAGTCTGTCAACTGGGTGATCAAACTTTTTGATGTTAAGGGAAGCCTGAAAATTATT
 GCTCCTAACAGTATTGGCTTTGAAAAGAGAGTGAAGATCTATGACAAATGACCAAATCAATAAGAGATGACATT
 CCTTCAACCCAAAGGAATCTGGTGAAGTGGGCTTTGGACAATGGCTATAGTCCAATAACTTCATACACAATGGCT
 CCTGTGGCTAATAGATTTTCATCTTCGGCTTGAAAATAATGCAGAGGAGATGGGAGATGAGGAAGTCCACACTATT
 CCTCCTGAGCTACGGATCCTGCTGGACCTGGTGCCTGCCTGCCCTGCAGAACCCGCCATCCGGGGAGGGGAA
 GGCCAAAATGGAGGCCITCCGTTTTCCCTTCCAGATATTTCCAGGAGAGTCTGGAATGAAGAGGGAGAAGATGGG
 CTCCTCGGCCAAAGGACCTTGCTATCCCAGCATAACAATGTTTCTGGTCTCAGAGAGCCAGAAGAGGTGCAA
 GGGAGCGTGGATATTGCCCTGCTGTCAAAATGTGACAATGAGAAGATGATCGTGGCTGTAGAAAAAGATTCTTTT
 CAGGCCAGTGGCTACTCGGGGATGGACGTCACCCGTGGATCCTACCTGCAAGGCCAAGATGAATGGCACACAC
 TTTGTTTTGGAGTCTCCTCTGAATGGCTGCGGTACTCGGCCCGGTGGTCAGCCCTTGATGGTGTGGTCTACTAT
 AACTCCATGTGATACAGGTTCCAGCCCTTGGGGACAGTAGTGGTGGCCAGATGGTTATGAAGATCTGGAGTCA
 GGTGATAATGGATTTCCGGGAGATATGGATGAAGGAGATGCTTCCCTGTTACCCGACCTGAAATCGTGGTGTTT
 AATTGCAGCCTTCAGCAGGTGAGGAACCCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCACGGAAACATCACCTTCAACATG
 GAGCTATAACAACACTGACCTCTTTTTGGTGCCCTCCAGGGCGTCTTCTGTGCCAGAGAATGGACACGTTTAT
 GTTGAGGTATCTGTTACTAAGGCTGAACAAGAAGTGGGATTTGCCATCCAAACGTGCTTTATCTCTCCATATTGG
 AACCCCTGATAGGATGTCTCATACACCAATTATTGAGAATATTTGTCTTAAAGATGAATCTGTGAAATTTACAGT
 CCCAAGAGAGTGCACCTTCTATCCCGCAAGCTGACATGGATAAGAAGCGATTACAGCTTTGTCTTCAAGCCTGTC
 TTCAACACCTCACTGCTCTTTCTACAGTGTGAGCTGACGCTGTGTACGAAGATGGAGAAGCAGCCCCAGAAAGTTG
 CCTAAGTGTGTGCCCTCTGACGAAGCCTGCACCTCGCTGGACGCTCGATAATCTGGGCCATGATGCAGAATAAG
 AAGACGTTCACTAAGCCCTTGCTGTGATCCACCATGAAGCAGAATCTAAAGAAAAAGGTCCAAGCATGAAGGAA
 CCAAATCCAATTTCTCCACCAATTTCCATGGTCTGGACACCTAACCCTG (配列番号 53)

10

20

30

【0064】

ヒトベータグリカンのアイソフォーム B の前駆体タンパク質配列 (NCBI 参照配列 NP_001182612.1) は以下の通りである。

40

50

【化7】

1 MTSHYVIAIF ALMSSCLATA GPEPGALCEL SPVSASHPVQ ALMESFTVLS GCASRGTTGL
 61 PQEVHVLNLR TAGQGPQQLQ REVTLHLNPI SSVHIHHSV VFLNLSPHPL VWHLKTERLA
 121 TGVSRLFLVS EGSVVQFSSA NFSLTAETEE RNFPHGNEHL LNWARKEYGA VTSFTELKIA
 181 RNIYIKVGED QVFPKCNIG KNFLSLNYLA EYLQPKAAEG CVMSSQPQNE EVHIIELITP
 241 NSNPYSAFQV DITIDIRPSQ EDLEVVKLI LILKCKKSVN WVIKSFVKG SLKIIAPNSI
 301 GFGKESERSM TMTKSIRDDI PSTQGNLVKW ALDNGYSPIT SYTMAPVANR FHLRLENNEE
 361 MGDEEVHTIP PELRILLDPG ALPALQNPPI RGEGQNGGL PPFPDISRR VWNEEGEDGL
 421 PRPKDPVIPS IQLFPGLREP EEVQGSVDIA LSVKCDNEKM IVAVEKDSFQ ASGYSQMDVT
 481 LLDPTCKAKM NGTHFVLESP LNGCGTRPRW SALDGVVYIN SIVIQVPALG DSSGWPDGYE
 541 DLESGDNGFP GDMDEGDASL FTRPEIVVFN CSLQQVRNPS SFQEQPHGNI TFNMELYNTD
 601 LFLVPSQGVF SVPENGHVYV EVSVTKAEQE LGFAIQTCFI SPYSNPDRMS HYTIIENICP
 661 KDESVKFYSP KRVHFPPIQA DMDKKRFSFV FKPVFNLSL FLQCELTLC KMEKHPQKLP
 721 KCVPPDEACT SLDASIIWAM MQNKKTFTKP LAVIHHEAES KEKGPSMKEP NPISPPIFHG
 781 LDTLTVMGIA FAAFVIGALL TGALWYIYSH TGETAGRQV PTSPPASENS SAAHSIGSTQ
 841 STPCSSSSIA (配列番号 54)

10

【0065】

シグナルペプチドは一重下線によって示され、細胞外ドメインは太字フォントで示され、膜貫通ドメインは点線下線によって示される。

20

【0066】

プロセッシングされたベータグリカンのアイソフォーム B のポリペプチド配列は以下の通りである。

【化8】

GPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPQQLQREVTLHLNPISSVHI
HHKSVVFLNLSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGA
VTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNSNPY
SAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKLILILKCKKSVNWVIKSFVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDI
PSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLENNEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGEG
QNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQ
ASGYSQMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVVYINSIVIQVPALGDSSGWPDGYEDLESG
DNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYV
EVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSHYTIIENICPKDESVKFSYSPKRVHFPIPQADMDKKRFSFVFKPVF
NLSLFLQCELTLCKMEKHPQKLPKCVPPDEACTSLDASIIWAMQNKKTFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEP
NPISPPIFHGLDTLTV
 (配列番号 55)

30

【0067】

ヒトベータグリカンのアイソフォーム B のプロセッシングされていない前駆体タンパク質をコードする核酸配列を下記に示し(配列番号 56)、これは、NCBI参照配列 NM_001195683.1 のヌクレオチド 516 ~ 3065 に対応する。シグナル配列は実線下線によって示され、膜貫通領域は点線下線によって示される。

40

【化 9】

ATGACTTCCCATTATGIGATTGCCATCTTTGCCCTGATGAGCTCCTGTTTAGCCACTGCAGGTCCAGAGCCTGGT
 GCACGTGTGAACTGTCACTGTCACTGTCAGTGCCTCCCATCCTGTCCAGGCCTTGATGGAGAGCTTCACTGTTTGTCA
 GGCTGTGCCAGCAGAGGCCACAACCTGGGCTGCCACAGGAGGTGCATGTCTGAAATCTCCGCACTGCAGGCCAGGGG
 CCTGGCCAGCTACAGAGAGAGGTACACTTCACTGAATCCCATCTCCTCAGTCCACATCCACCACAAGTCTGTT
 GTGTTCTGCTCAACTCCCCACACCCCTGGTGTGGCATCTGAAGACAGAGAGACTTGGCACTGGGGTCTCCAGA
 CTGTTTTTGGTGTCTGAGGGTCTGTGGTCCAGTTTTTCATCAGCAAACCTTCTCCTTGACAGCAGAAACAGAAGAA
 AGGAACTTCCCCCATGGAAATGAACATCTGTAAATTTGGGCCCGAAAAGAGTATGGAGCAGTTACTTTCATTCAAC
 GAACTCAAGATAGCAAGAAACATTTATATTAAGTGGGGGAAGATCAAGTGTCCCTCCAAAGTGCAACATAGGG
 AAGAATTTTCTCTCACTCAATTACCTTGCTGAGTACCTTCAACCCAAAGCAGCAGAAGGGTGTGTGATGTCCAGC
 CAGCCCCAGAATGAGGAAGTACACATCATCGAGCTAATCACCCCAACTCTAACCCCTACAGTGTCTTCCAGGTG
 GATATAACAATTGATATAAGACCTTCTCAAGAGGATCTTGAAGTGTCAAAAACTCATCCTGATCTTGAAGTGC
 AAAAAGTCTGTCAACTGGGTGATCAAACTTTTGATGTTAAGGGGAAGCCTGAAAAATTATGCTCCTAACAGTATT
 GGTCTTGGAAAAGAGAGTGAAGATCTATGACAATGACCAAATCAATAAGAGATGACATTCTTCAACCCAAAGGG
 AATCTGGTGAAGTGGGCTTTGGACAATGGCTATAGTCCAATAACTTCATACACAATGGCTCCTGTGGCTAATAGA
 TTTTCATCTTCGGCTTGAATAATGAGGAGATGGGAGATGAGGAAGTCCACACTATTCTCCTGAGCTACGGATC
 CTGCTGGACCCCTGGTGCCTGCCTGCCCTGCAGAACCCGCCCATCCGGGGAGGGGAAGGCCAAAATGGAGGCCTT
 CCGTTTCTTTCCAGATAATTTCCAGGAGAGTCTGGAATGAAGAGGGAGAAGATGGGCCTCCCTCGGCCAAAGGAC
 CCTGTCAATCCAGCATAACAACGTCTTCTGCTCAGAGAGCCAGAAGAGGTGCAAGGGAGCGTGGATATTGCC
 CTGCTGTCAAATGTGACAATGAGAAGATGATCGTGGCTGTAGAAAAAGATTCTTTTCAGGCCAGTGGCTACTCG
 GGGATGGACGTCAACCTGTGGATCCACCTGCAAGGCCAAGATGAATGGCACACACTTGTGTTTGGAGTCTCCT
 CTGAATGGCTGGGTACTCGGCCCGGTGGTCAAGCCCTTGTGTTGGTCTACTATAACTCCATTGTGATACAG
 GTTCCAGCCCTTGGGGACAGTAGTGGTGGCCAGATGGTTATGAAGATCTGGAGTCAAGGTGATAATGGATTTCCG
 GGAGATATGGATGAAGGAGATGCTTCCCTGTTCAACCCGACCTGAAATCGTGGTGTAAATTCAGCCTTCAGCAG
 GTGAGGAACCCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCACGGAACATCACCTTCAACATGGAGCTATACAACACTGAC
 CTCTTTTGGTGCCTCCAGGGCGTCTTCTCTGTGCCAGAGAATGGACACGTTTATGTTGAGGTACTGTACT
 AAGGCTGAACAAGAACCTGGGATTTGCCATCCAAACGTGCTTTATCTCTCCATATTGAAACCTGATAGGATGTCT
 CATTACACCATTATTGAGAAATTTGTCTTAAAGATGAATCTGTGAAATTTCTACAGTCCCAAGAGAGTGCACTTT
 CCTATCCCAGCAGCTGACATGGATAAGAAGCGATTACGCTTTGTCTTCAAGCCTGTCTTCAACACCTCACTGTCT
 TTTCTACAGTGTGAGCTGACGCTGTGTACGAAGATGGAGAAGCAGCCCCAGAAAGTTGCCCTAAGTGTGTGCCCTCT
 GACGAAGCCTGCACCTCGCTGGACGCTCGATAATCTGGCCATGATGCAGAATAAGAAGACGTTCACTAAGGCC
 CTGCTGTGATCCACCATGAAGCAGAATCTAAAGAAAAAGTCCAAGCATGAAGGAACCAAATCCAATTTCTCCA
 CCAATTTCCATGGTCTGGACACCCTAACCGTGTATGGGCATTGCGTTTGCAGCCTTTGTGATCGGAGCACCTCTG
 ACGGGGGCCTTGTGGTACATCTATTCTCACACAGGGGAGACAGCAGGAAGGCAGCAAGTCCCCACCTCCCCGCCA
 GCCTCGGAAAACAGCAGTGTGCCACAGCATCGGCAGCACGCAGAGCACGCCTTGCTCCAGCAGCAGCAGGCC
 (配列番号 56)

10

20

30

【 0 0 6 8 】

プロセシングされたベータグリカンのアイソフォーム B の細胞外ドメインをコードする
 核酸配列を下記に示す (配列番号 5 7) 。

40

【化 1 0】

GGTCCAGAGCCTGGTGCCTGTGTGAACTGTCACTGTCACTGTCAGTGCCTCCCATCCTGTCCAGGCCTTGATGGAGAGC
 TTCCTGTTTTGTGAGGCTGTGCCAGCAGAGGCACAACCTGGGCTGCCACAGGAGGTGCATGTCTGAAATCTCCGC
 ACTGCAGGCCAGGGGCTGGCCAGCTACAGAGAGAGGTCACTTCACTGAATCCCATCTCCTCAGTCCACATC

50

【化 1 1】

CACCACAAGTCTGTGTGTCTCTCAACTCCCCACACCCCTGGTGTGGCATCTGAAGACAGAGACTTGCC
 ACTGGGGTCTCCAGACTGTTTTTGGTGTCTGAGGGTCTGTGGTCCAGTTTTCATCAGCAAACTTCTCTTGACA
 GCAGAAACAGAAGAAAGAACTTCCCCATGGAAATGAACATCTGTTAAATTGGGCCGAAAAGAGTATGGAGCA
 GTTACTTCATTACCCGAACCTCAAGATAGCAAGAAACATTTATATTAAGTGGGGGAAGATCAAGTGTCCCTCCA
 AAGTGCACATAGGGAAGAATTTCTCTCACTCAATTACCTTGCTGAGTACCTTCAACCCAAAGCAGCAGAAGGG
 TGTGTGATGTCCAGCCAGCCCGAATGAGGAAGTACACATCATCGAGCTAATCACCCCAACTCTAACCCCTAC
 AGTGCTTTCCAGGTGGATATAACAATTGATATAAGACCTTCTCAAGAGGATCTTGAAGTGGTCAAAAATCTCATC
 CTGATCTTGAAGTGCAAAAAGTCTGTCAACTGGGTGATCAAAICTTTTGATGTTAAGGGAAGCCTGAAAATTAT
 GCTCCTAACAGTATTGGCTTTGGAAAAGAGAGTGAAAGATCTATGACAATGACCAATCAATAAGAGATGACATT
 CCTTCAACCCAAAGGAATCTGGTGAAGTGGGCTTTGGACAATGGCTATAGTCCAATAACTTCATACACAATGGCT
 CCTGTGGCTAATAGATTTTCATCTTCGGCTTGAAAATAATGAGGAGATGGGAGATGAGGAAGTCCACACTATTCCCT
 CCTGAGCTACGGATCCTGTCTGGACCCCTGGTGCCTGCCTGCCCTGCAGAACCCGCCATCCGGGGAGGGGAAGGC
 CAAAATGGAGGCCCTCCGTTTCCCTTCCAGATATTTCCAGGAGAGTCTGGAATGAAGAGGGAGAAGATGGGCTC
 CCTCGGCCAAAGGACCCTGICATTTCCAGCATACAACTGTTTCTGGTCTCAGAGAGCCAGAAGAGGTGCAAGGG
 AGCGTGGATATTGCCCTGTCTGTCAAATGTGACAATGAGAAGATGATCGTGGCTGTAGAAAAAGATTCTTTTCAG
 GCCAGTGGCTACTCGGGGATGGACGTCACCCTGTGGATCCTACCTGCAAGGCCAAGATGAATGGCACACACTTT
 GTTTTGGAGTCTCCTCTGAATGGCTGCGGTACTCGGCCCCGGTGGTCAGCCCTTGATGGTGTGGTCTACTATAAC
 TCCATTGTGATACAGGTTCCAGCCCTTGGGGACAGTAGTGGTGGCCAGATGGTTATGAAGATCTGGAGTCAGGT
 GATAATGGATTTCCGGGAGATATGGATGAAGGAGATGCTTCCCTGTTACCCGACCTGAAATCGTGGTGTTTAAT
 TGCAGCCTTACAGAGGTGAGGAACCCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCACGGAAACATCACCTTCAACATGGAG
 CTATACAACACTGACCTCTTTTGGTGCCTCCAGGGCGTCTTCTCTGTGCCAGAGAATGGACACGTTTATGTT
 GAGGTATCTGTTACTAAGGCTGAACAAGAACTGGGATTTGCCATCCAAACGTGCTTTATCTCTCATATTGAAAC
 CCTGATAGGATGTCTCATTACACCATATTGAGAATATTTGTCTAAAGATGAATCTGTGAAATTTACAGTCCC
 AAGAGAGTGCACTTCTATCCCGCAAGCTGACATGGATAAGAAGCGATTTCAGCTTTGTCTTCAAGCCTGTCTTC
 AACACCICACTGCTCTTTCTACAGTGTGAGCTGACGCTGTGTACGAAGATGGAGAAGCACCCCCAGAAGTTGCCT
 AAGTGTGTGCCTCCTGACGAAGCCTGCACCTCGTGGACGCCCTCGATAAATCTGGCCATGATGCAGAATAAGAAG
 ACGTTCACCTAAGCCCTTGTGTGATCCACCATGAAGCAGAATCTAAAGAAAAAGGTCCAAGCATGAAGGAACCA
 AATCCAATTTCTCCACCAATTTTCCATGGTCTGGACACCCTAACCGTG

(配列番号 57)

10

20

30

【 0 0 6 9 】

ある特定の実施形態では、本開示は、断片、機能的バリエーション、およびこれらの改変形態を含む、ベータグリカンポリペプチドに関する。好ましくは、本開示の発明による使用のためのベータグリカンポリペプチドは可溶性である（例えば、ベータグリカンの細胞外ドメインを含む）。他の好ましい実施形態では、本開示の発明による使用のためのベータグリカンポリペプチドは、1つまたは複数のTGFベータスーパーファミリーのリガンドと結合し、および/またはこれらの活性（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害する（アンタゴナイズする）。一部の実施形態では、ベータグリカンポリペプチドは、配列番号50、51、54または55のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ベータグリカンポリペプチドは、配列番号50のアミノ酸21~28のいずれか1つで開始し、配列番号50のアミノ酸381~787のいずれか1つで終了するポリペプチドと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号50のアミノ酸21~381と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのベータグリカンポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号50のアミノ酸21~787と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%

40

50

アミノ酸 28 ~ 730 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドで構成される。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号 50 のアミノ酸 21 ~ 28 のいずれか 1 つで開始し、配列番号 50 のアミノ酸 730 ~ 787 のいずれか 1 つで終了するポリペプチドと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号 50 のアミノ酸 21 ~ 787 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドで構成される。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号 50 のアミノ酸 28 ~ 730 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドで構成される。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、21 ~ 28 のアミノ酸（例えば、配列番号 54 のアミノ酸残基）のいずれか 1 つで開始し、配列番号 54 のアミノ酸 730 ~ 787 のいずれか 1 つで終了するポリペプチドと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号 54 のアミノ酸 21 ~ 786 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドで構成される。一部の実施形態では、本開示のポリペプチドは、配列番号 54 のアミノ酸 28 ~ 729 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である少なくとも 1 つのベータグリカンポリペプチドで構成される。

【0070】

ある特定の態様では、本開示は、ALK5 ポリペプチドを含むヘテロ多量体に関する。本明細書で使用される場合、「ALK5」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体様キナーゼ - 5 タンパク質のファミリー、および突然変異誘発または他の改変によるそのような ALK4 タンパク質に由来するバリエーションを指す。本明細書における ALK5 への言及は、現在特定されている形態のいずれか 1 つに対する言及であると理解される。ALK5 ファミリーのメンバーは、一般に、システインリッチ領域を有するリガンド結合性細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および予測されるセリン/トレオニンキナーゼ活性を有する細胞質ドメインで構成される膜貫通タンパク質である。

【0071】

「ALK5 ポリペプチド」という用語は、任意の天然に存在する ALK5 のポリペプチドのファミリーのメンバー、および有用な活性を維持した任意のこれらのバリエーション（突然変異体、断片、融合体およびペプチド模倣形態を含む）を含むポリペプチドを含む。

【0072】

ヒト ALK5 の前駆体タンパク質のアイソフォーム 1 配列（NCBI 参照配列 NP_004603.1）は以下の通りである。

10

20

30

40

【化 1 2】

1 MEAAVAAPRP RLLLLVLAAAA AAAAAALLPG **ATALQCFCHL** **CTKDNFTCVT**
DGLCFVSVTE
 61 **TTDKVIHNSM** **CIAEIDLIPR** **DRPFVCPASS** **KTGSVTTTYC** **CNQDHCNKIE**
LPTTVKSSPG
 121 **LGPVELAAVI** AGPVCFCVCIS LMLMVYICHN RTVIHHRVPN EEDPSLDRPF
ISEGTTLKDL
 181 IYDMTTSGSG SGLPLLQRT IARTIVLQES IGKGRFGEVW RGKWRGEEVA
VKIFSSREER
 241 SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS DYHEHGSLFD
YLNRYTVTVE
 301 GMIKLALSTA SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDLKSKNIL VKKNGTCCIA
DLGLAVRHDS
 361 ATDTIDIAPN HRVGTKRYMA PEVLDD SINM KHFESFKRAD IYAMGLVFWE
IARRCSIGGI
 421 HEDYQLPYD LVPSPSVVEE MRKVVCEQKL RPNIPNRWQS CEALRVMAKI
MRECWYANGA
 481 ARLTALRIKK TLSQLSQQEG IKM (**配列番号** 69)

10

20

【0073】

シグナルペプチドは一重下線によって示され、細胞外ドメインは太字フォントで示される。

【0074】

プロセシングされた細胞外 A L K 5 ポリペプチド配列は以下の通りである。

【化 1 3】

AALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVVC
 APSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIE LPTTVKSSPGLGPVEL (**配列番号** 70)

30

【0075】

A L K 5 前駆体タンパク質をコードする核酸配列を下記に示し(配列番号 32)、これは、Genbank 参照配列 NM_004612.2 のヌクレオチド 77 ~ 1585 に対

【0076】

40

50

【化 1 4】

ATGGAGGCGGCGGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCTGGCGGCGGCGGC
 GCGGCGGCGCGCGCGGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTA
CAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTCACAGAGACCACA
GACAAAGTTATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCC
GTTTGTATGTGCACCCTCTTCAAAAAGTGGTCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGG
ACCATTGCAATAAAATAGAACTTCCAACACTGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCTGTG
GAACTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATCTCACTCATGTTGATGGT
 CTATATCTGCCACAACCGCACTGTCATTACCATCGAGTGCCAAATGAAGAGGACCCTTCAT
 TAGATCGCCCTTTTATTTTTCAGAGGGTACTACGTTGAAAGACTTAATTTATGATATGACAACG
 TCAGGTTCTGGCTCAGGTTTACCATTGCTTGTTCAGAGAACAATTGCGAGAACTATTGTGTT
 ACAAGAAAGCATTGGCAAAGGTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGAGAAG
 AAGTTGCTGTTAAGATATTCTCCTCTAGAGAAGAACGTTTCGTGGTTCCTGAGGCAGAGATT
 TATCAAACCTGTAATGTTACGTCATGAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGA
 CAATGGTACTTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGAGATTATCATGAGCATGGATCCCTTTTTG
 ATTACTTAAACAGATACACAGTTACTGTGGAAGGAATGATAAAAAGTCTCTGTCCACGGCG
 AGCGGTCTTGCCCATCTTCACATGGAGATTGTTGGTACCCAAGGAAAGCCAGCCATTGCTCA
 TAGAGATTTGAAATCAAAGAATATCTTGGTAAAGAAGAATGGAACCTGCTGTATTGCAGACT
 TAGGACTGGCAGTAAGACATGATTCAGCCACAGATACCATTGATATTGCTCCAAACCACAGA
 GTGGGAACAAAAAGGTACATGGCCCTGAAGTTCTCGATGATTCATAAAATATGAAACATTT
 TGAATCCTTCAAACGTGCTGACATCTATGCAATGGGCTTAGTATTCTGGGAAATTGCTCGAC
 GATGTTCCATTGGTGGAAATTCATGAAGATTACCAAACCTGCTTATTATGATCTTGTACCTTCT
 GACCCATCAGTTGAAGAAATGAGAAAAGTTGTTTGTGAACAGAAAGTTAAGGCCAAATATCCC
 AAACAGATGGCAGAGCTGTGAAGCCTTGAAGTAATGGCTAAAAATATGAGAGAATGTTGGT

10

20

30

【化 1 5】

ATGCCAATGGAGCAGCTAGGCTTACAGCATTGCGGATTAAGAAAACATTATCGCAACTCAGT
 CAACAGGAAGGCATCAAAATG (配列番号 71)

【0077】

細胞外ヒトALK5ポリペプチドをコードする核酸配列は以下の通りである。

【化 1 6】

GCGGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTACAAAAGACAA
 TTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTCACAGAGACCACAGACAAAGTTA
 TACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGT
 GCACCCCTCTTCAAAAAGTGGTCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAA
 TAAAAATAGAACTTCCAACACTGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCTGTGGAAGCTG

40

(配列番号 72)

【0078】

ヒトALK5の前駆体タンパク質配列のアイソフォーム2の代替アイソフォーム(NCBI参照配列XP_005252207.1)は以下の通りである。

50

【化 17】

1 MEAAVAAPRP RLLLLVLAAA AAAAAALLPG ATALQCFCHL CTKDNFTCVT
DGLCFVSVTE
 61 **TTDKVIHNSM CIAEIDLIPR DRPFVCPASS KTGSVTTTTYC CNQDHCNKIE**
LPTTGPFVSVK
 121 **SSPGLGPVEL** AAVIAGPVCF VCISLMLMVY ICHNRTVIHH RVPNEEDPSL
 DRPFISEGTT
 181 LKDLIYDMTT SGSGSGLPLL VQRTIARTIV LQESIGKGRF GEVWRGKWRG
 EEVAVKIFSS
 241 REERSWFREA EIQYTVMLRH ENILGFIAAD NKDNGTWTQL WLVS DYHEHG
 SLFDYLNRYT
 301 VTVEGMIKLA LSTASGLAHL HMEIVGTQ GK PAIAHRDLKS KNILVKKNGT
 CCIADLGLAV
 361 RHDSATDTID IAPNHRVGTK RYMAPEVLDD SINMKHFESF KRADIYAMGL
 VFWEIARRCS
 421 IGGIHEDYQL PYYDLVPSDP SVEEMRKVVC EQKLRPNIPN RWQSCEALRV
 MAKIMRECWY
 481 ANGAARLTAL RIKKTLSQLS QQEGIKM (配列番号 73)

10

20

【0079】

シグナルペプチドは一重下線によって示され、細胞外ドメインは太字フォントで示される。

【0080】

プロセシングされた細胞外ALK5ポリペプチド配列(アイソフォーム2)は以下の通りである。

【化18】

AALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVC
 APSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFVSVKSSPGLGPVEL (配列番号 74)

30

【0081】

ヒトALK5前駆体タンパク質(アイソフォーム2)をコードする核酸配列を下記に示し(配列番号75)、これは、Genbank参照配列XM_005252150.1のヌクレオチド77~1597に対応する。シグナル配列は下線が付され、細胞外ドメインは太字フォントで示される。

40

50

【化 1 9】

ATGGAGGCGGCGGTGCTGCTCCGCGTCCCGGGCTGCTCCTCCTCGTGCTGGCGGCGGCGGC
GGCGGCGGCGGCGGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTA
CAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACA
GACAAAGTTATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCC
GTTTGTATGTGCACCCTCTTCAAAAAGTGGGTCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGG
ACCATTGCAATAAAATAGAACTTCCAACACTGAGCCCTTTTTTCAGTAAAGTCATCACCTGGC
CTTGGTCTGTGGAAGTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATCTCACT
CATGTTGATGGTCTATATCTGCCACAACCGCACTGTCATTACCCATCGAGTGCCAAATGAAG
AGGACCCTTCATTAGATCGCCCTTTTATTTTCAGAGGGTACTACGTTGAAAGACTTAATTTAT
GATATGACAACGTCAGGTTCTGGCTCAGGTTTACCATTGCTTGTTCAGAGAACAATTGCGAG
AACTATTGTGTTACAAGAAAGCATTGGCAAAGGTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGT
GGCGGGGAGAAGAAGTTGCTGTTAAGATATTCCTCTAGAGAAGAACGTTTCGTGGTTCCGT
GAGGCAGAGATTTATCAAAGTGAATGTTACGTCATGAAAACATCCTGGGATTTATAGCAGC
AGACAATAAAGACAATGGTACTTGGACTCAGCTCTGGTTGGTGTGAGATTATCATGAGCATG
GATCCCTTTTTGATTACTTAAACAGATACACAGTTACTGTGGAAGGAATGATAAACTTGCT
CTGTCCACGGCGAGCGGTCTTGCCCATCTTCACATGGAGATTGTTGGTACCCAAGGAAAGCC
AGCCATTGCTCATAGAGATTTGAAATCAAAGAATATCTTGGTAAAGAAGAATGGAACCTTGCT
GTATTGCAGACTTAGGACTGGCAGTAAGACATGATTCAGCCACAGATACCATTGATATTGCT
CCAAACCACAGAGTGGGAACAAAAGGTACATGGCCCTGAAGTTCTCGATGATTCCATAAA
TATGAAACATTTTGAATCCTTCAAACGTCGACATCTATGCAATGGGCTTAGTATTCTGGG
AAATTGCTCGACGATGTTCCATTGGTGGAAATTCATGAAGATTACCAACTGCCTTATTATGAT
CTTGTACCTTCTGACCCATCAGTTGAAGAAATGAGAAAAGTTGTTTGTGAACAGAAGTTAAG
GCCAAATATCCCAAACAGATGGCAGAGCTGTGAAGCCTTGAGAGTAATGGCTAAAATTATGA
GAGAATGTTGGTATGCCAATGGAGCAGCTAGGCTTACAGCATTGCGGATTAAGAAAACATTA
TCGCAACTCAGTCAACAGGAAGGCATCAAAATG (配列番号 75)

10

20

30

【0082】

プロセシングされた細胞外 A L K 5 ポリペプチドをコードする核酸配列は以下の通りである。

【化 2 0】

GCGGCGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTCCTGCCACCTCTGTACAAAAGACAA
TTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAGACAAAGTTA
TACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGT
GCACCCTCTTCAAAAAGTGGGTCTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAA
TAAAATAGAACTTCCAACACTACTGGCCCTTTTTTCAGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCTGT
TGGAAGT (配列番号 76)

40

【0083】

ある特定の実施形態では、本開示は、断片、機能的バリエーション、およびこれらの改変形態を含む、少なくとも 1 つの A L K 5 ポリペプチドを含むヘテロ多量体に関する。好ましくは、本開示による使用のための A L K 5 ポリペプチド（例えば、A L K 5 ポリペプチドを含むヘテロ多量体およびその使用）は可溶性である（例えば、A L K 5 の細胞外ドメイン）。他の好ましい実施形態では、本開示による使用のための A L K 5 ポリペプチドは、

50

1つまたは複数のTGFβスーパーファミリーのリガンドと結合し、および/またはこれらの活性（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害する（アンタゴナイズする）。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号69、70、73または74のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号69のアミノ酸25~36のいずれか1つ（例えば、アミノ酸残基25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35または36）で開始し、配列番号69のアミノ酸101~126のいずれか1つ（例えば、アミノ酸残基101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125または126）で終了するポリペプチドと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号69のアミノ酸25~101と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号69のアミノ酸25~126と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号69のアミノ酸36~101と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号69のアミノ酸36~126と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号73のアミノ酸25~36のいずれか1つ（例えば、アミノ酸残基25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35または36）で開始し、配列番号73のアミノ酸101~130のいずれか1つ（例えば、アミノ酸残基101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129または130）で終了するポリペプチドと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号73のアミノ酸25~101と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号73のアミノ酸25~130と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号73のアミノ酸36~101と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、本開示のヘテロ多量体は、配列番号73のアミノ酸36~130と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である少なくとも1つのALK5ポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

む。

【0084】

上記に記載するように、本開示は、天然に存在するT R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチドと特定の程度の配列同一性または類似性を共有する、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチドを提供する。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較の目的のためにアラインメントされる(例えば、ギャップは、最適なアラインメントのために第1および第2のアミノ酸もしくは核酸配列の1つまたは両方に導入することができ、非相同配列は、比較の目的のために無視することができる)。次いで、対応するアミノ酸位置でのアミノ酸残基が比較される。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置で同じアミノ酸残基によって占められる場合、その結果、分子はその位置で同一である(本明細書で使用される場合、アミノ酸「同一性」はアミノ酸「相同性」と等価である)。2つの配列の間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

10

【0085】

配列の比較、ならびに2つの配列の間の同一性および類似性パーセントの決定は、数学的アルゴリズム(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)を使用して達成することができる。

20

30

【0086】

一実施形態では、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で入手可能)におけるGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch(J Mol. Biol. (48): 444-453 (1970))のアルゴリズムを使用して決定される。詳細な実施形態では、以下のパラメーターがGAPプログラムにおいて使用される: Blossum 62行列またはPAM250行列のいずれか、ならびにギャップの重みが16、14、12、10、8、6または4、および長さの重みが1、2、3、4、5または6。さらに別の実施形態では、2つのヌクレオチド配列の間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12(1): 387 (1984))(<http://www.gcg.com>で入手可能)におけるGAPプログラムを使用して決定される。例示的なパラメーターは、NWsgapdna.CMP行列、ならびにギャップの重みが40、50、60、70または80、および長さの重みが1、2、3、4、5または6を使用することを含む。他に規定のない限り、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、Blossum 62行列、GAPの重みが10および長さの重みが3を使用するGAPプログラムを使用して決定されるべきであり、このようなアルゴリズムが所望の同一性パーセントをコンピュータで計算できない場合、本明細書に開示される好適な代替を選択すべきである。

40

【0087】

50

別の実施形態では、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、PAM120の重みの残余テーブル、ギャップ長さペナルティが12およびギャップペナルティが4を使用して、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている、E. MyersおよびW. Miller(CABIOS, 4:11-17(1989))のアルゴリズムを使用して決定される。

【0088】

2つのアミノ酸配列の間の最良の全体的なアラインメントを決定するための別の実施形態は、Brutlag et al.(Comp. App. Biosci., 6:237-245(1990))のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定することができる。配列アラインメントにおいて、クエリーおよび対象の配列は両方ともアミノ酸配列である。前記網羅的配列アラインメントの結果は、同一性パーセントに関して提示される。一実施形態では、アミノ酸配列同一性は、Brutlag et al.(Comp. App. Biosci., 6:237-245(1990))のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して行なわれる。詳細な実施形態では、アミノ酸アラインメントの同一性および類似性パーセントを計算するために用いられるパラメーターは、行列=PAM150、k-タプル=2、ミスマッチペナルティ=1、連結ペナルティ=20、ランダム化群の長さ=0、カットオフスコア=1、ギャップペナルティ=5およびギャップサイズペナルティ=0.05を含む。

【0089】

本開示のポリペプチド(例えば、TRIIPポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド)は、N末端で様々なリーダー配列のいずれかを追加で含んでもよい。このような配列は、ペプチドが、真核系において発現し、分泌経路を標的にすることを可能にするであろう。例えば、Ernstら、米国特許第5,082,783号(1992年)を参照されたい。あるいは、天然のシグナル配列(例えば、天然のTRIIPまたはベータグリカンのシグナル配列)は、細胞からの放出を生じさせるために使用されてもよい。可能なリーダー配列は、天然のリーダー、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)およびミツバチのメリチン(それぞれ、配列番号22~24)を含む。TPAリーダー配列が組み込まれるTRIIP-Fc融合タンパク質の例としては、配列番号11、13、15および17が挙げられる。シグナルペプチドのプロセッシングは、他の変数の中で、選択されるリーダー配列、使用される細胞型および培養条件に応じて変化し得、したがって、成熟ポリペプチドのための実際のN末端開始部位は、N末端またはC末端のいずれかの方向で、1、2、3、4または5アミノ酸までシフトし得る。TRIIP-Fc融合タンパク質の例としては、配列番号11、13、15および17が挙げられる。TRIIPの長いアイソフォームに基づく対応するバリエーションが、挿入に隣接するC末端位で保存的なVal-Ile置換とともに25アミノ酸挿入を含むことは当業者によって理解される。

【0090】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるいずれかのTRIIPポリペプチドは、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一であるが、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のアミノ酸配列と比較して、1つまたは複数のN末端アミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、TRIIPポリペプチドは、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つの1番目のアミノ酸(トレオニン)に対応するアミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、TRIIPポリペプチドは、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つの1番目および2番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニンおよびイソロイシン)に対応するアミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、TRIIPポリペプチドは、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つの1番目、2番目および3番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニ

10

20

30

40

50

ン、イソロイシンおよびプロリン)に対応するアミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つの1番目、2番目、3番目および4番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニン、イソロイシン、プロリン、プロリン)に対応するアミノ酸が欠如している。

【0091】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるいずれかのT R I Iポリペプチドは、配列番号18または48のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一であるが、配列番号18または48のアミノ酸配列と比較して、1つまたは複数のN末端アミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号18または48のいずれか1つの1番目および2番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニンおよびイソロイシン)に対応するアミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号18または48の1番目、2番目および3番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニン、イソロイシンおよびプロリン)に対応するアミノ酸が欠如している。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号18または48の1番目、2番目、3番目および4番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニン、イソロイシン、プロリン、プロリン)に対応するアミノ酸が欠如している。

【0092】

一部の実施形態では、本開示は、T R I Iポリペプチドの混合物を含む組成物であって、組成物中のT R I Iポリペプチドが、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含むが、組成物中のT R I Iポリペプチドの少なくとも一部分(例えば、少なくとも1%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%)が、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つの1番目、2番目、3番目および4番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニン、イソロイシン、プロリンおよびプロリン)に対応するアミノ酸を含み;組成物中のT R I Iポリペプチドの少なくとも一部分(例えば、少なくとも1%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%)が、配列番号18、20、27、30、34、36、37、38、39または48のいずれか1つの1番目、2番目、3番目および4番目のアミノ酸(それぞれ、トレオニン、イソロイシン、プロリンおよびプロリン)に対応するアミノ酸の1つまたは複数を欠如している、組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、T R I Iポリペプチドの混合物を含む組成物であって、T R I Iポリペプチドが、配列番号18または48のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一であるが、組成物中のT R I Iポリペプチドの少なくとも30%~80%が、配列番号18または48の1番目のアミノ酸(トレオニン)に対応するアミノ酸を欠如している、組成物を提供する。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号63~68のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一である。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチドは、配列番号68のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、97%、99%または100%同一である。

【0093】

ある特定の実施形態では、本開示は、ポリペプチドのグリコシル化を変更するように、ポリペプチド(例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド)の特定の突然変異を企図する。このような突然変異は、O連結もしくはN連結グリコシル化部位などの1つまたは複数のグリコシル化部位を導入あるいは取り除くように、選択され

10

20

30

40

50

得る。アスパラギン連結グリコシル化認識部位は、一般に、適切な細胞内グリコシル化酵素によって特異的に認識される、トリペプチド配列のアスパラギン - X - トレオニン（または、アスパラギン - X - セリン）（ここで、「X」は任意のアミノ酸である）を含む。変更はまた、（O連結グリコシル化部位のための）野生型ポリペプチドの配列への1つもしくは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加あるいは置換によって行なわれてもよい。グリコシル化認識部位の1番目もしくは3番目のアミノ酸位置の1つまたは両方での種々のアミノ酸置換または欠失（および/または2番目の位置でのアミノ酸欠失）は、改変されたトリペプチド配列で非グリコシル化をもたらす。ポリペプチドにおける糖質部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的または酵素的カップリングによる。使用されるカップリングの様式に応じて、糖は、（a）アルギニンおよびヒスチジン；（b）遊離カルボキシル基；（c）システインのものなどの遊離スルフヒドリル基；（d）セリン、トレオニンもしくはヒドロキシプロリンのものなどの遊離ヒドロキシル基；（e）フェニルアラニン、チロシンもしくはトリプトファンのものなどの芳香族残基；または（f）グルタミンのアミド基に付着し得る。これらの方法は、参照により本明細書に組み込まれる、1987年9月11日に公開された国際公開第87/05330号およびAplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。ポリペプチドに存在する1つまたは複数の糖質部分の除去は、化学的および/または酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化は、例えば、ポリペプチドのトリフルオロメタンスルホン酸化合物または等価な化合物への曝露を含み得る。この処理は、連結されている糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたはすべての糖の切断をもたらすが、アミノ酸配列は無傷なままである。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52およびEdge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131によってさらに記載されている。ポリペプチドにおける糖質部分の酵素的切断は、Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350による記載の種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞および植物細胞が、すべて、ペプチドのアミノ酸配列に影響を与え得る異なるグリコシル化パターンを導入し得るので、ポリペプチドの配列は、必要により、使用される発現系の種類に応じて調整されてもよい。一般に、ヒトにおける使用のためのポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）は、適切なグリコシル化を提供する哺乳動物細胞系、例えば、HEK293またはCHO細胞系で発現するが、他の哺乳動物発現細胞系、操作されたグリコシル化酵素を有する酵母細胞系および昆虫細胞も同様に有用であると予想される。

【0094】

本開示は、突然変異体、特に、ポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）のコンビナトリアル突然変異体のセット、ならびに切断型突然変異体を作製する方法をさらに企図し、コンビナトリアル突然変異体のプールは、機能的バリエーション配列を特定するために特に有用である。このようなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして作用し得るか、あるいはすべて一緒になって新規の活性を持つ、ポリペプチドバリエーションを作製することであり得る。種々のスクリーニングアッセイを下記に提供し、このようなアッセイは、バリエーションを評価するために使用され得る。例えば、T R I Iポリペプチドバリエーションは、T R I Iリガンドに結合する能力、T R I IリガンドのT R I Iポリペプチドへの結合を予防する能力、またはT R I Iリガンドによって引き起こされるシグナル伝達を干渉する能力についてスクリーニングされてもよい。T R I Iポリペプチドまたはそのバリエーションの活性はまた、細胞に基づくアッセイまたは*in vivo*アッセイ、特に実施例に開示されるいずれかのアッセイで試験され得る。

【0095】

天然に存在するポリペプチドの細胞外ドメインを含むポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）に対する選択性または一般に増加した効力を有するコンビナトリアル誘導バリエーションを作製することができる。同様に、突然変異誘発は、対応する野生型ポリペプチドと劇的に異なる血清半減期を有するバリエーションを生じさせることができる。例えば、変更されたタンパク質は、天然T R I Iポリペプチドの破壊、またはそうでなければ除外または不活性化をもたらす、タンパク質分解または他のプロセスに対して、より安定またはより不安定のいずれかにすることができる。このようなバリエーション、およびこれらをコードする遺伝子は、T R I Iポリペプチドの半減期を調節することによって、T R I Iポリペプチドのレベルを変更するために利用することができる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的効果を生じさせることができ、患者内での組換えポリペプチドのレベルのより厳密な制御を可能にし得る。Fc融合タンパク質中では、突然変異を、リンカー（もしあれば）および/またはFc部分中に生じさせて、タンパク質の半減期を変更することができる。

10

【0096】

コンビナトリアルライブラリーは、可能性のあるポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）配列の少なくとも一部分をそれぞれ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的手段で生成してもよい。例えば、可能性のあるポリペプチドの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、あるいはより大きな融合タンパク質（例えば、ファージディスプレイ）のセットとして、発現可能であるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、遺伝子配列に酵素的にライゲートすることができる。

20

【0097】

可能性のあるポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）バリエーションのライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる、多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動DNA合成機で行なうことができ、次いで、合成遺伝子を発現用の適切なベクターにライゲートすることができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である（例えば、Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477を参照されたい）。このような技術は、他のタンパク質の指向進化において用いられている（例えば、Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; ならびに米国特許第5,223,409号、米国特許第5,198,346号および米国特許第5,096,815号を参照されたい）。

30

40

【0098】

あるいは、他の形態の突然変異誘発を利用して、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、ポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）バリエーションは、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発など（Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1

50

993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; および Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085) を使用してスクリーニングすることにより; リンカー・スクリーニング突然変異誘発 (Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316) により; 飽和突然変異誘発 (Meyers et al., (1986) Science 232:613) により; PCR 突然変異誘発 (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) により; または化学的突然変異誘発等を含むランダム突然変異誘発 (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; および Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34) により、作製およびライブラリーから単離することができる。リンカー・スクリーニング突然変異誘発は、特に、コンビナトリアル条件では、ポリペプチドの切断 (生体活性) 型を特定するための魅力的な方法である。
【0099】

広範囲の技術が、点突然変異および切断により作られた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ために、さらに言えば、ある特定の特性を有する遺伝子産物について cDNA ライブラリーをスクリーニングするために、当技術分野で公知である。このような技術は、一般に、ポリペプチド (例えば、T R I I ポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド) のコンビナトリアル突然変異誘発により作製される遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広く使用されている技術は、典型的には、遺伝子ライブラリーを複製可能発現ベクターにクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および所望の活性の検出が、生成物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的容易な単離を促進する条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。好ましいアッセイとしては、リガンド結合アッセイおよびリガンド媒介細胞シグナル伝達アッセイが挙げられる。

【0100】

ある特定の実施形態では、本開示のポリペプチド (例えば、T R I I ポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド) は、天然ポリペプチド中に天然に存在する任意のものに加えて、翻訳後修飾をさらに含んでもよい。このような修飾としては、限定されるものではないが、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、ペグ化 (ポリエチレングリコール) およびアシル化が挙げられる。結果として、修飾されたポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、モノサッカリドまたはポリサッカリド、およびホスフェートなどの非アミノ酸要素を含有し得る。ポリペプチドの機能性に対するこのような非アミノ酸要素の効果は、他のポリペプチドバリエーションについて、本明細書に記載するようにして試験され得る。ポリペプチドが、ポリペプチドの新生型を切断することによって細胞中で生成される場合、翻訳後プロセッシングも、タンパク質の適正なフォールディングおよび/または機能のために重要であり得る。異なる細胞 (CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 または HEK293 など) は、このような翻訳後の活性に関する特異的な細胞内の仕組みおよび特徴的機構を有し、ポリペプチドの適正な修飾およびプロセッシングを確実にするために選択され得る。

【0101】

ある特定の態様では、本開示は、融合タンパク質 (例えば、T R I I 融合タンパク質またはベータグリカン融合タンパク質) を提供し、一部の実施形態では、第1の部分 (例えば、T R I I ポリペプチド部分またはベータグリカンポリペプチド部分) は、リンカーによって異種部分 (例えば、Fc 部分) と接続される。一部の実施形態では、リンカー

はグリシンおよびセリンリッチリンカーである。他の中性に近いアミノ酸、例えば、限定されるものではないが、Thr、Asn、ProおよびAlaもリンカー配列中で使用され得る。一部の実施形態では、リンカーは、GlyおよびSerを含有するアミノ酸配列の様々な順列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、10アミノ酸長より大きい。さらなる実施形態では、リンカーは、少なくとも12、15、20、21、25、30、35、40、45または50アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、リンカーは、40、35、30、25、22または20アミノ酸未満である。一部の実施形態では、リンカーは、10~50、10~40、10~30、10~25、10~21、10~15、10、15~25、17~22、20または21アミノ酸長である。一部の好ましい実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列GlyGlyGlyGlySer (GGGGS) (配列番号19)、またはその反復の(GGGGS)_n (式中、n ≥ 2)を含む。特定の
10
実施形態では、n = 3またはn = 3 ~ 10である。本出願は、(GGGGS)₄リンカーによって一緒に融合したTRIIP部分および異種部分を含むタンパク質が、n < 4の場合のTRIIP融合タンパク質と比較して、TGF-β1およびTGF-β3に対してより強い親和性で会合するという驚くべき知見を教示する。このため、好ましい実施形態では、n = 4またはn = 4 ~ 10である。本出願は、n > 4である(GGGGS)_nリンカーを含むタンパク質が、(GGGGS)₄リンカーを有するタンパク質と同様の阻害特性を有していたことも教示する。このため、一部の実施形態では、nは、(GGGGS)_nリンカーにおいて、4を超えない。一部の実施形態では、n = 4 ~ 10、4 ~ 9、4 ~ 8、4 ~ 7、4 ~ 6、4 ~ 5、5 ~ 8、5 ~ 7または5 ~ 6である。一部の実施形態では、n =
20
3、4、5、6または7である。特定の実施形態では、n = 4である。一部の実施形態では、(GGGGS)_n配列を含むリンカーは、N末端トレオニンも含む。一部の実施形態では、リンカーは、以下のいずれか1つである。

【化21】

GGGSGGGGS (配列番号 21)

TGGGSGGGGS (配列番号 4)

TGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 5)

TGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 6)

TGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 25)

TGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 26) または

TGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 40).

【0102】

一部の実施形態では、リンカーは、TGGPKSCDK (配列番号7)のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、N末端トレオニンが欠如した、配列番号21、4~7、25~26または40のいずれか1つである。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号26または40のアミノ酸配列を含まない。

【0103】

ある特定の態様では、TRIIP (またはベータグリカン) ポリペプチドの機能的バリ
40
アントまたは改変形態は、TRIIP (またはベータグリカン) ポリペプチドの少なくとも一部分および1つまたは複数の異種部分を有する融合タンパク質を含む。このような異種部分の周知の例としては、限定されるものではないが、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)またはヒト血清アルブミンが挙げられる。異種部分は、所望の特性を付与するように選択され得る。例えば、一部の異種部分は、アフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離のために特に有用である。アフィニティー精製の目的のためには、グルタチオン結合樹脂、アミラーゼ結合樹脂、およびニッケルまたはコバルト結合樹脂などの、アフィニティークロマトグラフィー用の関連するマトリックスが使用される。このよう
50

なマトリックスの多くは、Pharmacia GST精製システムおよび(HIS6)融合パートナーを用いる有用なQIAexpress(商標)システム(Qiagen)などの「キット」の形態で入手可能である。別の例としては、異種部分は、T R I I(またはベータグリカン)ポリペプチドの検出を容易にするために選択され得る。このような検出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質(例えば、GFP)、および特異的抗体が入手可能である通常は短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体が容易に入手可能である周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)およびc-mycタグが挙げられる。一部の 경우에는、異種部分は、Xa因子またはトロンピンに対するものなどの、プロテアーゼ切断部位を有し、これは、関連するプロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによって融合タンパク質から組換えタンパク質を自由にするのを可能にする。次いで、自由になったタンパク質は、その後のクロマトグラフィー分離によって、異種部分から単離することができる。ある特定の好ましい実施形態では、T R I I(またはベータグリカン)ポリペプチドは、T R I Iポリペプチドを*in vivo*で安定化するドメイン(「安定剤」ドメイン)と融合される。「安定化する」とは、これが破壊の減少、腎臓によるクリアランスの減少、または他の薬物動態効果によるものに関わらず、血清半減期を増加させるものを意味する。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範囲のタンパク質における望ましい薬物動態学的特性を付与することが公知である。同様に、ヒト血清アルブミンとの融合は、望ましい特性を付与することができる。選択され得る異種部分の他の種類としては、多量体化(例えば、二量体化、四量体化)ドメインおよび機能的ドメインが挙げられる。

10

20

【0104】

詳細な例として、本開示は、配列番号49のFcドメイン配列に融合したT R I Iポリペプチドのバリエーションを含む融合タンパク質を提供する。必要に応じて、Fcドメインは、Asp-265、Lys-322およびAsn-434(対応する全長IgGに従う番号付け)などの残基で1つまたは複数の突然変異を有する。ある特定の 경우에는、これらの突然変異の1つまたは複数(例えば、Asp-265突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインに対して、Fc受容体への結合能力が低減されている。他の場合には、これらの突然変異の1つまたは複数(例えば、Asn-434突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインに対して、MHCクラスI関連Fc受容体(FcRN)への結合能力が増加している。

30

【0105】

融合タンパク質の異なる要素は、所望の機能性と合致する任意の様式で配置されてもよいことが理解される。例えば、T R I I(またはベータグリカン)ポリペプチドは、異種ドメインに対してC末端に置かれてもよく、あるいは、異種ドメインは、T R I I(またはベータグリカン)ポリペプチドに対してC末端に置かれてもよい。T R I I(またはベータグリカン)ポリペプチドドメインおよび異種ドメインは、融合タンパク質中で隣接している必要はなく、追加のドメインまたはアミノ酸配列が、いずれかのドメインのC末端もしくはN末端に、またはドメイン間に含まれていてもよい。

【0106】

本明細書で使用される場合、「免疫グロブリンFcドメイン」または単に「Fc」という用語は、免疫グロブリン鎖の定常領域のカルボキシル末端部分、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常領域またはこれらの部分を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、1)CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメイン、2)CH1ドメインおよびCH2ドメイン、3)CH1ドメインおよびCH3ドメイン、4)CH2ドメインおよびCH3ドメイン、または5)2つまたはそれよりも多くのドメインおよび免疫グロブリンヒンジ領域の組合せを含んでいてもよい。好ましい実施形態では、免疫グロブリンFc領域は、少なくとも免疫グロブリンヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含み、好ましくは、CH1ドメインが欠如している。一部の実施形態では、免疫グロブリンFc領域は、ヒト免疫グロブリンFc領域である。

40

50

【0107】

一実施形態では、重鎖定常領域の由来となる免疫グロブリンのクラスは、I g G (I g) (サブクラス 1、2、3 または 4) である。

【0108】

ヒト I g G 1 の F c 部分 (G 1 F c) のために使用され得る天然アミノ酸配列の例を下記に示す (配列番号 5 8) 。点線下線はヒンジ領域を示し、実線下線は天然に存在するバリエーションを有する位置を示す。一部分では、本開示は、配列番号 5 8 と 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にこれらからなるか、またはこれらからなるポリペプチドを提供する。G 1 F c において天然に存在するバリエーションは、配列番号 5 8 (U n i p r o t P 0 1 8 5 7 を参照されたい) において使用される番号付け体系による E 1 3 4 D および M 1 3 6 L を含むであろう。

10

【化22】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK ( 配列番号 58)

```

20

【0109】

必要に応じて、I g G 1 F c ドメインは、A s p - 2 6 5、リジン 3 2 2 および A s n - 4 3 4 などの残基で 1 つまたは複数の突然変異を有する。ある特定の場合では、これらの突然変異の 1 つまたは複数 (例えば、A s p - 2 6 5 突然変異) を有する突然変異体 I g G 1 F c ドメインは、野生型 F c ドメインに対して、F c 受容体への結合能力が低減されている。他の場合では、これらの突然変異の 1 つまたは複数 (例えば、A s n - 4 3 4 突然変異) を有する突然変異体 F c ドメインは、野生型 I g G 1 F c ドメインに対して、M H C クラス I 関連 F c 受容体 (F c R N) への結合能力が増加している。

【0110】

ヒト I g G 2 の F c 部分 (G 2 F c) のために使用され得る天然アミノ酸配列の例を下記に示す (配列番号 5 9) 。点線下線はヒンジ領域を示し、二重下線は、配列中で矛盾するデータベースが存在する位置を示す (U n i P r o t P 0 1 8 5 9 による) 。一部分では、本開示は、配列番号 5 9 と 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にこれらからなるか、またはこれらからなるポリペプチドを提供する。

30

【化23】

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSL S L S L S PGK ( 配列番号 59)

```

40

【0111】

ヒト I g G 3 の F c 部分 (G 3 F c) のために使用され得るアミノ酸配列の 2 つの例を下記に示す。G 3 F c におけるヒンジ領域は、他の F c 鎖の最大で 4 倍程度の長さであり得、類似の 1 7 残基セグメントに先行する 3 つの同一の 1 5 残基セグメントを含有する。下記に示す第 1 の G 3 F c 配列 (配列番号 6 0) は、単一の 1 5 残基セグメントからなる

50

短いヒンジ領域を含有するが、第2のG3Fc配列(配列番号61)は全長ヒンジ領域を含有する。それぞれの場合で、点線下線はヒンジ領域を示し、実線下線は、UniProt P01859による天然に存在するバリエーションを有する位置を示す。一部分では、本開示は、配列番号60または61と70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にこれらからなるか、またはこれらからなるポリペプチドを提供する。

【化24】

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (配列番号 60)

```

10

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK (配列番号 61)

```

20

【0112】

G3Fcにおける天然に存在するバリエーション(例えば、UniProt P01860を参照されたい)は、配列番号60において使用される番号付け体系に変換される場合、E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Yを含み、本開示は、これらの1つまたは複数のバリエーションを含有するG3Fcドメインを含む融合タンパク質を提供する。加えて、ヒト免疫グロブリンIgG3遺伝子(IGHG3)は、異なるヒンジの長さによって特徴付けられる構造的多形を示す(UniProt P01859を参照されたい)。詳細には、バリエーションWISは、V領域の大部分およびCH1領域のすべてが欠如している。これは、ヒンジ領域中に通常存在する11個に加えて、7位に余分な鎖間ジスルフィド結合を有する。バリエーションZUCは、大部分のV領域、CH1領域のすべて、およびヒンジの一部が欠如する。バリエーションOMMは、対立遺伝子型または別のガンマ鎖サブクラスを表わし得る。本開示は、これらのバリエーションの1つまたは複数を含むG3Fcドメインを含む追加の融合タンパク質を提供する。

30

【0113】

ヒトIgG4のFc部分(G4Fc)のために使用され得る天然アミノ酸配列の例を下記に示す(配列番号62)。点線下線はヒンジ領域を示す。一部分では、本開示は、配列番号62と70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、本質的にこれらからなるか、またはこれらからなるポリペプチドを提供する。

40

【化 2 5】

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
 51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
 101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
 151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
 201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (配列番号 62)

【0114】

F c ドメイン中の種々の遺伝子操作された突然変異は、G 1 F c 配列 (配列番号 5 8) に関して本明細書において提示され、G 2 F c、G 3 F c および G 4 F c 中の類似の突然変異は、図 7 における G 1 F c とのそれらのアラインメントから誘導することができる。不均一なヒンジ長に起因して、アイソタイプアラインメント (図 7) に基づく類似の F c の位置は、配列番号 5 8、5 9、6 0、6 1 および 6 2 中で異なるアミノ酸数を持つ。ヒンジ、C_H 2 および C_H 3 領域からなる免疫グロブリン配列 (例えば、配列番号 5 8、5 9、6 0、6 1 および 6 2) 中の所与のアミノ酸位置は、番号付けが、Uniprot データベースにおけるように全 I g G 1 重鎖定常ドメイン (C_H 1、ヒンジ、C_H 2 および C_H 3 領域からなる) を包含する場合に、同じ位置とは異なる数字により特定されることも明らかであり得る。

【0115】

免疫グロブリンの他のクラスである I g A (I g)、I g D (I g)、I g E (I g) および I g M (I g μ) を使用してもよい。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択は、米国特許第 5, 5 4 1, 0 8 7 号および米国特許第 5, 7 2 6, 0 4 4 号において詳細に議論されている。特定の結果を達成するためのある特定の免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスからの特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列の選択は、当技術分野における技量のレベル内であると考えられる。免疫グロブリン F c 領域をコードする D N A 構築物の部分は、少なくともヒンジドメインの部分を含み、好ましくは、F c ガンマの C_H 3 ドメイン、または I g A、I g D、I g E もしくは I g M のいずれか中の相同ドメインの少なくとも一部分を含む。

【0116】

さらにまた、免疫グロブリン重鎖定常領域内のアミノ酸の置換または欠失が、本明細書に開示される方法および組成物の実施において有用であり得ることが企図される。一例は、C_H 2 領域の上部にアミノ酸置換を導入して、F c 受容体に対する親和性が低減された F c バリエーションを作製することであろう (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613)。

【0117】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号 1 1、1 3、1 5 および 1 7 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む T R I I ポリペプチド融合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、T R I I ポリペプチド融合タンパク質は、配列番号 1 1、1 3 および 1 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I I ポリペプチド融合タンパク質は、配列番号 1 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I I ポリペプチド融合タンパク質は、配列番号 6 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同

10

20

30

40

50

一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号48のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号64のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号65のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号66のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号67のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号68のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。一部の実施形態では、T R I Iポリペプチド融合タンパク質は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物学的に活性な断片を含む。

10

20

【0118】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、T G F 1およびT G F 3に対する改善された結合親和性を有する。一部の実施形態では、少なくとも10アミノ酸長のリンカーを含む融合タンパク質（例えば、配列番号11、13、15、48および63~68のいずれか1つのアミノ酸配列を有する融合タンパク質）は、参照融合タンパク質（例えば、配列番号9のアミノ酸配列を有する融合タンパク質）と比較して、T G F 1およびT G F 3に対する改善された結合親和性を有する。一部の実施形態では、融合タンパク質は、200 pM未満、150 pM未満、100 pM未満、75 pM未満、50 pM未満、または25 pM未満の K_D でT G F 1に結合する。一部の実施形態では、融合タンパク質は、75 pM未満、70 pM未満、60 pM未満、50 pM未満、40 pM未満、35 pM未満、25 pM未満、15 pM未満、10 pM未満、または5 pM未満の K_D でT G F 3に結合する。

30

【0119】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるいずれかのポリペプチドは、測定可能なアッセイにおいて、T G F 1および/またはT G F 3を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.08、0.09、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03または0.02 nM未満の IC_{50} でT G F 1を阻害する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03または0.02 nM未満の IC_{50} でT G F 3を阻害する。一部の実施形態では、レポーター遺伝子アッセイは、C A G Aレポーターアッセイである。一部の実施形態では、C A G Aアッセイは、p G L 3 (C A G A) 12レポータープラスミド (D e n n l e r e t a l , 1998 , E M B O 17 : 3091 - 3100)、およびトランスフェクト効率について制御するためのR e n i l l aレポータープラスミド (p R L C M V) でトランスフェクトされたヒト肺癌細胞系に基づく。C A G Aモチー

40

50

フは、TGF 応答遺伝子（例えば、PAI-1）のプロモーター中に存在し、そのため、このベクターは、一般に、SMAD2およびSMAD3を介してシグナル伝達する因子のために使用される。例えば、実施例2を参照されたい。

【0120】

一部の実施形態では、本開示は、TRII（またはベータグリカン）含有融合ポリペプチドを提供する。融合ポリペプチドは、本明細書に開示される方法または当技術分野において公知の方法のいずれかにより調製され得る。

【0121】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるいずれかの融合ポリペプチドは、以下の成分を含む：a) 本明細書に開示されるいずれかのTRII（またはベータグリカン）ポリペプチド（「A」）、b) 本明細書に開示されるいずれかのリンカー（「B」）、c) 本明細書に開示されるいずれかの異種部分（「C」）、および必要に応じてリンカー（「X」）。このような実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：A-B-CまたはC-B-Aで配列され得る。このような実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-A-B-CまたはX-C-B-Aで配列され得る。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、A、BおよびCのそれぞれ（および必要に応じて、配列番号23のアミノ酸配列などのリーダー配列）を含み、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）。

【0122】

一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-A-B-Cに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびAの間に1、2、3、4または5アミノ酸を含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-C-B-Aに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびCの間に1、2、3、4または5アミノ酸を含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-A-B-Cに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびAの間にアラニンを含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-C-B-Aに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびCの間にアラニンを含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-A-B-Cに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびAの間にグリシンおよびアラニンを含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-C-B-Aに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびCの間にグリシンおよびアラニンを含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-A-B-Cに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびAの間にトレオニンを含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、以下の様式（N末端～C末端）：X-C-B-Aに位置するリーダー配列（例えば、配列番号23）を含み、融合ポリペプチドは、XおよびCの間にトレオニンを含む。

【0123】

一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、本明細書に開示されるTRIIポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか（例えば、配列番号18）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、融合ポリペプチドのTRIIポリペプチド部分は、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、本明細書に開示されるリンカー配列のいずれか（例えば、配列番号6）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含み、融合ポリペプチドのリンカー部分は、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、本明細書に開示される異種部分の配列のいずれか（例えば、配列番号49）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、融合ポリペプチドの異種部分は、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、本明細書に開示されるT R I Iポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか（例えば、配列番号18）を含み、融合ポリペプチドのT R I Iポリペプチド部分は、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、本明細書に開示されるリンカー配列のいずれか（例えば、配列番号6）を含み、融合ポリペプチドのリンカー部分は、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、本明細書に開示される異種部分の配列のいずれか（例えば、配列番号49）を含み、融合ポリペプチドの異種部分は、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）。

10

【0124】

一部の実施形態では、本開示は、融合ポリペプチドであって、融合ポリペプチドが、a)本明細書に開示されるT R I Iポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか（例えば、配列番号18）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列であって、融合ポリペプチドのT R I Iポリペプチド部分は、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）；b)本明細書に開示されるリンカー配列のいずれか（例えば、配列番号6）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列であって、融合ポリペプチドの異種部分は、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含み（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）、ならびにc)本明細書に開示される異種部分の配列のいずれか（例えば、配列番号49）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列であって、融合ポリペプチドの異種部分は、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）；ならびにd)必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号23）からなるか、またはこれらから本質的になる（必ずしもこの順序ではない）。一部の実施形態では、本開示は、融合ポリペプチドであって、融合ポリペプチドが、a)本明細書に開示されるT R I Iポリペプチドのアミノ酸配列のいずれか（例えば、配列番号18）であって、融合ポリペプチドのT R I Iポリペプチド部分は、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）；b)本明細書に開示されるリンカー配列のいずれか（例えば、配列番号6）であって、融合ポリペプチドの異種部分は、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含み（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）、ならびにc)本明細書に開示される異種部分の配列のいずれか（例えば、配列番号49）であって、融合ポリペプチドの異種部分は、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下の追加のアミノ酸を含む（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでもよい）；ならびにd)必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号23）からなるか、またはこれらから本質的になる（必ずしもこの順序ではない）。

20

30

40

50

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態では、本開示は、 a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、および 1 0、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸からなる T R I I ポリペプチド部分（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）； b) 配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、および 5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸からなるリンカー部分（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）；ならびに c) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、および 2 5、2 0、1 5、1 0、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸配列からなる異種部分（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）；ならびに d) 必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号 2 3）からなるか、またはこれらから本質的になる（必ずしもこの順序ではない）融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、 a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列、および 1 0、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸からなる T R I I ポリペプチド部分（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）； b) 配列番号 6 のアミノ酸配列、および 5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸からなるリンカー部分（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）；ならびに c) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列、および 2 5、2 0、1 5、1 0、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸からなる異種部分（しかし、ペグ化などのさらなる翻訳後修飾を含んでいてもよい）；ならびに d) 必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号 2 3）からなるか、またはこれらから本質的になる（必ずしもこの順序ではない）融合ポリペプチドを提供する。

10

20

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態では、融合タンパク質はリーダー配列を含まない。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 4 8 のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【 化 2 6 】

TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHLRHHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQK
 SCMSNCSITSICEKPEVVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETF
 FMCSCSSDECNENIIFSEEYNTSNPDTGGGGSGGGGGSGGGGGSTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF
 PPKPKDILMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
 (配列番号 48)

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、本開示は、ポリペプチドが抗体またはその抗原結合部分を含まない、T R I I 融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、形質転換成長因子ベータスーパーファミリーのリガンド（例えば、T G F 1、T G F 2 および / または T G F 3）以外のサイトカインと認識可能な親和性で結合しない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、T G F 1、T G F 2 および / または T G F 3 以外のサイトカインと認識可能な親和性で結合しない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、T G F 1 および / または T G F 3 以外のサイトカインと認識可能な親和性で結合しない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、C D 4、C D 8、C D 2 5、C T L A - 4、I L - 1 0、T G F 受容体、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、R A N K、R A N K L、H E R 2 / n e u、E G F R 1、C D 2 0、V E G F、T N F - 、T N F R 2、F o x P 3、C D 8 0、C D 8 6、I F N - 、I F N - 、I F N - 、G I T R、4 - 1 B B、O X - 4 0、T L R 1 - 1 0、E r b B - 1、H E R 1、E r b B - 3 / H

40

50

ER3、ErbB-4/HER4、IGFR、IGFBP、IGF-1R、PDGFR、FGFR、VEGFR、HGFR、TRK受容体、エフリン受容体、AXL受容体、LTK受容体、TIE受容体、アンジオポエチン1、2、ROR受容体、DDR受容体、RET受容体、KLG受容体、RYK受容体、MusK受容体、ILR、ILR、TNTRSF、TRAIL受容体、ARTC1、アルファ-アクチニン-4、Bcr-abl、B-RAF、カスパーゼ、ベータ-カテニン、フィブロネクチン、GPNMB、GDP-L、LDLR、HLA-A2、MLA-A11、HSP70、KIAA205、MART2、MUM-1、2、3、PAP、neo-PAP、NFYC、OGT、OS-9、pm1-RARアルファ融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、KRAS2、NRAS、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1または-SSX2融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGE-1、BAGE-2、3、4、5、GAGE-1、2、3、4、5、6、7、8、GnT-V、HERV-KMEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、CAMEL、MAGE-1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1(MUC1)、MART-1/メラニン-A(MLANA)、gp100、gp100/Pme117(S1LV)、チロシナーゼ(TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1、2、3、4、TRP2-1NT2、癌胎児性胚抗原(CEA)、カリクレイン(Kallikrein)4、マンマグロビン(mammaglobin)-A、OA1、前立腺特異的抗原(PSA)、前立腺特異的膜抗原、TRP-1/、75、TRP-2、AIM-2、BING-4、CPSF、サイクリンD1、Ep-CAM、EpbA3、FGF-5、gp250、iCE、AFP、M-CSF、mdm-2、MUCI、p53(TP53)、PBF、FRAME、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、サバイピン(BIRCS)、hTERT、テロメラーゼ、WT1、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIP1、CTAGE-1、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF15q14、HCA66I、LDHC、MORC、SGY-1、SPO11、TPX1、NY-SAR-35、FTHLI7、NXF2、TDRD1、TEX15、FATE、TPTE、エストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、CD4、CD25、CD3、CA72-4、CA15-3、CA27-29、CA125、CA19-9、ベータ-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、1-2ミクログロブリン、扁平上皮癌抗原、ニューロン特異的enolase、熱ショックタンパク質gp96、GM2、サルグラムスチム、CTLA-4、707-AP、ART-4、CAP-1、CLCA2、Cyp-B、HST-2、HPVタンパク質、EBVタンパク質、B型肝炎もしくはC型肝炎ウイルスタンパク質、および/またはHIVタンパク質と、認識可能な親和性で結合しない。

【0128】

一部の実施形態では、本開示は、ポリペプチドが、TRIIDメインに加えて追加のリガンド結合ドメインを含まない、TRII融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、TRIIDメインおよび異種部分(例えば、Fc部分)を含む直鎖状アミノ酸配列を含むが、直鎖状アミノ酸配列は、任意の追加のリガンド結合ドメインを含まない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、TRIIDメインおよびFc部分を含む直鎖状アミノ酸配列を含むが、直鎖状アミノ酸配列は、任意の追加のリガンド結合ドメインを含まない。一部の実施形態では、本開示は、ポリペプチドが、単一の直鎖状アミノ酸配列中に複数のリガンド結合ドメインを含まない、TRII融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、ポリペプチドが、単一の直鎖状アミノ酸配列中に2つ以上の連続するリンカー配列を含まない、TRII融合ポリペプチドを

10

20

30

40

50

提供する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、単一の直鎖状アミノ酸配列中に複数の連続するグリシンおよび/またはセリンリンカー（例えば、(GGGS)_n（式中、 $n > 4$ ）を含むリンカー）を含まない。一部の実施形態では、本開示は、異種部分がFcドメインであり、唯一の連続するリンカーがFcドメインと共有結合する、TRIIF融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、唯一の連続するリンカーは、(GGGS)_nリンカー（式中、 $n > 4$ ）を含むか、またはこれからなる。

【0129】

本出願は、遺伝子操作されたFc領域またはバリエーションFc領域を有するFc融合タンパク質をさらに提供する。このような抗体およびFc融合タンパク質は、例えば、抗原依存性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)などのエフェクター機能の調節において有用であり得る。加えて、改変は、抗体およびFc融合タンパク質の安定性を改善し得る。抗体およびFc融合タンパク質のアミノ酸配列バリエーションは、適切なヌクレオチド変化をDNAに導入することによって、またはペプチド合成によって、調製される。このようなバリエーションとしては、例えば、本明細書に開示される抗体およびFc融合タンパク質のアミノ酸配列からの欠失、ならびに/またはこのアミノ酸配列への挿入、ならびに/またはこのアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。欠失、挿入および置換の任意の組合せは、最終構築物が所望の特性を持つならば、最終構築物に達するために行なわれる。グリコシル化部位の数または位置の変化などのアミノ酸の変化はまた、抗体およびFc融合タンパク質の翻訳後プロセスを変更し得る。

【0130】

低減されたエフェクター機能を有する抗体およびFc融合タンパク質は、限定されないが、Bluestone et al. (国際公開第94/28027号および国際公開第98/47531号を参照されたい; Xu et al., 2000 Cell Immunol 200; 16-26も参照されたい)に記載のAla-Ala突然変異を含む、アミノ酸配列における変化を導入することによって生成され得る。したがって、ある特定の実施形態では、Ala-Ala突然変異を含む定常領域内の突然変異を有する本開示のFc融合タンパク質は、エフェクター機能を低減または無効化するために使用され得る。これらの実施形態によれば、抗体およびFc融合タンパク質は、234位でのアラニンへの突然変異、もしくは235位でのアラニンへの突然変異、またはこれらの組合せを含んでいてもよい。一実施形態では、抗体またはFc融合タンパク質は、IgG4フレームワークを含み、Ala-Ala突然変異は、234位でのフェニルアラニンからアラニンへの突然変異、および/または235位でのロイシンからアラニンへの突然変異を記載する。別の実施形態では、抗体またはFc融合タンパク質は、IgG1フレームワークを含み、Ala-Ala突然変異は、234位でのロイシンからアラニンへの突然変異、および/または235位でのロイシンからアラニンへの突然変異を記載する。抗体またはFc融合タンパク質は、代替で、または追加で、CH2ドメイン中の点突然変異K322Aを含む他の突然変異を保有していてもよい(Hezareh et al., 2001 J Virol, 75: 12161-8)。

【0131】

特定の実施形態では、抗体またはFc融合タンパク質は、補体依存性細胞傷害(CDC)を増強または阻害するかのいずれかのために改変されていてもよい。調節されたCDC活性は、Fc領域中の1つもしくは複数のアミノ酸の置換、挿入または欠失を導入することによって、達成され得る(例えば、米国特許第6,194,551号を参照されたい)。あるいは、または加えて、システイン残基が、Fc領域に導入されていてもよく、それによって、この領域において鎖間のジスルフィド結合の形成を可能にする。このようにして作製されたホモ二量体抗体は、改善もしくは低減された内部移行能、および/または増加もしくは減少した補体媒介細胞死滅を有し得る。Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)およびShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)、国際公開第99/51642号、Duncan & Winter Nature 322: 738-40

10

20

30

40

50

(1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；ならびに国際公開第94/29351号を参照されたい。

B. 核酸および製造の方法

【0132】

ある特定の実施形態では、本開示は、ポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）の単離された形態および/または精製された形態を入手可能にし、これは、他のタンパク質および/もしくは他のポリペプチド種から単離されるか、またはそうでなければ、これらを実質的に含まない（例えば、少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%含まない）。ポリペプチドは、一般に、組換え核酸からの発現によって生成される。

10

【0133】

ある特定の実施形態では、本開示は、タンパク質（例えば、T R I Iタンパク質またはベータグリカンタンパク質）の細胞外部分のためのコード配列を含む可溶性のポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）をコードする核酸を含む。さらなる実施形態では、本開示は、このような核酸を含む宿主細胞にも関連する。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、本開示のポリペプチドは、E. coliなどの細菌細胞、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現系の使用）、酵母または哺乳動物細胞において発現され得る。他の好適な宿主細胞が当業者に公知である。したがって、本開示の一部の実施形態は、ポリペプチドを生成する方法にさらに関連する。

20

【0134】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に開示される断片、機能的バリエーションおよび融合タンパク質を含む、ポリペプチド（例えば、T R I Iポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）のいずれかをコードする単離された核酸および/または組換え核酸を提供する。配列番号8、10、12、14、16、46または47は、IgG Fcドメインと融合したT R I I細胞外ドメインのバリエーションをコードする。対象の核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。このような核酸は、DNAまたはRNA分子であり得る。これらの核酸は、例えば、ポリペプチドを作成するための方法において、または直接治療剤（例えば、アンチセンス、RNAiまたは遺伝子治療アプローチ）として使用され得る。

30

【0135】

ある特定の態様では、ポリペプチドをコードする対象の核酸は、配列番号8、10、12、14、16、46または47のバリエーションである核酸を含むことがさらに理解される。バリエーションのヌクレオチド配列は、対立遺伝子バリエーションなどの、1つもしくは複数のヌクレオチドの置換、付加または欠失によって異なる配列を含む。

【0136】

ある特定の実施形態では、本開示は、配列番号8、10、12、14、16、46もしくは47と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である単離された核酸配列または組換え核酸配列を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、配列番号12またはその断片と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である単離された核酸配列または組換え核酸配列を提供する。当業者には、配列番号8、10、12、14、16、46または47と相補的な核酸配列、および配列番号8、10、12、14、16、46または47のバリエーションも本開示の範囲内であることは明らかである。さらなる実施形態では、本開示の核酸配列は、単離されているか、組換えであるか、および/もしくは異種ヌクレオチド配列と融合されているか、またはDNAライブラリー中の核酸配列であり得る。

40

【0137】

他の実施形態では、本開示の核酸は、配列番号8、10、12、14、16、46もし

50

くは47において指定されたヌクレオチド配列、配列番号8、10、12、14、16、46もしくは47の相補体配列、またはその断片に、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列も含む。上記で議論されたように、当業者は、DNA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な条件が多様であり得ることを容易に理解する。例えば、6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)で、約45でのハイブリダイゼーション、続いて、2.0×SSCで、50での洗浄を行なうことができる。例えば、洗浄ステップ中の塩濃度は、約2.0×SSC、50の低ストリンジェンシーから、約0.2×SSC、50の高ストリンジェンシーまで選択することができる。加えて、洗浄ステップにおける温度は、室温、約22の低ストリンジェンシー条件から、約65の高ストリンジェンシー条件まで上昇させることができる。温度および塩の両方を変化させることができ、または、他の変数を変えながら、温度もしくは塩濃度を一定に保持してもよい。一部の実施形態では、本開示は、6×SSC、室温の低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし、続いて、2×SSC、室温で洗浄した核酸を提供する。

【0138】

配列番号8、10、12、14、16、46または47において記述された核酸と異なる単離された核酸も、遺伝コードにおける縮重に起因して、本開示の範囲内である。例えば、いくつかのアミノ酸が、2つ以上の三連塩基によって指定される。同じアミノ酸を特定するコドン、またはシノニム(例えば、CAUおよびCACはヒスチジンに対するシノニムである)は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を与えない「サイレント」突然変異をもたらし得る。しかしながら、対象のタンパク質のアミノ酸配列における変更をもたらすDNA配列多型が、哺乳動物細胞の間に存在すると予想される。当業者には、特定のタンパク質をコードする核酸の1つまたは複数のヌクレオチド(最大でヌクレオチドの約3~5%)におけるこれらのバリエーションが、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して所与の種の個体間で存在し得ることは明らかである。ありとあらゆるこのようなヌクレオチドバリエーションおよび結果として生じるアミノ酸多型は、本開示の範囲内である。

【0139】

T R I Iの長いアイソフォームに基づく対応するバリエーションが、挿入に隣接するC末端位で保存的なVal-Ile置換とともに25アミノ酸挿入をコードするヌクレオチド配列を含むことは当業者には明らかである。T R I Iの長い(A)アイソフォームまたは短い(B)アイソフォームのいずれかに基づく対応するバリエーションが、天然に存在するT R I IのアイソフォームCについての記載と同じ場所で、108ヌクレオチドの挿入を含み、36アミノ酸の挿入をコードするバリエーションヌクレオチド配列(配列番号41)を含むことも明らかである。

【0140】

ある特定の実施形態では、本開示の組換え核酸は、発現構築物中で、1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。調節ヌクレオチド配列は、一般に、発現のために使用される宿主細胞について適切である。多数の種類 of 適切な発現ベクターおよび好適な調節配列が、種々の宿主細胞に対して当技術分野で公知である。典型的には、前記1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列としては、限定されるものではないが、プロモーター配列、リーダーまたはシグナル配列、リボソーム結合性部位、転写開始配列および転写終結配列、翻訳開始配列および翻訳終結配列、ならびにエンハンサー配列またはアクチベーター配列が挙げられ得る。当技術分野で公知の構成プロモーターまたは誘導プロモーターは、本開示によって企図される。プロモーターは、天然に存在するプロモーター、または2以上のプロモーターの要素を組み合わせたハイブリッドプロモーターのいずれかであり得る。発現構築物は、プラスミドなどのエピソームにおいて細胞中で存在していてもよく、または発現構築物は染色体に挿入されてもよい。好ましい実施形態では、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含む。選択マーカー遺伝子は、当技術分野において周知であり、使用される宿主細胞とともに変わる。

10

20

30

40

50

【0141】

本明細書に開示されるある特定の態様では、対象の核酸は、ポリペプチド（例えば、T R I I ポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）をコードし、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含む発現ベクター中で提供される。調節配列は、当技術分野で認識され、T ポリペプチドの発現を指示するために選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節配列は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。例えば、作動可能に連結された場合に、DNA配列の発現を制御する広い範囲の発現制御配列のいずれかを、これらのベクター中で使用して、ポリペプチド（例えば、T R I I ポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）をコードするDNA配列を発現させることができる。このような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40の早期および後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルスまたはサイトメガロウイルス前初期プロモーター、RSVプロモーター、lac系、trp系、TACまたはTRC系、発現がT7RNAポリメラーゼにより指示されるT7プロモーター、ファージラムダの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質に対する制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素に対するプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、例えば、Pho5、酵母-接合因子のプロモーター、バキキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、ならびに原核細胞もしくは真核細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが公知の他の配列、ならびにこれらの様々な組合せが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択および/または発現される所望のタンパク質の種類などの因子に依存し得ることが理解されるべきである。また、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、および抗生物質マーカーなどのベクターによってコードされる任意の他のタンパク質の発現も、考慮されるべきである。

10

20

【0142】

本開示に含まれる組換え核酸は、クローニングされた遺伝子またはその一部分を、原核細胞、真核細胞（酵母、鳥類、昆虫または哺乳動物）のいずれかまたはその両方における発現のために好適なベクターにライゲートすることによって、生成することができる。組換えポリペプチド（例えば、T R I I ポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）の生成のための発現ビヒクルとしては、プラスミドおよび他のベクターが挙げられる。例えば、好適なベクターとしては、以下の種類のプラスミド：E.coliなどの原核細胞における発現のための、pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミドおよびpUC由来プラスミドが挙げられる。

30

【0143】

一部の哺乳動物発現ベクターは、細菌中でのベクターの増殖を容易にするための原核生物配列、および真核細胞中で発現される1つまたは複数の真核生物転写ユニットの両方を含有する。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neoおよびpHygに由来するベクターは、真核細胞のトランスフェクションのための好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターの一部は、原核細胞および真核細胞の両方で複製および薬物耐性選択を容易にするために、pBR322などの細菌プラスミド由来の配列で改変される。あるいは、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、またはエプスタインバーウイルス(pHEBo、pREP由来およびp205)などのウイルスの誘導體を、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現のために使用することができる。他のウイルス(レトロウイルスを含む)発現系の例は、遺伝子治療の送達システムの説明において、下記に見出すことができる。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換において用いられる種々の方法は、当技術分野において周知である

40

50

。原核細胞および真核細胞の両方に対する他の好適な発現系、ならびに一般的な組換え手順については、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)を参照されたい。一部の例では、バキュロウイルス発現系の使用によって組換えポリペプチドを発現させることが望ましくあり得る。このようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター(pVL1392、pVL1393およびpVL941など)、pAcUW由来ベクター(pAcUW1など)、およびpBlueBac由来ベクター(-gal含有pBlueBacIIIなど)が挙げられる。
【0144】

10

ある特定の実施形態では、Pcmv-Scriptベクター(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDN4ベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)およびpCI-neoベクター(Promega, Madison, Wisc.)などのベクターは、CHO細胞における対象のポリペプチド(例えば、TRIIPポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド)の生成のために設計される。好ましい実施形態では、ベクターは、HEK-293細胞における対象のポリペプチドの生成のために設計される。明らかであるように、対象の遺伝子構築物を使用して、例えば、精製のために、融合タンパク質またはバリアントタンパク質を含むタンパク質を生成させるために、培養中に増殖された細胞における対象のポリペプチドの発現を引き起こすことができる。

20

【0145】

本開示は、対象のポリペプチド(例えば、TRIIPポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド)の1つまたは複数に対するコード配列(例えば、配列番号8、10、12、14、16、46または47)を含む組換え遺伝子でトランスフェクトされた宿主細胞にも関連する。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、本明細書に開示されるTRIIPポリペプチドは、E. coliなどの細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を使用する)、酵母または哺乳動物細胞において発現させてもよい。他の好適な宿主細胞が当業者に公知である。

【0146】

したがって、本開示は、対象のポリペプチド(例えば、TRIIPポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド)を生成するための方法にさらに関連する。例えば、ポリペプチドをコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞は、適切な条件下で培養して、ポリペプチドの発現を生じさせることができる。ポリペプチドを、分泌させ、細胞およびポリペプチドを含有する培地の混合物から単離することができる。あるいは、ポリペプチドは、細胞質または膜画分に維持されてもよく、細胞は、回収され、溶解され、タンパク質が単離される。細胞培養物は、宿主細胞および培地を含む。細胞培養のための好適な培地は、当技術分野において周知である。対象のポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、ポリペプチドの特定のエピトープに対して特異的な抗体を用いる免疫アフィニティー精製、ならびにポリペプチドに融合したドメインに結合する薬剤を用いるアフィニティー精製(例えば、プロテインAカラムがFc融合を精製するために使用され得る)を含む、タンパク質を精製するための、当技術分野において公知の技術を使用して、細胞培養培地、宿主細胞、またはその両方から単離することができる。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含有する融合タンパク質である。例としては、精製は、例えば、以下の3つまたはそれよりも多くを任意の順序で含む一連のカラムクロマトグラフィーによって達成することができる：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびカチオン交換クロマトグラフィー。精製は、ウイルス濾過および緩衝液交換を用いて終了することができる。

30

40

【0147】

50

別の実施形態では、組換えポリペプチド（例えば、T R I I ポリペプチドまたはベータグリカンポリペプチド）の所望の部分のN末端で、ポリ - (H i s) / エンテロキナーゼ切断部位配列などの精製リーダー配列についてコードする融合遺伝子は、Ni²⁺ 金属樹脂を使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、発現した融合タンパク質の精製を可能にし得る。次いで、精製リーダー配列は、その後、エンテロキナーゼによる処理によって除去されて、精製されたポリペプチドを提供することができる（例えば、H o c h u l i e t a l . , (1 9 8 7) J . C h r o m a t o g r a p h y 4 1 1 : 1 7 7 ; および J a n k n e c h t e t a l . , P N A S U S A 8 8 : 8 9 7 2 を参照されたい）。

【0148】

融合遺伝子を作成するための技術は周知である。本質的には、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の連結は、ライゲーションのための平滑末端または交互末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要によりコヒーシブ末端の充填、望ましくない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、ならびに酵素的ライゲーションを用いる、慣用の技術に従って行なわれる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む慣用の技術によって、合成することができる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、キメラ遺伝子配列を作製するためにその後アニーリングすることができる、2つの連続的な遺伝子断片の間の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、行なうことができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992を参照されたい）。

C. 抗体

【0149】

ある特定の態様では、本明細書に開示される方法および使用に従って使用されるTGFアンタゴニストは、抗体（TGFアンタゴニスト抗体）または抗体の組合せである。TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、例えば、1つもしくは複数のリガンド（例えば、TGF₁、TGF₂およびTGF₃）、T R I I 受容体、T R I I 関連I型受容体（例えば、A L K 5）および/またはT R I I 共受容体（例えば、ベータグリカン）を阻害し、および/またはこれらに結合し得る。一部の実施形態では、シグナル伝達（例えば、S m a dシグナル伝達）を阻害し、および/または標的に結合するTGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せについての能力は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む、in vitroアッセイまたは細胞に基づくアッセイにおいて決定される。本明細書に記載されるように、TGFアンタゴニスト抗体またはアンタゴニスト抗体の組合せは、単独で、あるいは異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の支持療法または活性薬剤と組み合わせて使用されてもよく、好ましくは、異所性骨化の1つもしくは複数の合併症の重症度または期間を予防または低減する。

【0150】

ある特定の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTGF₁を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTGF₁に結合する。本明細書で使用される場合、TGF₁抗体（抗TGF₁抗体）とは、一般に、抗体がTGF₁の標的化における診断剤および/または治療剤として有用であるように、十分な親和性でTGF₁に結合する能力がある抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗TGF₁抗体の無関係の非TGF₁タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）によって測定される、抗体のTGF₁への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または1%未満である。ある特定の実施形態では、抗TGF₁抗体は、異なる種由来のTGF₁の中で保存されたTGF₁のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗TGF₁抗体はヒトTGF₁に結合する。一部の実施形態では、TGF₁抗体は、TGF₁が、I型、II型および/または共受容体（例えば、T R I I、A L K 5および/またはベータグリカン）に

10

20

30

40

50

結合するのを阻害し得、したがって、TGF β 1シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害し得る。TGF β 1がTGF β 2およびTGF β 3といくらかの配列相同性を共有することに留意すべきである。したがって、一部の実施形態では、TGF β 1に結合する抗体は、TGF β 2および/またはTGF β 3にも結合し得る。一部の実施形態では、本開示は、TGF β 1に結合し、例えば、1つもしくは複数の追加のリガンド（例えば、TGF β 2、TGF β 3、またはTGF β 2およびTGF β 3）、1つもしくは複数のI型および/またはII型受容体（例えば、TRIIおよびALK5）、ならびに/あるいは1つもしくは複数の共受容体（例えば、ベータグリカン）にさらに結合する、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）およびその使用に関する。一部の実施形態では、TGF β 1に結合する多重特異性抗体は、TGF β 3にさらに結合するが、TGF β 2に結合しないか、または実質的に結合しない（例えば、 1×10^{-7} Mを超える K_D でTGF β 2に結合するか、または、例えば、約 1×10^{-8} Mまたは約 1×10^{-9} Mの比較的中程度の結合を有する）。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せおよびその使用であって、抗体の組合せが、TGF β 1抗体、ならびに例えば、1つもしくは複数の追加のTRIIリガンド（例えば、TGF β 2、TGF β 3、またはTGF β 2およびTGF β 3）、1つもしくは複数のI型および/またはII型受容体（例えば、TRIIおよびALK5）、ならびに/あるいは1つもしくは複数の共受容体（例えば、ベータグリカン）に結合する1つまたは複数の追加の抗体を含む、抗体の組合せおよびその使用に関する。一部の実施形態では、TGF β 1抗体を含む抗体の組合せは、TGF β 3抗体をさらに含むが、TGF β 2抗体を含まない。

10

20

【0151】

ある特定の実施形態では、TGF β アンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTGF β 2を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、TGF β TRIIアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTGF β 2に結合する。本明細書で使用される場合、TGF β 2抗体（抗TGF β 2抗体）とは、一般に、抗体がTGF β 2の標的化における診断剤および/または治療剤として有用であるように、十分な親和性でTGF β 2に結合する能力がある抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗TGF β 2抗体の無関係の非TGF β 2タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定される、抗体のTGF β 2への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または1%未満である。ある特定の実施形態では、抗TGF β 2抗体は、異なる種由来のTGF β 2の中で保存されたTGF β 2のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗TGF β 2抗体はヒトTGF β 2に結合する。一部の実施形態では、TGF β 2抗体は、TGF β 2が、I型、II型および/または共受容体（例えば、TRII、ALK5および/またはベータグリカン）に結合するのを阻害し得、したがって、TGF β 2シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害し得る。TGF β 2がTGF β 1およびTGF β 3といくらかの配列相同性を共有することに留意すべきである。したがって、一部の実施形態では、TGF β 2に結合する抗体は、TGF β 1および/またはTGF β 3にも結合し得る。一部の実施形態では、本開示は、TGF β 2に結合し、例えば、1つもしくは複数の追加のリガンド（例えば、TGF β 1、TGF β 3、またはTGF β 1およびTGF β 3）、1つもしくは複数のI型および/またはII型受容体（例えば、TRIIおよびALK5）、ならびに/あるいは1つもしくは複数の共受容体（例えば、ベータグリカン）にさらに結合する、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）およびその使用に関する。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せおよびその使用であって、抗体の組合せが、TGF β 2抗体、ならびに例えば、1つもしくは複数の追加のリガンド（例えば、TGF β 1、TGF β 3、またはTGF β 1およびTGF β 3）、1つもしくは複数のI型および/またはII型受容体（例えば、TRIIおよびALK5）、ならびに/あるいは1つもしくは複数の共受容体（例えば、ベータグリカン）に結合する1つまたは複数の追加の抗体を含む、抗体の組合せおよびその使用に関する。

30

40

【0152】

50

ある特定の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTGF3を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTGF3に結合する。本明細書で使用される場合、TGF3抗体(抗TGF3抗体)は、一般に、抗体がTGF3の標的化における診断剤および/または治療剤として有用であるように、十分な親和性でTGF3に結合する能力がある抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗TGF3抗体の無関係の非TGF3タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される、抗体のTGF3への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または1%未満である。ある特定の実施形態では、抗TGF3抗体は、異なる種由来のTGF3の中で保存されたTGF3のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗TGF3抗体はヒトTGF3に結合する。一部の実施形態では、TGF3抗体は、TGF3が、I型、II型および/または共受容体(例えば、TRII、ALK5および/またはベータグリカン)に結合するのを阻害し得、したがって、TGF3シグナル伝達(例えば、Smadシグナル伝達)を阻害し得る。TGF3がTGF2およびTGF1といくらかの配列相同性を共有することに留意すべきである。したがって、一部の実施形態では、TGF3に結合する抗体は、TGF2および/またはTGF1にも結合し得る。一部の実施形態では、本開示は、TGF3に結合し、例えば、1つもしくは複数の追加のTRIIリガンド(例えば、TGF2、TGF1、またはTGF2およびTGF1)、1つもしくは複数のI型および/またはII型受容体(例えば、TRIIおよびALK5)、ならびに/あるいは1つもしくは複数の共受容体(例えば、ベータグリカン)にさらに結合する、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)およびその使用に関する。一部の実施形態では、TGF3に結合する多重特異性抗体は、TGF2に結合しないか、または実質的に結合しない(例えば、 1×10^{-7} Mを超える K_D でTGF2に結合するか、または、例えば、約 1×10^{-8} Mまたは約 1×10^{-9} Mの比較的中程度の結合を有する)。一部の実施形態では、TGF3に結合する多重特異性抗体は、TGF1にさらに結合するが、TGF2に結合しないか、または実質的に結合しない(例えば、 1×10^{-7} Mを超える K_D でTGF2に結合するか、または、例えば、約 1×10^{-8} Mまたは約 1×10^{-9} Mの比較的中程度の結合を有する)。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せおよびその使用であって、抗体の組合せが、TGF3抗体、ならびに例えば、1つもしくは複数の追加のリガンド(例えば、TGF2、TGF1、またはTGF2およびTGF1)、1つもしくは複数のI型および/またはII型受容体(例えば、TRIIおよびALK5)、ならびに/あるいは1つもしくは複数の共受容体(例えば、ベータグリカン)に結合する1つまたは複数の追加の抗体を含む、抗体の組合せおよびその使用に関する。一部の実施形態では、TGF3抗体を含む抗体の組合せは、TGF1抗体をさらに含むが、TGF2抗体を含まない。

【0153】

一部の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体は、3つのTGFアイソフォームのすべて、すなわち、TGF1、TGF2およびTGF3に結合する。一部の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体はフレソリムマブである。

【0154】

ある特定の態様では、TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTRIIを阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、TGFアンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともTRIIに結合する。本明細書で使用される場合、TRII抗体(抗TRII抗体)とは、一般に、抗体がTRIIの標的化における診断剤および/または治療剤として有用であるように、十分な親和性でTRIIに結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗TRII抗体の無関係の非TRIIタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、Biacore、または他のタンパク質-タンパク質相互作用アッセイもしくは結合親和性アッセイによって測定される、抗体のTRIIへの結合の約10%、9%、8%、7%、

10

20

30

40

50

6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗T R I I抗体は、異なる種由来のT R I Iの中で保存されたT R I Iのエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗T R I I抗体はヒトT R I Iに結合する。一部の実施形態では、抗T R I I抗体は、1つまたは複数のリガンド[例えば、T G F 1 ; T G F 2 ; T G F 3 ; T G F 1およびT G F 3 ; T G F 1およびT G F 2 ; T G F 2およびT G F 3 ; またはT G F 1、T G F 2およびT G F 3]がT R I Iに結合するのを阻害し得る。一部の実施形態では、抗T R I I抗体は、T R I I、ならびに1つもしくは複数のリガンド[例えば、T G F 1、T G F 2およびT G F 3]、I型受容体(例えば、A L K 5)および/または共受容体(例えば、ベータグリカン)に結合する、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せおよびその使用であって、抗体の組合せが、抗T R I I抗体、ならびに例えば、1つもしくは複数のリガンド[例えば、T G F 1、T G F 2およびT G F 3]、I型受容体(例えば、A L K 5)、および/または共受容体(例えば、ベータグリカン)に結合する1つまたは複数の追加の抗体を含む、抗体の組合せおよびその使用に関する。

10

【0155】

ある特定の態様では、T G F アンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともA L K 5を阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、T G F アンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともA L K 5に結合する。本明細書で使用される場合、A L K 5抗体(抗A L K 5抗体)とは、一般に、抗体がA L K 5の標的化における診断剤および/または治療剤として有用であるように、十分な親和性でA L K 5に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗A L K 5抗体の無関係の非A L K 5タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(R I A)、B i a c o r e、または他のタンパク質-タンパク質相互作用アッセイもしくは結合親和性アッセイによって測定される、抗体のA L K 5への結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗A L K 5抗体は、異なる種由来のA L K 5の中で保存されたA L K 5のエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗A L K 5抗体はヒトA L K 5に結合する。一部の実施形態では、抗A L K 5抗体は、1つまたは複数のリガンド[例えば、T G F 1 ; T G F 2 ; T G F 3 ; T G F 1およびT G F 3 ; T G F 1およびT G F 2 ; T G F 2およびT G F 3 ; またはT G F 1、T G F 2およびT G F 3]がA L K 5に結合するのを阻害し得る。一部の実施形態では、抗A L K 5抗体は、A L K 5、ならびに1つもしくは複数のリガンド[例えば、T G F 1、T G F 2およびT G F 3]、I I型受容体(例えば、T R I I)および/または共受容体(例えば、ベータグリカン)に結合する、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せおよびその使用であって、抗体の組合せが、抗A L K 5抗体、ならびに例えば、1つもしくは複数のリガンド[例えば、T G F 1、T G F 2およびT G F 3]、I I型受容体(例えば、T R I I)、および/または共受容体(例えば、ベータグリカン)に結合する1つまたは複数の追加の抗体を含む、抗体の組合せおよびその使用に関する。

20

30

40

【0156】

ある特定の態様では、T G F アンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともベータグリカン阻害する抗体である。したがって、一部の実施形態では、T G F アンタゴニスト抗体または抗体の組合せは、少なくともベータグリカンに結合する。本明細書で使用される場合、ベータグリカン抗体(抗ベータグリカン抗体)とは、一般に、抗体がベータグリカンの標的化における診断剤および/または治療剤として有用であるように、十分な親和性でベータグリカンに結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗ベータグリカン抗体の無関係の非ベータグリカタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(R I A)、B i a c o r e、または他のタンパク質-タンパク質相互作用アッセイもしくは結合親和性アッセイによって測定される、抗体のベータグリカンへ

50

の結合の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満、または約1%未満である。ある特定の実施形態では、抗ペータグリカン抗体は、異なる種由来のペータグリカンの中で保存されたペータグリカンのエピトープに結合する。ある特定の好ましい実施形態では、抗ペータグリカン抗体はヒトペータグリカンに結合する。一部の実施形態では、抗ペータグリカン抗体は、1つまたは複数のリガンド [例えば、TGF 1; TGF 2; TGF 3; TGF 1およびTGF 3; TGF 1およびTGF 2; TGF 2およびTGF 3; またはTGF 1、TGF 2およびTGF 3] がペータグリカンに結合するのを阻害し得る。一部の実施形態では、抗ペータグリカン抗体は、ペータグリカン、ならびに1つもしくは複数のリガンド [例えば、TGF 1、TGF 2およびTGF 3]、I型受容体 (例えば、ALK5) および/またはII型受容体 (例えば、TRII) に結合する、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体) である。一部の実施形態では、本開示は、抗体の組合せおよびその使用であって、抗体の組合せが、抗ペータグリカン抗体、ならびに例えば、1つもしくは複数のリガンド [例えば、TGF 1、TGF 2およびTGF 3]、I型受容体 (例えば、ALK5)、および/またはII型受容体 (例えば、TRII) に結合する1つまたは複数の追加の抗体を含む、抗体の組合せおよびその使用に関する。

【0157】

抗体という用語は、最も広い意味で本明細書で使用され、限定されるものではないが、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、および抗体断片を含む、様々な抗体構造を包含する。抗体断片とは、無傷抗体が結合する抗原に結合する無傷抗体の一部を含む、無傷抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ ダイアボディ; 直鎖抗体; 一本鎖抗体分子 (例えば、scFv); および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。例えば、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); 国際公開第93/16185号; ならびに米国特許第5,571,894号、米国特許第5,587,458号および米国特許第5,869,046号を参照されたい。本明細書に開示される抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。特定の実施形態では、本開示の抗体は、それらに付着され、検出されることが可能な標識 (例えば、標識は、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素または酵素補因子であり得る) を含む。好ましい実施形態では、本開示の抗体は、単離された抗体である。ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る、2つの抗原結合性部位を有する抗体断片である。例えば、EP404,097; 国際公開第1993/01161号; Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134 (2003); およびHollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディも、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134に記載されている。シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分を含む抗体断片である。ある特定の実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である。例えば、米国特許第6,248,516号を参照されたい。抗体断片は、限定されるものではないが、無傷抗体のタンパク質消化、および本明細書に記載の組換え宿主細胞 (例えば、E. coli またはファージ) による生成を含む様々な技術によって作成することができる。

【0158】

本明細書における抗体は、任意のクラスの抗体であり得る。抗体のクラスとは、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。5つの主要な抗体のク

10

20

30

40

50

ラス：Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mがあり、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、Ig G₄、Ig A₁およびIg A₂にさらに分けられ得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューとよばれる。

【0159】

一般に、本明細書に開示される方法における使用のための抗体は、好ましくは、高い結合親和性で、その標的抗原に特異的に結合する。親和性は、K_D値として表わされてもよく、固有の結合親和性（例えば、最小アビディティ効果を有する）を反映する。典型的には、結合親和性は、無細胞の状況または細胞に関連する状況に関わらず、*in vitro*で測定される。本明細書に開示されるアッセイを含む、当技術分野において公知のいくつかのアッセイのいずれかを使用して、結合親和性測定値を得ることができ、例えば、表面プラズモン共鳴（Biacore（商標）アッセイ）、放射性標識抗原結合性アッセイ（RIA）およびELISAが挙げられる。一部の実施形態では、本開示の抗体は、少なくとも、 1×10^{-7} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-8} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-9} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-10} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-11} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-12} もしくはそれよりも強い、 1×10^{-13} もしくはそれよりも強い、または 1×10^{-14} もしくはそれよりも強いK_Dで、それらの標的抗原（例えば、TGF₁、TGF₂、ALK5、ベータグリカンおよびTRII）に結合する。

【0160】

ある特定の実施形態では、K_Dは、以下のアッセイによって記載されるようにして、目的の抗体のFabバージョンおよびその標的抗原を用いて行なわれるRIAによって、測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、未標識抗原の滴定系列の存在中、最低濃度の放射性標識抗原（例えば、¹²⁵I標識）でFabを平衡化すること、次いで、抗Fab抗体コーティングプレートを用いて結合した抗原を捕捉することによって、測定される[例えば、Chen et al. (1999) J. Mol. Biol. 293: 865 - 881を参照されたい]。アッセイのための条件を確立するために、マルチウェルプレート（例えば、MICROTITER（登録商標）、Thermo Scientific製）を、捕捉性抗Fab抗体（例えば、Cappel Labs製）でコーティングし（例えば、終夜）、その後、好ましくは、室温（およそ23℃）でウシ血清アルブミンを用いてブロッキングする。非吸着プレートにおいて、放射性標識抗原を、目的のFabの連続希釈により混合する[例えば、Presta et al., (1997) Cancer Res. 57: 4593 - 4599における、抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する]。次いで、目的のFabを、好ましくは、終夜インキュベーションして、しかし、インキュベーションは、平衡に達することを確実にするために、より長い時間（例えば、約65時間）継続してもよい。その後、混合物を、好ましくは、室温で約1時間、インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。次いで、溶液を除去し、プレートを、好ましくは、ポリソルベート20およびPBSの混合物で数回洗浄する。プレートが乾燥したら、シンチレーション剤（例えば、MICROSCINT（登録商標）、Packard製）を添加し、プレートを、ガンマカウンター（例えば、TOPCOUNT（登録商標）、Packard製）でカウントする。

【0161】

別の実施形態によれば、K_Dは、例えば、BIACORE（登録商標）2000またはBIACORE（登録商標）3000（Biacore, Inc., Piscataway, N. J.）を、約10応答単位（RU）で固定化抗原CM5チップとともに使用して、表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランのバイオセンサーチップ（CM5、Biacore, Inc.）を、供給業者の使用説明書に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。例えば、抗原を、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8で、5 μg/mL（約0.2 μM

10

20

30

40

50

に希釈した後、 $5 \mu\text{l}$ /分の流速で注入して、カップリングしたタンパク質のおよそ10応答単位(RU)を達成することができる。抗原の注入後、1Mのエタノールアミンを、未反応基をブロックするために注入する。動態測定のために、Fabの2倍連続希釈($0.78 \text{ nM} \sim 500 \text{ nM}$)を、0.05%のポリソルベート20(TWEEN(登録商標)-20)界面活性剤(PBST)を有するPBS中に、およそ $25 \mu\text{l}$ /分の流速で注入する。会合速度(k_{on})および解離速度(k_{off})は、例えば、単純な一対一ラングミュア結合モデル(BIACORE(登録商標) Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を使用して、会合および解離センサーグラムを同時にフィッティングすることによって、計算する。平衡解離定数(K_D)を、比 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ として計算する[例えば、Chen et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881を参照されたい]。会合速度(on-rate)、例えば、上記の表面プラズモン共鳴アッセイにより $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ を超える場合、次いで、会合速度(on-rate)は、ストップフローを備える分光光度計(Aviv Instruments)または8000シリーズSLM-AMINCO(登録商標)分光光度計(ThermoSpectronic)などの分光計で、攪拌キュベットを用いて測定される場合に、増加させた濃度の抗原の存在中で、PBS中の 20 nM の抗抗原抗体(Fab型)の蛍光発光強度(例えば、励起 = 295 nm ; 発光 = 340 nm 、 16 nm バンドパス)の増加または減少を測定する、蛍光消光技術を使用して決定することができる。

10

【0162】

TRII、ALK5、ベータグリカン、TGF β 1、TGF β 2およびTGF β 3の核酸ならびにアミノ酸配列、特にヒト配列は、当技術分野において周知であり、したがって、本開示による使用のための抗体アンタゴニストは、当技術分野における知識および本明細書に提供される教示に基づいて、当業者によって日常的に作成され得る。

20

【0163】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体とは、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来するが、重鎖および/または軽鎖の残りの部分が異なる供給源または種に由来する抗体を指す。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号;およびMorrisson et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855に記載されている。一部の実施形態では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域)およびヒト定常領域を含む。一部の実施形態では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された、「クラススイッチ」抗体である。一般に、キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

30

【0164】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるキメラ抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体とは、非ヒト超可変領域(HVR)由来のアミノ酸残基、およびヒトフレームワーク領域(FR)由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、HVRのすべてまたは実質的にすべて(例えば、CDR)が非ヒト抗体のものに対応し、FRのすべてまたは実質的にすべてがヒト抗体のものに対応する、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインのすべてを実質的に含む。ヒト化抗体は、必要に応じて、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」とは、ヒト化を受けた抗体を指す。

40

【0165】

ヒト化抗体およびこれらを作成する方法は、例えば、Almagro and Franesson (2008) Front. Biosci. 13: 1619-1633に概説されており、さらに、例えば、Riechmann et al., (1988) Nature 332: 323-329; Queen et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; 米国特許第5,821,337号、米国特許第7,527,791号、米国特許第6,982,

50

321号および米国特許第7,087,409号; Kashmiri et al., (2005) Methods 36:25-34 [SDR(a-CDR)グラフト化を記載している]; Padlan, Mol. Immunol. (1991) 28:489-498 (「再表面化」を記載している); Dall'Acqua et al. (2005) Methods 36:43-60 (「FRシャッフリング」を記載している); Osbourn et al. (2005) Methods 36:61-68; ならびに Klimka et al. Br. J. Cancer (2000) 83:252-260 (FRシャッフリングへの「ガイド付き選択」アプローチを記載している)に記載されている。

【0166】

ヒト化のために使用され得るヒトフレームワーク領域としては、限定されるものではないが、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域 [例えば、Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296を参照されたい]; 軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体の定常配列に由来するフレームワーク領域 [例えば、Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; および Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623を参照されたい]; ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系列フレームワーク領域 [例えば、Almagro and Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633を参照されたい]: およびFRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域 [例えば、Baca et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684; および Rosok et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618を参照されたい]が挙げられる。

【0167】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を使用して生成することができる。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 および Lonberg (2008) Curr. Opin. Immunol. 20:450-459に記載されている。

【0168】

ヒト抗体は、免疫原(例えば、TRII、ALK5、ベータグリカン、TGF 1、TGF 2またはTGF 3ポリペプチド)を、抗原負荷に応答して、無傷ヒト抗体またはヒト可変領域を有する無傷抗体を生成するように改変されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製され得る。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するか、もしくは動物の染色体にランダムに統合される、ヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部分を含有する。このようなトランスジェニック動物において、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説として、例えば、Lonberg (2005) Nat. Biotechnol. 23:1117-1125; 米国特許第6,075,181号および同第6,150,584号(XENOMOUSE(商標)技術を記載している); 米国特許第5,770,429号(HuMab(登録商標)技術を記載している); 米国特許第7,041,870号(K-MOUSE(登録商標)技術を記載している); ならびに米国特許出願公開第2007/0061900号(VelociMouse(登録商標)技術を記載している)を参照されたい。このような動物によって作製される無傷抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに改変され得る。

【0169】

本明細書に提供されるヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によって作成すること

10

20

30

40

50

もできる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒトミエローマおよびマウス - ヒトヘテロミエローマ細胞系が記載されている [例えば、Kozbor J. Immunol., (1984) 133: 3001; Brodeur et al. (1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; および Boerner et al. (1991) J. Immunol., 147: 86 を参照されたい]。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により作製されるヒト抗体はまた、Li et al., (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 に記載されている。追加の方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞系からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している)およびNi, Xiandai Mianyixue (2006) 26(4): 265-268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されるものが挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)もまた、Vollmers and Brandlein (2005) Histol. Histopathol., 20(3): 927-937 (2005) および Vollmers and Brandlein (2005) Methods Find Exp. Clin. Pharmacol., 27(3): 185-91 に記載されている。

【0170】

本明細書に提供されるヒト抗体はまた、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって作製してもよい。このような可変ドメイン配列は、次いで、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられ得る。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術は、本明細書に記載される。

【0171】

例えば、本開示の抗体は、所望の活性(1つまたは複数)を有する抗体について、コンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって、単離され得る。ファージディスプレイライブラリーを作製するため、および所望の結合特性を保有する抗体についてそのようなライブラリーをスクリーニングするための、種々の方法が当技術分野において公知である。このような方法は、例えば、Hoogenboom et al. (2001) in Methods in Molecular Biology 178: 1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J.において概説されており、例えば、McCafferty et al. (1991) Nature 348: 552-554; Clackson et al., (1991) Nature 352: 624-628; Marks et al. (1992) J. Mol. Biol. 222: 581-597; Marks and Bradbury (2003) in Methods in Molecular Biology 248: 161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu et al. (2004) J. Mol. Biol. 338(2): 299-310; Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093; Fellouse (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472; および Lee et al. (2004) J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 にさらに記載されている。

【0172】

ある特定のファージディスプレイ法では、VHおよびVL遺伝子のレポーターを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別にクローニングし、ファージライブラリーにランダムに組換えし、次いで、これをWinter et al. (1994) Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455に記載されているようにして、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、典型的には、一本鎖Fv(scFv)断片として、またはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提

示する。免疫された供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する要件なしで、免疫原（例えば、T R I I、T G F 1、T G F 2またはT G F 3ポリペプチド）に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al. (1993) EMBO J, 12: 725-734に記載されるようにして、ナイーブライブラリーを、クローニングして（例えば、ヒトから）、任意の免疫化なしで、広範囲の非自己抗原に対し、自己抗原にも対する抗体の単一供給源を提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381-388に記載されるようにして、幹細胞由来の再構成されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して、高度可変CDR3領域をコードし、in vitroでの再構成を達成することによって、ナイーブライブラリーを合成的に作成することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許刊行物としては、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許出願公開第2005/0079574号、米国特許出願公開第2005/0119455号、米国特許出願公開第2005/0266000号、米国特許出願公開第2007/0117126号、米国特許出願公開第2007/0160598号、米国特許出願公開第2007/0237764号、米国特許出願公開第2007/0292936号および米国特許出願公開第2009/0002360号が挙げられる。

【0173】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体（典型的には、モノクローナル抗体）は、1つまたは複数（例えば、2、3、4、5、6またはそれよりも多い）抗原に対する、少なくとも2つの異なるエピトープ（例えば、2、3、4、5もしくは6またはそれよりも多い）に対する結合特異性を有する。

【0174】

「オクトパス抗体」を含む、3つまたはそれよりも多くの機能的抗原結合部位を有する遺伝子操作された抗体も本明細書に含まれる（例えば、米国特許出願公開第2006/0025576号を参照されたい）。

【0175】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体とは、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、この集団を構成する個々の抗体が、同一であるか、および/または同じエピトープに結合することを指すが、例えば、天然に存在する突然変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の生成の間に生じる、可能性があるバリエーション抗体は除き、このようなバリエーションは、一般に、少量で存在する。典型的には異なるエピトープに対して作られる異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに対して作られる。そのため、「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本方法に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む種々の技術によって作成され得、このような方法およびモノクローナル抗体を作成するための他の例示的な方法は本明細書に記載される。

【0176】

例えば、T R I Iに由来する免疫原を使用することによって、抗タンパク質/抗ペプチド抗血清またはモノクローナル抗体は、標準的なプロトコールによって作成することができる[例えば、Antibodies: A Laboratory Manual (1988) ed. by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい]。マウス、ハムスターまたはウサギなどの哺乳動物を、T R I Iポリペプチドの免疫原性形態、抗体応答を誘発する能力がある抗原

10

20

30

40

50

性断片、または融合タンパク質で免疫することができる。タンパク質またはペプチドに対して免疫原性を付与するための技術としては、担体へのコンジュゲーション、または当技術分野において周知の他の技術が挙げられる。T R I Iポリペプチドの免疫原性部分は、アジュバントの存在中で投与することができる。免疫化の進行は、血漿または血清中の抗体価の検出によって、監視することができる。標準的なE L I S Aまたは他のイムノアッセイを、抗体産生のレベルおよび/または結合親和性のレベルを評価するための抗原としての免疫原とともに使用することができる。

【0177】

T R I Iの抗原性調製物による動物の免疫後、抗血清を得ることができ、所望により、ポリクローナル抗体を、血清から単離することができる。モノクローナル抗体を生成するために、抗体産生細胞（リンパ球）を、免疫された動物から回収し、標準的な体細胞融合手順によって、ミエローマ細胞などの不死化細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は、当技術分野において周知であり、例えば、ハイブリドーマ技術[例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495 - 497を参照されたい]、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術[例えば、Kozbar et al. (1983) Immunology Today, 4: 72を参照されたい]、およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBVハイブリドーマ技術[Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77 - 96]が挙げられる。ハイブリドーマ細胞は、T R I Iポリペプチドと特異的反応性の抗体の産生のために、免疫化学的にスクリーニングすることができ、モノクローナル抗体を、このようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離することができる。

【0178】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸改変を、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入し、それによってFc領域バリエーションを作製し得る。Fc領域バリエーションは、1つまたは複数のアミノ酸位置にアミノ酸改変（例えば、置換、欠失および/または付加）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域）を含んでいてもよい。

【0179】

例えば、本開示は、*in vivo*での抗体の半減期が重要である適用に対する望ましい候補にする、一部の、しかしすべてではないエフェクター機能を持つ抗体バリエーションを企図し、それにもかかわらず、ある特定のエフェクター機能[例えば、補体依存性細胞傷害(CDC)および抗体依存性細胞傷害(ADCC)]は不必要または有害である。*in vitro*および/または*in vivo*細胞傷害アッセイを実施して、CDCおよび/またはADCC活性の低減/欠乏を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施して、抗体がFcR結合性を欠くが(そのため、ADCC活性を欠く可能性がある)、FcRn結合能を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、例えば、Ravetch and Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 492に概説されている。目的の分子のADCC活性を評価するための*in vitro*アッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号; Hellstrom, I. et al. (1986) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059 - 7063; Hellstrom, I. et al. (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499 - 1502; 米国特許第5,821,337号; および Bruggemann, M. et al. (1987) J. Exp. Med. 166: 1351 - 1361に記載されている。あるいは、非放射活性アッセイ法を用いてもよい(例えば、ACTI(商標)、フローサイトメトリー用の非放射活性細胞傷害アッセイ;

10

20

30

40

50

Cell Technology, Inc., Mountain View, Calif.; および Cytotox 96 (登録商標)、非放射活性細胞傷害性アッセイ、Promega, Madison, Wis.)。このようなアッセイのために有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が挙げられる。あるいは、または加えて、目的の分子の ADCC 活性は、*in vivo* で、例えば、Clynes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652 - 656 に開示されているものなどの動物モデルで評価してもよい。C1q 結合アッセイもまた、抗体が C1q に結合することができず、そのため、CDC 活性を欠くことを確認するために行ってもよい [例えば、国際公開第 2006/029879 号および国際公開第 2005/100402 号における C1q および C3c 結合 ELISA を参照されたい]。補体活性化を評価するために、CDC アッセイを行なってもよい [例えば、Gazzano-Santoro et al. (1996) J. Immunol. Methods 202: 163; Cragg, M. S. et al. (2003) Blood 101: 1045 - 1052; および Cragg, M. S., and M. J. Glennie (2004) Blood 103: 2738 - 2743 を参照されたい]。FcRn 結合および *in vivo* のクリアランス / 半減期の決定は、当技術分野において公知の方法を使用して行うこともできる [例えば、Petkova, S. B. et al. (2006) Int. Immunol. 18 (12): 1759 - 1769 を参照されたい]。

【0180】

低減したエフェクター機能を有する本開示の抗体としては、Fc 領域残基 238、265、269、270、297、327 および 329 の 1 つまたは複数の置換を有する抗体が挙げられる (米国特許第 6,737,056 号)。このような Fc 突然変異体としては、アミノ酸位置 265、269、270、297 および 327 の 2 つまたはそれよりも多くに置換を有する Fc 突然変異体が挙げられ、残基 265 および 297 のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc 突然変異体を含む (米国特許第 7,332,581 号)。

【0181】

ある特定の実施形態では、システインが遺伝子操作された抗体を作出することが望ましいことがあり、例えば、「thioMAb」は、抗体の 1 つまたは複数の残基がシステイン残基と置換されている。特定の実施形態では、置換された残基は、抗体のアクセス可能部位に存在する。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、抗体を、薬物部分またはリンカー - 薬物部分などの他の部分とコンジュゲートするために使用して、本明細書においてさらに記載されるようにして、免疫コンジュゲートを作成し得る。ある特定の実施形態では、以下の残基のいずれか 1 つまたは複数が、システインで置換されていてもよい：軽鎖の V205 (Kabat 番号付け)；重鎖の A118 (EU 番号付け)；および重鎖 Fc 領域の S400 (EU 番号付け)。システインが遺伝子操作された抗体は、例えば、米国特許第 7,521,541 号に記載されるようにして、作製してもよい。

【0182】

加えて、望ましい抗体を特定するために、抗体をスクリーニングするために使用される技術は、得られる抗体の特性に影響を与えることがある。例えば、抗体が溶液中で抗原を結合するために使用される場合、溶液の結合を試験することが望ましくあり得る。様々な異なる技術を、特定の望ましい抗体を特定するために、抗体および抗原の間の相互作用を試験するために利用可能である。様々な技術としては、ELISA、表面プラズモン共鳴結合アッセイ (例えば、Biacore (商標) 結合アッセイ、Biacore AB、Uppsala, Sweden)、サンドイッチアッセイ (例えば、IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland の常磁性ビーズシステム)、ウエスタンブロット、免疫沈降アッセイおよび免疫組織化学的検査が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0183】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体および/または結合ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションが企図される。例えば、抗体および/もしくは結合ポリペプチドの結合親和性ならびに/または他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。抗体および/または結合ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションは、抗体および/または結合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することによって、あるいはペプチド合成によって、調製され得る。このような改変としては、例えば、抗体および/もしくは結合ポリペプチドのアミノ酸配列からの欠失、ならびに/またはこのアミノ酸配列への挿入、ならびに/またはこのアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。欠失、挿入および置換の任意の組合せは、最終構築物が所望の特性、例えば、標的との結合 (T R I I、A L K 5、ペータグリカン、T G F 1、T G F 2 および/または T G F 3) を持つならば、最終構築物に達するために行うことができる。

10

【0184】

変更 (例えば、置換) は、例えば、抗体親和性を改善するために、HVR において行なってもよい。このような変更は、HVR 「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基において (例えば、Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008) を参照されたい)、および/または SDR (a-CDR) において行なうことができ、得られるバリエーション VH または VL は、結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築し、二次ライブラリーから再選択することによる親和性成熟は、当技術分野において記載されている [例えば、Hoogenboom et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001) を参照されたい]。親和性成熟の一部の実施形態では、多様性は、任意の種々の方法によって、成熟のために選択された可変遺伝子に導入される (例えば、エラープローン PCR、鎖シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド定方向突然変異誘発)。次いで、二次ライブラリーが作出される。次いで、ライブラリーを、所望の親和性を有する任意の抗体バリエーションを特定するためにスクリーニングする。多様性を導入するための別の方法は、いくつかの HVR 残基 (例えば、一度に 4 ~ 6 残基) がランダム化される、HVR 定方向アプローチを含む。抗原結合性に関与する HVR 残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発またはモデリングを使用して、具体的に特定され得る。特に、CDR-H3 および CDR-L3 が、多くの場合、標的にされる。

20

30

【0185】

ある特定の実施形態では、置換、挿入または欠失は、このような変更が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減させない限り、1つまたは複数の HVR 内で生じさせ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減させない保存的変更 (例えば、本明細書に提供されるような保存的置換) を、HVR において行なってもよい。このような変更は、HVR 「ホットスポット」または SDR の外側であり得る。上記において提供されるバリエーション VH および VL 配列のある特定の実施形態では、それぞれの HVR は、変更されていないか、または 1、2 もしくは 3 以下のアミノ酸置換を含むかのいずれかである。

40

【0186】

突然変異誘発のために標的にされ得る抗体および/または結合ポリペプチドの残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085 に記載されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基 (例えば、arg、asp、his、lys および glu などの荷電残基) の残基または基が特定され、中性または負に荷電したアミノ酸 (例えば、アラニンまたはポリアラニン) によって置き換えられて、抗体または結合ポリペプチドと抗原の相互作用が影響を受けるか否かを決定する。さらなる置換を、最初の置換に対する機能的感受性を実証するアミノ酸位置に導入してもよい。あるいは、または加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体およ

50

び抗原の間の接触点を特定することができる。このような接触残基および隣接する残基は、置換の候補として標的にされてもよく、または除外されてもよい。バリエーションは、それらが所望の特性を含有するか否かを決定するためにスクリーニングされ得る。

【0187】

アミノ酸配列の挿入は、1残基から100またはそれよりも多くの残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列間挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入バリエーションとしては、酵素（例えば、ADEPTについて）もしくは抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドとの抗体のN末端またはC末端の融合が挙げられる。

10

【0188】

ある特定の形態では、本明細書に提供される抗体および/または結合ポリペプチドは、当技術分野において公知であって、容易に入手可能である、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに改変されていてもよい。抗体および/または結合ポリペプチドの誘導体化のために好適な部分としては、限定されるものではないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、およびデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレン（propylene）グリコールホモポリマー、プロピロピレン（polypropylene）オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造中の利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってもよく、分岐または非分岐であっててもよい。抗体および/または結合ポリペプチドに付着するポリマーの数は変更されてもよく、2以上のポリマーが付着する場合、それらは、同じまたは異なる分子であり得る。一般に、誘導体化のために使用されるポリマーの数のおよび/または種類は、限定されるものではないが、抗体誘導体および/または結合ポリペプチド誘導体が規定された条件下での治療において使用されるかに関わらず、改善される抗体および/もしくは結合ポリペプチドの特定の特性または機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

20

30

D. 低分子

【0189】

ある特定の態様では、本明細書に開示される方法および使用に従って使用されるTGFアンタゴニストは、低分子（TGFアンタゴニスト低分子）または低分子の組合せである。TGFアンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、例えば、1つもしくは複数のリガンド（例えば、TGF₁、TGF₂およびTGF₃）、T_{RII}受容体、T_{RII}関連I型受容体（例えば、ALK5）、T_{RII}関連共受容体（例えば、ベータグリカン）および/または下流のシグナル伝達成分（例えば、Smad）を阻害し得る。一部の形態では、シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害するTGFアンタゴニスト低分子または低分子の組合せについての能力は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む、細胞に基づくアッセイにおいて決定される。TGFアンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、単独で、あるいは異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の支持療法または活性薬剤と組み合わせて使用されてもよく、好ましくは、異所性骨化の1つもしくは複数の合併症の重症度または期間を予防または低減する。

40

【0190】

ある特定の態様では、TGFアンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、少なく

50

とも TGF- β 1 を阻害する（例えば、Smad シグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、TGF- β 1 の低分子阻害剤は、TGF- β 1 に結合する。一部の実施形態では、TGF- β 1 の低分子阻害剤は、TGF- β 1 の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、TGF- β 1 の低分子阻害剤は、TGF- β 2、TGF- β 3、TIRI、ALK5 およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害する。一部の実施形態では、TGF- β 1 の低分子阻害剤は、TGF- β 2 を阻害しないか、または TGF- β 2 を実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF- β 1 の低分子阻害剤は、TGF- β 3 をさらに阻害するが、TGF- β 2 を阻害しないか、または TGF- β 2 を実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、少なくとも TGF- β 2 を阻害する（例えば、Smad シグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、TGF- β 2 の低分子阻害剤は、TGF- β 2 に結合する。一部の実施形態では、TGF- β 2 の低分子阻害剤は、TGF- β 2 の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、TGF- β 2 の低分子阻害剤は、TGF- β 3、TGF- β 1、TIRI、ALK5 およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、少なくとも TGF- β 3 を阻害する（例えば、Smad シグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、TGF- β 3 の低分子阻害剤は、TGF- β 3 に結合する。一部の実施形態では、TGF- β 3 の低分子阻害剤は、TGF- β 3 の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、TGF- β 3 の低分子阻害剤は、TGF- β 2、TGF- β 1、TIRI、ALK5 およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害する。一部の実施形態では、TGF- β 3 の低分子阻害剤は、TGF- β 2 を阻害しないか、または TGF- β 2 を実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF- β 3 の低分子阻害剤は、TGF- β 1 をさらに阻害するが、TGF- β 2 を阻害しないか、または TGF- β 2 を実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、少なくとも TIRI を阻害する（例えば、Smad シグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、TIRI の低分子阻害剤は、TIRI に結合する。一部の実施形態では、TIRI の低分子阻害剤は、TIRI の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、TIRI の低分子阻害剤は、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、ALK5 およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 1 が TIRI に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 2 が TIRI に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 3 が TIRI に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 1 および TGF- β 3 が TIRI に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 1、TGF- β 2 および TGF- β 3 が TIRI に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 1 が TIRI に結合するのを阻害するが、TGF- β 2 が TIRI に結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 3 が TIRI に結合するのを阻害するが、TGF- β 2 が TIRI に結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF- β 1 および TGF- β 3 が TIRI に結合するのを阻害するが、TGF- β 2 が TIRI に結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF- β アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、少なくとも ALK5 を阻害する（例えば、Smad シグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、ALK5 の低分子阻害剤は、ALK5 に結合する。一部の実施形態では、ALK5 の低分子阻害剤は、ALK5 の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、ALK5の低分子阻害剤は、TGF 1、TGF 2、TGF 3、TRIIおよびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1がALK5に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 2がALK5に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 3がALK5に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1およびTGF 3がALK5に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1、TGF 2およびTGF 3がALK5に結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1がALK5に結合するのを阻害するが、TGF 2がALK5に結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 3がALK5に結合するのを阻害するが、TGF 2がALK5に結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1およびTGF 3がALK5に結合するのを阻害するが、TGF 2がALK5に結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、少なくともベータグリカンを阻害する（例えば、Smadシグナル伝達の阻害）。したがって、一部の

の実施形態では、ベータグリカンの低分子阻害剤は、ベータグリカンに結合する。一部の

の実施形態では、ベータグリカンの低分子阻害剤は、ベータグリカンの発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、ベータグリカンの低分子阻害剤は、TGF 1、TGF 2、TGF 3、TRIIおよびALK5の1つまたは複数をさらに阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1がベータグリカンに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 2がベータグリカンに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1およびTGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1、TGF 2およびTGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害する。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1がベータグリカンに結合するのを阻害するが、TGF 2がベータグリカンに結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害するが、TGF 2がベータグリカンに結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TGF 1およびTGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害するが、TGF 2がベータグリカンに結合するのを阻害しないか、または実質的に阻害しない。

10

20

30

40

【0191】

TGF アンタゴニスト低分子は、直接的阻害剤または間接的阻害剤であり得る。例えば、TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、TRII、ALK5、ベータグリカン、TGF 1、TGF 2、TGF 3の少なくとも1つもしくは複数、および/または下流のシグナル伝達因子（Smad）の1つもしくは複数の発現（例えば、転写、翻訳、細胞分泌、またはこれらの組合せ）を阻害し得る。あるいは、直接的TGF アンタゴニスト低分子または低分子の組合せは、例えば、TRII、ALK5、ベータグリカン、TGF 1、TGF 2およびTGF 3の1つもしくは複数、または下流のシグナル伝達因子の1つもしくは複数に直接結合し得る。1つまたは複数の間接的TGF アンタゴニスト低分子、および1つまたは複数の直接的TGF アンタゴニスト低分

50

子の組合せは、本明細書に開示の方法に従って使用され得る。

【0192】

本開示の結合有機低分子アンタゴニストは、公知の方法論（例えば、PCT公開の国際公開第00/00823号および国際公開第00/39585号を参照されたい）を使用して、特定および化学合成され得る。一般に、本開示の低分子アンタゴニストは、通常、約2000ダルトン未満のサイズ、あるいは約1500、750、500、250または200ダルトン未満のサイズであり、このような有機低分子は、好ましくは、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、TRII、ALK5、ベータグリカン、TGF1、TGF2およびTGF3）に特異的に結合する能力がある。このような低分子アンタゴニストは、周知の技術を使用して、過度の実験なく特定され得る。これに関して、ポリペ

10

【0193】

本開示の結合有機低分子は、例えば、アルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、第1級アミン、第2級アミン、第3級アミン、N-置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、ウレア、カルバメート、カーボネート、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホネート、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホネート、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホンアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアネート、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、および酸塩化物であり得る。

20

E. 核酸

【0194】

ある特定の態様では、本明細書に開示される方法および使用に従って使用されるTGFアンタゴニストは、ポリヌクレオチド（TGFアンタゴニストポリヌクレオチド）またはポリヌクレオチドの組合せである。TGFアンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、例えば、1つもしくは複数のリガンド（例えば、TGF1、TGF2およびTGF3）、TRII受容体、TRII関連I型受容体（例えば、ALK5）、TRII関連共受容体（例えば、ベータグリカン）および/または下流のシグナル伝達成分（例えば、Smad）を阻害し得る。一部の実施形態では、シグナル伝達（例えば、Smadシグナル伝達）を阻害するTGFアンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せについての能力は、例えば、本明細書に記載のアッセイを含む、細胞に基づくアッセイにおいて決定される。TGFアンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、単独で、あるいは異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の支持療法または活性薬剤と組み合わせて使用されてもよく、好ましくは、異所性骨化の1つもしくは複数の合併症の重症度または期間を予防または低減する。

30

40

【0195】

ある特定の態様では、TGFアンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、少なくともTGF1を阻害する（例えば、Smadシグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、TGF1のポリヌクレオチド阻害剤は、TGF1に結合する。一部の実施形態では、TGF1のポリヌクレオチド阻害剤は、TGF1の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、TGF1のポリヌクレオチド阻害剤は、TGF2、TGF3、TRII、ALK5およびベータグリカンの1つまたは複数さらにも阻害する。一部の実施形態では、TGF1のポリヌクレオチド阻害剤は、TGF2を阻害しないか、またはTGF2を実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF1のポリヌクレオチド阻害

50

剤は、T G F 3をさらに阻害するが、T G F 2を阻害しないか、またはT G F 2を
 実質的に阻害しない。ある特定の態様では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドま
 たはポリヌクレオチドの組合せは、少なくともT G F 2を阻害する（例えば、S m a d
 シグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、T G F 2のポリヌクレオチ
 ド阻害剤は、T G F 2に結合する。一部の実施形態では、T G F 2のポリヌクレオチ
 ド阻害剤は、T G F 2の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻
 害する。一部の実施形態では、T G F 2のポリヌクレオチド阻害剤は、T G F 3、T
 G F 1、T R I I、A L K 5およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害す
 10 る。ある特定の態様では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオ
 チドの組合せは、少なくともT G F 3を阻害する（例えば、S m a dシグナル伝達の阻
 害）。したがって、一部の実施形態では、T G F 3のポリヌクレオチド阻害剤は、T G
 F 3に結合する。一部の実施形態では、T G F 3のポリヌクレオチド阻害剤は、T G
 F 3の発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実
 施形態では、T G F 3のポリヌクレオチド阻害剤は、T G F 2、T G F 1、T R
 I I、A L K 5およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害する。一部の実施形
 態では、T G F 3のポリヌクレオチド阻害剤は、T G F 2を阻害しないか、またはT
 G F 2を実質的に阻害しない。一部の実施形態では、T G F 3のポリヌクレオチド阻
 害剤は、T G F 1をさらに阻害するが、T G F 2を阻害しないか、またはT G F 2
 20 を実質的に阻害しない。ある特定の態様では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチド
 またはポリヌクレオチドの組合せは、少なくともT R I Iを阻害する（例えば、S m a
 dシグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、T R I Iのポリヌクレオ
 チド阻害剤は、T R I Iに結合する。一部の実施形態では、T R I Iのポリヌクレオ
 チド阻害剤は、T R I Iの発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を
 阻害する。一部の実施形態では、T R I Iのポリヌクレオチド阻害剤は、T G F 1、
 T G F 2、T G F 3、A L K 5およびベータグリカンの1つまたは複数をさらに阻害
 30 する。一部の実施形態では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレ
 オチドの組合せは、T G F 1がT R I Iに結合するのを阻害する。一部の実施形態で
 は、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、T G
 F 2がT R I Iに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、T G F アンタゴニ
 ストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、T G F 3がT R I Iに結
 合するのを阻害する。一部の実施形態では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドま
 たはポリヌクレオチドの組合せは、T G F 1およびT G F 3がT R I Iに結合する
 のを阻害する。一部の実施形態では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポ
 リヌクレオチドの組合せは、T G F 1、T G F 2およびT G F 3がT R I Iに結
 合するのを阻害する。一部の実施形態では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドま
 たはポリヌクレオチドの組合せは、T G F 1がT R I Iに結合するのを阻害するが、
 T G F 2がT R I Iに結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。一
 部の実施形態では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの
 組合せは、T G F 3がT R I Iに結合するのを阻害するが、T G F 2がT R I I
 40 に結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。一部の実施形態では、T G
 F アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、T G F 1お
 よびT G F 3がT R I Iに結合するのを阻害するが、T G F 2がT R I Iに結合
 するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、T G F ア
 ンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、少なくともA L K 5
 を阻害する（例えば、S m a dシグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では
 、A L K 5のポリヌクレオチド阻害剤は、A L K 5に結合する。一部の実施形態では、A
 L K 5のポリヌクレオチド阻害剤は、A L K 5の発現（例えば、転写、翻訳、分泌または
 これらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、A L K 5のポリヌクレオチド阻害剤
 は、T G F 1、T G F 2、T G F 3、T R I Iおよびベータグリカンの1つまた
 は複数をさらに阻害する。一部の実施形態では、T G F アンタゴニストポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1がALK5に結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 2がALK5に結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 3がALK5に結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1およびTGF 3がALK5に結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1、TGF 2およびTGF 3がALK5に結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1がALK5に結合するのを阻害するが、TGF 2がALK5に結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 3がALK5に結合するのを阻害するが、TGF 2がALK5に結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1およびTGF 3がALK5に結合するのを阻害するが、TGF 2がALK5に結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。ある特定の態様では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、少なくともベータグリカン阻害剤を阻害する（例えば、Smadシグナル伝達の阻害）。したがって、一部の実施形態では、ベータグリカンのポリヌクレオチド阻害剤は、ベータグリカンに結合する。一部の実施形態では、ベータグリカンのポリヌクレオチド阻害剤は、ベータグリカンの発現（例えば、転写、翻訳、分泌またはこれらの組合せ）を阻害する。一部の実施形態では、ベータグリカンのポリヌクレオチド阻害剤は、TGF 1、TGF 2、TGF 3、TRI IおよびALK5の1つまたは複数をさらに阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1がベータグリカンに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 2がベータグリカンに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1およびTGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1、TGF 2およびTGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害する。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1がベータグリカンに結合するのを阻害するが、TGF 2がベータグリカンに結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害するが、TGF 2がベータグリカンに結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。一部の実施形態では、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組合せは、TGF 1およびTGF 3がベータグリカンに結合するのを阻害するが、TGF 2がベータグリカンに結合するのを、阻害しないか、または実質的に阻害しない。

【0196】

本開示のポリヌクレオチドアンタゴニストは、アンチセンス核酸、RNA i分子〔例えば、低分子干渉RNA (siRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)〕、アプタマーおよび/またはリボザイムであり得る。ヒトTRI I、ALK5、ベータグリカン、TGF 1、TGF 2およびTGF 3の核酸ならびにアミノ酸配列は、当技術分野において公知であり、したがって、本開示の方法による使用のためのポリヌクレオチドアンタゴニストは、当技術分野における知識および本明細書に提供される教示に基づいて、当業者によって日常的に作成され得る。

10

20

30

40

50

【0197】

例えば、アンチセンス技術は、アンチセンスDNAもしくはRNAにより、または三重らせん形成により、遺伝子発現を制御するために使用することができる。アンチセンス技術は、例えば、Okano (1991) J. Neurochem. 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)において議論されている。三重らせん形成は、例えば、Cooney et al. (1988) Science 241:456; および Dervan et al., (1991) Science 251:1300において議論されている。これらの方法は、ポリヌクレオチドの相補的DNAまたはRNAへの結合に基づく。一部の実施形態では、アンチセンス核酸は、所望の遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部分に対して相補的な一本鎖RNAまたはDNA配列を含む。しかしながら、絶対的な相補性は、好ましいが、必要でない。

10

【0198】

本明細書で言及される「RNAの少なくとも一部分に対して相補的」な配列とは、RNAとハイブリダイズして、安定な二重鎖を形成することが可能であるのに十分な相補性を有する配列を意味し；本明細書に開示される遺伝子の二本鎖アンチセンス核酸の場合では、したがって、二重鎖DNAの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が大きいほど、それが含有し得、安定な二重鎖（または場合によっては三重鎖）を依然として形成し得るRNAとの塩基ミスマッチが多くなる。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定するための標準的手順の使用によって、容認できるミスマッチの程度を確かめることができる。

20

【0199】

メッセージの5'末端、例えば、AUG開始コドンまで、およびAUG開始コドンを含む5'非翻訳配列に対して相補的であるポリヌクレオチドは、翻訳を阻害する際に最も効率的に働くはずである。しかしながら、mRNAの3'非翻訳配列に対して相補的な配列は、同様に、mRNAの翻訳を阻害する際に有効であることが示されている[例えば、Wagner, R., (1994) Nature 372:333-335を参照されたい]。したがって、本開示の遺伝子の5'または3'非翻訳非コード領域のいずれかに対して相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性mRNAの翻訳を阻害するためのアンチセンスアプローチにおいて使用することができるであろう。mRNAの5'非翻訳領域に対して相補的なポリヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含むはずである。mRNAコード領域に対して相補的なアンチセンスポリヌクレオチドは、あまり効果的ではない翻訳の阻害剤であるが、本開示の方法に従って使用することができるであろう。本開示のmRNAの5'-非翻訳領域、3'-非翻訳領域またはコード領域とハイブリダイズするように設計されているかに関わらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長でなければならず、好ましくは、6~約50ヌクレオチド長の範囲のオリゴヌクレオチドである。詳細な態様では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも50ヌクレオチドである。

30

40

【0200】

一実施形態では、本開示のアンチセンス核酸は、外因性配列からの転写によって、細胞内で生成される。例えば、ベクターまたはその一部分は、転写され、本開示の遺伝子のアンチセンス核酸(RNA)を生成する。このようなベクターは、所望のアンチセンス核酸をコードする配列を含有するであろう。このようなベクターは、転写されて所望のアンチセンスRNAを生成することができる限り、エピソームに残ったままであり得るか、または染色体に統合され得る。このようなベクターは、当技術分野において標準的な組換えDNA技術の方法によって構築することができる。ベクターは、脊椎動物細胞における複製および発現のために使用される、プラスミド、ウイルス、または当技術分野において公知の他のものであり得る。本開示の所望の遺伝子をコードする配列、またはその断片の発現

50

は、脊椎動物細胞、好ましくは、ヒト細胞中で作用する、当技術分野において公知の任意のプロモーターによってであり得る。このようなプロモーターは、誘導的または構成的であり得る。このようなプロモーターとしては、限定されるものではないが、SV40早期プロモーター領域 [例えば、Benoit and Chambon (1981) Nature 29:304-310を参照されたい]、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含有されるプロモーター [例えば、Yamamoto et al. (1980) Cell 22:787-797を参照されたい]、ヘルペスチミジンプロモーター [例えば、Wagner et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445を参照されたい]、およびメタロチオネイン遺伝子の調節配列 [例えば、Brinster, et al. (1982) Nature 296:39-42を参照されたい] が挙げられる。

10

【0201】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドアンタゴニストは、1つまたは複数の遺伝子の発現を標的にする干渉RNAまたはRNAi分子である。RNAiとは、標的化mRNAの発現に干渉するRNAの発現を指す。詳細には、RNAiは、siRNA (低分子干渉RNA) による特異的mRNAとの相互作用を介して、標的化遺伝子を発現抑制する。dsRNA複合体は、次いで、細胞による分解に対して標的にされる。siRNA分子は、十分に相補的 (例えば、その遺伝子に対して少なくとも80%の同一性) な標的遺伝子の発現に干渉する、10~50ヌクレオチド長の二本鎖RNA二重鎖である。一部の実施形態では、siRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して少なくとも85、90、95、96、97、98、99または100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

20

【0202】

追加のRNAi分子としては、短ヘアピンRNA (shRNA)、また短干渉ヘアピンおよびマイクロRNA (miRNA) が挙げられる。shRNA分子は、ループによって連結された標的遺伝子由来のセンス配列およびアンチセンス配列を含有する。shRNAは、核から細胞質に輸送され、mRNAとともに分解される。Pol IIIまたはU6プロモーターは、RNAiのためにRNAを発現するために使用することができる。Paddison et al. [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002] は、RNAiに影響を及ぼす手段としてヘアピンヘアフォールディングされる低分子RNA分子を使用している。したがって、このような短ヘアピンRNA (shRNA) 分子はまた、本明細書に記載の方法において有利に使用される。機能的shRNAのステムおよびループの長さは様々であり、ステムの長さは約25~約30ntのどこかの範囲であり得、ループのサイズは、サイレンシング活性に影響を与えることのない、4~約25ntの範囲内であり得る。任意の特定の理論に拘束されることは望まないが、これらのshRNAは、DICER RNaseの二本鎖RNA (dsRNA) 生成物と共通点があり、任意のイベントにおいて、特異的遺伝子の発現を阻害するための同じ能力を有する。shRNAは、レンチウイルスベクターから発現させることができる。miRNAは、「ステム-ループ」構造によって特徴付けられるpre-miRNAとして最初に転写される約10~70ヌクレオチド長の一本鎖RNAであり、その後、RISCによるさらなるプロセッシング後に、成熟miRNAにプロセッシングされる。

30

40

【0203】

限定されないがsiRNAを含むRNAiを媒介する分子は、化学合成 (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002)、dsRNAの加水分解 (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002) によってin vitroで、T7RNAポリメラーゼによるin vitro転写によって (Donze et al., Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002)、およびE. coliのRNase IIIなどのヌクレアーゼを使用する二本鎖RNAの加水分解によって (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:99

50

42-9947, 2002)、生成され得る。

【0204】

別の態様によれば、本開示は、限定されるものではないが、デコイDNA、二本鎖DNA、一本鎖DNA、複合体化DNA、カプセル化DNA、ウイルスDNA、プラスミドDNA、ネイキッドRNA、カプセル化RNA、ウイルスRNA、二本鎖RNA、RNA干渉を生じさせる能力がある分子、またはこれらの組合せを含む、ポリヌクレオチドアンタゴニストを提供する。

【0205】

一部の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドアンタゴニストはアプタマーである。アプタマーは、二本鎖DNA分子および一本鎖RNA分子を含む、核酸分子であって、これは、結合して、TRII、TGF 1、TGF 2およびTGF 3ポリペプチドなどの標的分子に特異的に結合する三次構造を形成する。アプタマーの作製および治療的使用は、当技術分野において十分に確立されている。例えば、米国特許第5,475,096号を参照されたい。アプタマーについての追加の情報は、米国特許出願公開第20060148748号に見ることができる。核酸アプタマーは、例えば、指数的富化によるリガンドの系統進化(SELEX)プロセスを介して、当技術分野において公知の方法を使用して選択される。SELEXは、例えば、米国特許第5,475,096号、米国特許第5,580,737号、米国特許第5,567,588号、米国特許第5,707,796号、米国特許第5,763,177号、米国特許第6,011,577号および米国特許第6,699,843号に記載の、標的分子に対する高度に特異的な結合を有する核酸分子の*in vitro*進化のための方法である。アプタマーを特定するための別のスクリーニング方法は、米国特許第5,270,163号に記載されている。SELEXプロセスは、種々の二次元および三次元構造を形成するための核酸の能力、ならびに実質的に、単量体または多量体のいずれであるかに関わらず、他の核酸分子およびポリペプチドを含む、任意の化学化合物とともに、リガンドとして機能する(特異的結合対を形成する)ためのヌクレオチド単量体内で利用可能な化学的多様性に基づく。任意のサイズまたは組成の分子が、標的としての機能を果たし得る。SELEX法は、候補オリゴヌクレオチドの混合物からの選択、ならびに所望の結合親和性および選択性を達成するために、同じ一般的な選択スキームを使用して、結合、分割および増幅の段階的な反復を含む。ランダム化配列のセグメントを含み得る、核酸の混合物から開始して、SELEX法は、混合物を結合のために有利な条件下で標的と接触させるステップ; 標的分子に特異的に結合しているそれらの核酸から未結合の核酸を分割するステップ; 核酸-標的複合体を解離させるステップ; 核酸-標的複合体から解離した核酸を増幅して、核酸のリガンド富化混合物を得るステップを含む。結合、分割、解離および増幅のステップは、所望により、多くのサイクルを繰り返して、標的分子に対して非常に特異的な高親和性の核酸リガンドを与える。

【0206】

典型的には、このような結合分子は、動物に対して別々に投与されるが[例えば、O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560を参照されたい]、このような結合分子はまた、宿主細胞によって取り込まれ、*in vivo*で発現されるポリヌクレオチドから、*in vivo*で発現させることができる[例えば、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)を参照されたい]。

3. スクリーニングアッセイ

【0207】

ある特定の態様では、本発明は、TGF 1、TGF 3およびTRIIのシグナル伝達経路のアゴニストまたはアンタゴニストである化合物(薬剤)を特定するためのTRIIポリペプチド(例えば、可溶性TRIIポリペプチド)の使用に関する。このスクリーニングにより特定された化合物は、TGF 1およびTGF 3のシグナル伝達活性を調節するそれらの能力を*in vitro*で評価するために試験することができる。

必要に応じて、これらの化合物は、組織増殖を調節するそれらの能力を *in vivo* で評価するために、動物モデルにおいてさらに試験することができる。

【0208】

TGF β 1、TGF β 3およびT R I Iポリペプチドを標的にすることによって、組織増殖を調節するための治療剤についてのスクリーニングに対する多数のアプローチがある。ある特定の実施形態では、化合物のハイスループットスクリーニングを、TGF β 1、TGF β 3またはT R I I媒介細胞シグナル伝達を攪乱する薬剤を特定するために行なうことができる。ある特定の実施形態では、T R I IポリペプチドのTGF β 1またはTGF β 3に対する結合を特異的に阻害または低減する化合物をスクリーニングおよび特定するために、アッセイが行なわれる。あるいは、T R I IポリペプチドのTGF β 1またはTGF β 3に対する結合を増強する化合物を特定するために、アッセイを使用することができる。さらなる実施形態では、化合物は、TGF β 1、TGF β 3またはT R I Iポリペプチドと相互作用するそれらの能力によって特定することができる。

10

【0209】

種々のアッセイ形式が、本開示を考慮すると、十分であり、本明細書に明示的に記載されないものは、それにもかかわらず、当業者により理解される。本明細書に記載されるように、本発明の試験化合物（薬剤）は、任意のコンビナトリアル化学法によって作出され得る。あるいは、対象の化合物は、*in vivo* または *in vitro* で合成される天然に存在する生体分子であり得る。組織増殖のモジュレーターとして作用するそれらの能力について試験される化合物（薬剤）は、例えば、細菌、酵母、植物または他の生物体（例えば、天然生成物）により生成され得、化学的に生成され得（例えば、ペプチド模倣体を含む低分子）、または組換え的に生成され得る。本発明により企図される試験化合物としては、非ペプチジル有機分子、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、糖、ホルモンおよび核酸分子が挙げられる。詳細な実施形態では、試験薬剤は、約2,000ダルトン未満の分子量を有する小有機低分子である。

20

【0210】

本発明の試験化合物は、単一の別々の実体として提供され得、または、コンビナトリアル化学によって作成されたものなどの、より高い複雑性のライブラリー中に提供され得る。これらのライブラリーは、例えば、アルコール、ハロゲン化アルキル、アミン、アミド、エステル、アルデヒド、エーテルおよび他のクラスの有機化合物を含むことができる。試験システムへの試験化合物の提示は、特に、最初のスクリーニングステップにおいて、化合物の単離形態または混合物としてのいずれかであり得る。必要に応じて、化合物は、必要に応じて他の化合物により誘導体化されてもよく、化合物の単離を容易にする誘導体化基を有していてもよい。誘導体化基の非限定的な例としては、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン (*digoxigenin*)、緑色蛍光タンパク質、同位体、ポリヒスチジン、磁気ビーズ、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、光活性化型架橋剤またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

30

【0211】

化合物および天然抽出物のライブラリーを試験する多くの薬物スクリーニングプログラムでは、所与の期間中に調査される化合物の数を最大化するために、ハイスループットアッセイが望ましい。精製形態または半精製形態のタンパク質により誘導され得るものなどの、無細胞系で行なわれるアッセイは、多くの場合、それらが、迅速な開発および試験化合物により媒介される分子標的中の変更の比較的容易な検出を可能にするために作製することができるという点で、「一次」スクリーニングとして好ましい。また、試験化合物の細胞毒性または生物学的利用率の効果は、一般に、*in vitro* 系において無視することができる。アッセイは、代わりに、T R I IポリペプチドおよびTGF β 1またはTGF β 3の間の結合親和性の変更に見られ得る、分子標的に対する薬物の効果を主に重視する。

40

【0212】

単に説明するために、本発明の例示的なスクリーニングアッセイでは、目的の化合物を

50

、通常TGF β 1またはTGF β 3に結合する能力がある単離および精製されたTRIポリペプチドと接触させる。次いで、化合物およびTRIポリペプチドの混合物に、TRIリガンドを含有する組成物を添加する。TRI/TGF β 1複合体またはTRI/TGF β 3複体の検出および定量化は、TRIポリペプチドおよびTGF β 1またはTGF β 3の間の複合体形成を阻害する（または増強する）化合物の有効性を決定するための手段を提供する。化合物の有効性は、様々な濃度の試験化合物を使用して得られるデータから用量反応曲線を作製することによって、評価することができる。また、対照アッセイを、比較用のベースラインを提供するために行なうこともできる。例えば、対照アッセイでは、単離および精製されたTGF β 1またはTGF β 3を、TRIポリペプチドを含有する組成物に添加し、TRI/TGF β 1複合体またはTRI/TGF β 3複体の形成を、試験化合物の非存在中で定量化する。一般に、反応物を混合し得る順序は変化させることができること、および同時に混合することができることが理解される。また、精製されたタンパク質に代えて、細胞抽出物および溶解物を、好適な無細胞アッセイ系にするために使用してもよい。

【0213】

TRIポリペプチドおよびTGF β 1またはTGF β 3の間の複合体形成は、種々の技術によって検出され得る。例えば、複合体の形成の調節を、例えば、放射性標識（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^3H ）、蛍光標識（例えば、FITC）、または酵素標識されたTRIポリペプチドもしくはTGF β 1もしくはTGF β 3などの検出可能に標識されたタンパク質を使用して、イムノアッセイによって、またはクロマトグラフィー検出によって、定量化することができる。

【0214】

ある特定の実施形態では、本発明は、TRIポリペプチドおよびその結合タンパク質の間の相互作用の程度を、直接的または間接的のいずれかで測定する際に、蛍光偏光アッセイおよび蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）アッセイの使用を企図する。さらに、光導波路（PCT公開の国際公開第96/26432号および米国特許第5,677,196号）、表面プラズモン共鳴（SPR）、表面電荷センサー、および表面力センサーに基づくものなどの他の検出様式は、本発明の多くの実施形態に適合する。

【0215】

また、本発明は、TRIポリペプチドおよびその結合タンパク質の間の相互作用を破壊または増強する薬剤を特定するための、「ツーフライブリッドアッセイ」としても公知の、相互作用トラップアッセイの使用を企図する。例えば、米国特許第5,283,317号；Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232；Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054；Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924；およびIwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696を参照されたい。詳細な実施形態では、本発明は、TRIポリペプチドおよびその結合タンパク質の間の相互作用を解離させる化合物（例えば、低分子またはペプチド）を特定するための、逆ツーフライブリッドシステムの使用を企図する。例えば、Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29；Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81；ならびに米国特許第5,525,490号；米国特許第5,955,280号；および米国特許第5,965,368号を参照されたい。

【0216】

ある特定の実施形態では、対象の化合物は、本発明のTRIまたはTGF β 1またはTGF β 3ポリペプチドと相互作用するそれらの能力によって特定される。化合物およびTRIポリペプチドまたはTGF β 1ポリペプチドまたはTGF β 3ポリペプチドの間の相互作用は、共有的または非共有的であり得る。例えば、このような相互作用は、光架橋、放射性標識リガンド結合およびアフィニティークロマトグラフィーを含む、in

10

20

30

40

50

*in vitro*の生化学的方法を使用して、タンパク質レベルで特定することができる (Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1)。ある特定の場合では、化合物は、TGF- β 1またはTGF- β 3またはTRIIポリペプチドに結合する化合物を検出するためのアッセイなどの、機構に基づくアッセイでスクリーニングしてもよい。これは、固相または流動相の結合イベントを含み得る。あるいは、TGF- β 1またはTGF- β 3またはTRIIポリペプチドをコードする遺伝子を、レポーターシステム (例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質) とともに細胞にトランスフェクトし、好ましくは、ハイスループットスクリーニングによってライブラリーに対して、またはライブラリーの個々のメンバーを用いてスクリーニングすることができる。他の機構に基づく結合アッセイ、例えば、自由エネルギーの変化を検出する結合アッセイを使用してもよい。結合アッセイは、ウェル、ビーズもしくはチップに固定されるか、固定された抗体によって捕捉されるか、またはキャピラリー電気泳動によって分解される標的を用いて行なうことができる。結合した化合物は、通常、比色分析もしくは蛍光、または表面プラズモン共鳴を使用して、検出され得る。

10

【0217】

ある特定の態様では、本発明は、TGF- β 1またはTGF- β 3が媒介する細胞シグナル伝達を調節する (刺激する、または阻害する) ための方法および薬剤を提供する。したがって、特定された任意の化合物は、全細胞または組織において、*in vitro*または*in vivo*で試験して、TGF- β 1またはTGF- β 3シグナル伝達を調節するそれらの能力を確認することができる。当技術分野において公知の様々な方法をこの目的のために利用することができる。

20

4. 例示的な治療的使用

【0218】

本明細書で使用される場合、障害または状態を「予防する」治療薬とは、統計学的試料中で、未処置の対照試料と比べて、処置試料における障害もしくは状態の発生を低減させるか、あるいは未処置の対照試料と比べて、障害または状態の1つもしくは複数の症状の発生を遅延させるか、またはその症状の重症度を低減させる化合物を指す。

【0219】

「処置」、「処置すること」、「緩和」などの用語は、本明細書において、一般に、所望の薬理学的効果および/または生理学的効果を得ることを意味し、処置される状態の1つもしくは複数の症状の重症度を改善すること、緩和すること、および/または減少させることを指すためにも使用され得る。効果は、疾患、状態もしくはその症状の開始または再発を、完全または部分的に遅延させる観点から予防的であってもよく、ならびに/あるいは疾患もしくは状態、および/または疾患もしくは状態に起因する有害効果を、部分的または完全に治癒させる観点で治療的であってもよい。本明細書で使用される「処置」は、哺乳動物、特に、ヒトの疾患または状態の任意の処置を包含し、(a) 疾患もしくは状態に罹患しやすくあり得るが、それを有するとまだ診断されていない対象において生じる疾患または状態を予防すること; (b) 疾患もしくは状態を阻害すること (例えば、その発生を阻止すること); あるいは (c) 疾患もしくは状態を軽減すること (例えば、疾患もしくは状態の退行を引き起こすこと、1つもしくは複数の症状の改善を提供すること) を含む。

30

40

【0220】

「患者」、「対象」または「個体」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指す。これらの用語には、哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、実験動物、家畜動物 (ウシ、ブタ、ラクダなどを含む)、コンパニオン動物 (例えば、イヌ、ネコ、他の飼育動物など) およびげっ歯類 (例えば、マウスおよびラット) を含む。特定の実施形態では、患者、対象または個体はヒトである。

【0221】

本明細書で使用される場合、「組合せ」、「との組み合わせで」、「共投与」などは、

50

第2の療法が身体内で依然として有効であるように（例えば、2つの化合物が、患者において同時に有効であり、これは、2つの化合物の相乗効果を含み得る）、任意の形態の投与を指す。有効性は、血液、血清または血漿中の薬剤の測定可能な濃度に関連しないことがある。例えば、異なる治療用化合物は、同じ製剤中または別々の製剤中のいずれかで、同時的または逐次的のいずれかで、異なるスケジュールで投与することができる。したがって、このような処置を受ける個体は、異なる療法の組合せ効果から利益を得ることができる。本開示の1つまたは複数のTGFアンタゴニストは、1つもしくは複数の他の追加薬剤または支持療法と同時に、その前に、またはその後に、投与することができる。一般に、それぞれの治療剤は、特定の薬剤について決定された用量および/またはタイムスケジュールで投与される。レジメンにおいて用いられる特定の組合せは、達成される療法および/または所望の治療効果とともに、本開示のアンタゴニストの適合性を考慮に入れる。

10

【0222】

一部分では、本開示は、有効量のTGFアンタゴニストを必要な患者に投与することによる、異所性骨化を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、この方法は、有効量のTGFアンタゴニストにより、必要な患者における異所性骨化の重症度および/または期間を予防または低減することに関する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGFアンタゴニストを必要な患者に投与することによって、異所性骨化に関連する疾患または状態を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、この方法は、有効量のTGFアンタゴニストにより、必要な患者における異所性骨化に関連する疾患または状態の重症度および/または期間を予防または低減することに関する。必要に応じて、このような方法は、異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、TGFアンタゴニストを投与することをさらに含む。

20

【0223】

一般に、異所性骨化(HO)は、骨格の骨膜(骨格系)の外側の軟組織部位における成熟した層板骨の類骨形成の結果である。多くの場合、HOの開始の前の刺激する事象、通常、血腫をもたらす得る外傷のエピソードがある。一般に、HOの進行は、骨芽細胞または軟骨芽細胞に分化することができる、多能性(多分化能)間葉系細胞の供給を必要とする。しかしながら、他のHO発生の背後の作用機構は、大部分は未知である。類骨形成は、多くの場合、局所的腫脹、疼痛、紅斑、および時々発熱によって特徴付けられる炎症期に関連する。この病理学的プロセスは、皮膚、皮下組織、骨格筋、および関節に隣接する線維性組織などの部位において起こり得る。骨は、血管壁および靭帯においても形成されることがある。病変は、小さな臨床的に重要でない病巣から、身体全体に及ぶ非常に多くの沈着の範囲である。HOは、関節拘縮および関節強直、疼痛、痙縮、腫脹の発熱、神経血管圧迫症候群、褥瘡および著しい身体障害において生じ得る。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGFアンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、異所性骨化(例えば、骨沈着、骨髄腔の形成、関節拘縮、関節強直、疼痛、痙縮、腫脹、発熱、神経血管圧迫症候群および褥瘡)に関連する1つまたは複数の合併症を処置する方法に関する。

30

40

【0224】

HOは、最も一般的には、脊髄損傷、外傷、脳損傷、熱傷、骨折、筋肉挫傷および関節形成術に関連する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGFアンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、脊髄損傷、外傷、脳損傷、熱傷、骨折、筋肉挫傷および関節形成術からなる群から選択される1つもしくは複数の障害または状態に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。

【0225】

HOは、臀部、寛骨臼および肘の骨折の外科手術の深刻な合併症である。完全股関節形成術(関節置換術)または下腿の長骨の重度の骨折を有する約3人に1人の患者は、HO

50

を発生するが、まれに症候性である。以前の股関節形成術後にHOを発生した50%~90%の患者は、さらに異所性骨化を発生する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGFアンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、関節、臀部、寛骨臼および肘の骨折の外科手術（例えば、置換手術）の1つまたは複数に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。

【0226】

HOは、多くの場合、外傷を有する患者において発生する。特に、HOは、脳および脊髄損傷に関連し、これは、外傷性脳損傷が骨折治癒の促進を引き起こす臨床的観察の主な原因であり得る。Morley et al. (2005) Injury 36(3): 363。HOは、重度の熱傷、戦闘関連外傷および肢切断にも関連する。外傷性異所性骨化において、患者は、筋肉における温感、圧痛、硬い腫脹、ならびに関与する筋肉によって支配される関節における可動域の減少を訴えることがある。多くの場合、数週間から数か月前にその領域への打撃または他の外傷の病歴がある。異所性骨化を発生した、外傷性神経損傷、重度の神経障害または重度の熱傷を有する患者は、影響がある領域における運動制限を経験する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGFアンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、必要な患者に投与することによって、外傷、脳または脊髄損傷、熱傷、戦闘関連外傷および肢切断の1つまたは複数に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。

【0227】

進行性骨化性線維異形成症(FOP)などの異所性骨化を引き起こす稀な遺伝性障害も存在する。FOPは、極めて稀な結合組織疾患である。この疾患は、身体の修復機構の突然変異によって引き起こされ、線維性組織(筋肉、腱および靭帯を含む)に、自然発症的、または損傷を受けた場合に、骨化を引き起こす。多くの場合、傷害は、関節をその場所で永久にこわばらせ得る。未知の理由により、FOPを有する小児の骨は、変形した足の親指、場合により関節の欠損を有し、または単にマイナーな関節に目立つしこりを示す。FOPの骨の形成をもたらす第1の「フレアアップ」は、通常、10歳より前に起こる。胎児において骨が成長するのと全く同じように、骨の成長が、上から下に進行する。FOPを有する小児は、典型的には、首から始まって、次いで、肩、腕、胸部領域、最終的に足に、骨が発生する。特に、骨化は、典型的には、最初、身体の背部、軸部、頭蓋および基部領域に見られる。その後、疾患は、身体の腹部、体肢、尾側、および末端領域に進行する。しかしながら、フレアアップを引き起こす損傷に起因して、必ずしもこの順序で起こるわけではない。多くの場合、この疾患を特徴付ける腫瘍様のしこりが突然現れる。この状態は、関節に影響を与える運動機能の喪失を引き起こし、発話および食事を制限する完全な開口を不可能にすることを含む。胸郭の周囲での余分な骨形成は、呼吸の合併症を引き起こす肺および横隔膜の拡張を制限する。この疾患は非常に稀であるので、症状は、多くの場合、がんまたは線維症と誤診される。これは、医師を生検の指示に誘導し、これは、これらのしこりの成長を悪化させ得る。生存の年齢の中央値は、適切な管理により、40歳である。しかしながら、診断が遅れると、外傷および感染症が平均余命を減少させ得る。一般に、FOPは、染色体2q23-24における常染色体優性の対立遺伝子によって引き起こされる。対立遺伝子は、可変の発現度を有するが、完全な浸透率を有する。ほとんどの症例は、配偶子における自然突然変異によって引き起こされる。類似しているが、難治性がより低い疾患は、線維性骨異形成症であり、これは、接合後の突然変異によって引き起こされる。ACVR1遺伝子(アクチビン様キナーゼ2(ALK2)としても公知)における突然変異は、この疾患の原因である。ACVR1は、アクチビン受容体1型、BMP1型受容体をコードする。突然変異は、ACVR1タンパク質において、コドン206のアルギニンからヒスチジンへの置換を引き起こす。この置換は、ACVR1の異常活性化を引き起こし、結合組織および筋肉組織の二次骨格への変換をもたらす。これは、内皮細胞を、間葉系幹細胞に、次いで骨に変換させる。一部の実施形態では、本開示

は、有効量の TGF アンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化および/または進行性骨化性線維異形成症を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、進行性骨化性線維異形成症に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、有効量の TGF アンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化および/または線維性骨異形成症を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、線維性骨異形成症に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。

【0228】

FOP についての治療法または承認された処置は存在しない。骨を外科的に除去する試みは、爆発的な骨の成長をもたらす。イソトレチノイン、エチドロネートと経口コルチコステロイド、およびマレイン酸ペルヘキシリンの臨床試験は、有効性を実証することに失敗したとはいえ、この疾患の経過の変動性および低い有病率は不確実性を誘導する。希少疾患に目を向ける一握りの製薬会社は、現在、FOP のための異なる治療アプローチへの検討の様々な段階にある。2015年8月に、米国食品医薬品局のオーファン製品開発部は、FOP のための2つの新規化合物のために、La Jolla Pharmaceuticals のオーフアンドラッグ指定を認めた。この化合物は、ACVR1 (ALK2) を選択的に遮断するように設計された低分子キナーゼ阻害剤である。2015年8月に、Clementia Pharmaceuticals も、FOP の処置のためにパロパロテンを検討するフェーズIIの臨床試験への小児の登録を開始した。前臨床研究は、レチノイン酸受容体ガンマアゴニストであるパロパロテンが、BMP 経路における二次メッセンジャー系の阻害を介して、動物モデルにおいて異常な骨形成を阻止したことを実証した。2015年9月に、Regeneron は、アクチビンAによるACVR1受容体の活性化が関与する疾患の機構への新たな洞察を公表した。2016年に、この会社は、健康なボランティアにおけるREGN 2477 (アクチビンA抗体)のフェーズ1研究を開始した。別の可能性がある治療アプローチは、正常なACVR1遺伝子発現を保ちながら、分解のために突然変異したmRNAを標的にする対立遺伝子特異的RNA干渉を含む。J. W. Lowery et al. (2012) Gene Therapy 19 (701-702): 701-702。強力な構造的に活性なALK2 R206H突然変異体を発現するFOPのマウスモデルは、間葉系細胞における核レチノイン酸受容体 - (RAR -) に対する選択的アゴニストの特定において有用であることが見出された。RAR - アゴニストは、部分的にHOを阻害することが見出されたが、RAR - に対するアゴニストは、FOPモデルにおける筋肉内および皮下のHOの強力な阻害剤であることが見出された。Shimono et al., 2011, Nature Medicine 17: 454-60)。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを、FOPを処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、FOPに関連する異所性骨化を処置する方法であって、追加の活性薬剤または支持療法が、イソトレチノイン、エチドロネートと経口コルチコステロイド、マレイン酸ペルヘキシリン、ALK2低分子阻害剤、パロパロテン、レチノイン酸受容体ガンマアゴニスト、レチノイン酸受容体アルファアゴニスト、アクチビン抗体(例えば、REGN 2477などのアクチビンA抗体)およびALK2の対立遺伝子特異的RNA干渉からなる群から選択される、方法に関する。

【0229】

異所性骨化を引き起こす別の稀な遺伝性障害は、進行性骨異形成症(POH)であり、これは、皮膚または皮下の骨化によって特徴付けられる状態である。POHは、アデニリルシクラーゼの活性化において多くのGタンパク質共役受容体の下流で作用する刺激性グアニンヌクレオチド結合タンパク質のアルファサブユニットであるGsをコードするGNAS遺伝子における不活性化突然変異に関連する。Kaplan, et al. 1994, J Bone Joint Surg Am 76, 425-436; Shore

10

20

30

40

50

, et al., 2002, N Engl J Med 346, 99-106; および Eddy, et al., 2000, J Bone Miner Res 15, 2074-2083。臨床的には、POHは、乳児期に皮膚および皮下の骨化を示し、小児期に骨格筋および深部結合組織（例えば、腱、靭帯、筋膜）に進行する。時間と共に、これらの骨化は、関節の硬直、骨および関節の融合、ならびに影響を受けた手足の成長遅延をもたらす。現在、POHを有する患者は、異所性骨の大幅な外科的切除を受けて、病変の拡大を抑止する。これは、多くの場合、部分的または完全な手足の切断をもたらし、病変は頻繁に再発し（Kaplan, et al., 2000, J Bone Miner Res 15, 2084-94; および Shehab, et al., 2003, J Nucl Med 43, 346-353）、これは、改善された治療的介入の

10

開発の重要性を明確に示す。POHを有する患者において行なわれた観察は、軟組織に存在する間葉系幹細胞が、骨芽細胞に不適切に分化し、骨への沈着を開始することを示唆する。in vitro および in vivo 動物モデルは両方とも欠いているので、POHの病態形成は、未知のままであり、HOのすべての形態と同様に、適切な処置は不足している。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化および/または進行性骨異形成症を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、進行性骨異形成症に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。

【0230】

HOはまた、成人の呼吸促迫症候群を管理するために神経筋遮断されている患者、および非外傷性脊髄症を有する患者において起こることがある。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、成人の呼吸促迫症候群の管理に使用される神経筋遮断に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを、必要に応じて異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、非外傷性脊髄症に関連する異所性骨化を処置する方法に関する。

20

【0231】

HOのための処置の明確な形態は存在しない。当初は、ビスホスホネートが、股関節手術後に価値があると期待されたが、予防的に使用されたにもかかわらず、利益の説得力のある証拠はなかった。異所性骨化の予防のための予防的な放射線療法も1970年代から用いられている。様々な用量および技術が使用されている。一般に、放射線療法は、外科手術の時点でできるだけ近い時点で送達しなければならない。外科手術の24~48時間以内の単一区画への7~8グレイの用量で成功裏に使用された。処置体積は、関節周囲の領域を含み、臀部、膝、肘、肩、顎のために、または脊髄損傷後の患者において使用することができる。単一用量の放射線療法は、十分に耐容性を示すことが見出され、出血、感染または創傷の治癒の妨害の増加はなく、費用効果が高い。インドメタシン、イブuproフェンおよびアスピリンなどのある特定の抗炎症剤は、全人工股関節置換術後の異所性骨化の再発の予防において多少の効果を示した。理学療法士または作業療法士によって提供される他動可動域の訓練または他の可動化技術などの保存的処置も、HOの予防の助けになり得る。一部の実施形態では、本開示は、有効量のTGF アンタゴニストを、異所性骨化を処置するための1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与することによって、異所性骨化を処置する方法であって、1つもしくは複数の追加の活性薬剤または支持療法が、ビスホスホネート、放射線療法、抗炎症剤（例えば、インドメタシン、イブuproフェンおよびアスピリン）、および他動可動域の訓練または他の可動化技術などの保存的処置からなる群から選択される、方法に関する。

30

40

5. 医薬組成物

【0232】

本明細書に記載の治療剤（例えば、T R I I融合ポリペプチド）は、医薬組成物に製剤化され得る。本開示による使用のための医薬組成物は、1つもしくは複数の生理的に許容される担体または賦形剤を使用して、慣用の方法で製剤化され得る。このような製剤は、一般に、ほとんどの規制上の要件に適合する、実質的にパイロジェンフリーである。

【0233】

ある特定の実施形態では、本開示の治療方法は、組成物を全身的または局所的に、インプラントまたはデバイスとして投与することを含む。投与される場合、本開示における使用のための治療用組成物は、パイロジェンフリーの、生理学的に許容される形態である。上記に記載の組成物中に、必要に応じて含まれていてもよい、T G F シグナル伝達アンタゴニスト以外の治療的に有用な薬剤は、本明細書に開示される方法において、対象の化合物（例えば、T R I Iポリペプチド）と同時にまたは連続的に投与され得る。

10

【0234】

典型的には、本明細書に開示されるタンパク質治療剤は、非経口で、特に、静脈内または皮下に投与される。非経口投与に好適な医薬組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される無菌の等張の水溶液もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液またはエマルジョン、あるいは使用の直前に無菌注射溶液または分散液に再構成され得る無菌粉末と組み合わせて、1つまたは複数のT G F アンタゴニストを含んでいてもよく、これは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁化剤もしくは増粘剤を含有していてもよい。本開示の医薬組成物において用いられ得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

20

【0235】

組成物および製剤は、所望により、活性成分を含有する1つもしくは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサーデバイスで提供されてもよい。パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチック製のホイルを含んでいてもよい。パックまたはディスペンサーデバイスは、投与についての使用説明書が添付されていてもよい。

30

【0236】

さらに、組成物は、標的組織部位への送達のための形態でカプセル化または注射されてもよい。ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、1つまたは複数の治療用化合物（例えば、T G F アンタゴニスト）を標的組織部位に送達する能力があり、組織が成長するための構造を提供し、最適には、身体内に再吸収される能力があるマトリックスを含んでいてもよい。例えば、マトリックスは、T G F アンタゴニストの徐放を提供し得る。このようなマトリックスは、他の移植医学適用のために現在使用されている材料で形成されてもよい。

【0237】

マトリックス材料の選択は、生体適合性、生分解性、機械的特性、美容的外観および界面特性に基づく。対象の組成物の特定の適用は、適切な製剤を規定する。組成物のための有望なマトリックスは、生分解性で、化学的に規定される、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸およびポリ無水物であり得る。他の有望な材料は、骨または皮膚コラーゲンなどの、生分解性で、生物学的に十分に規定されるものである。さらなるマトリックスは、純粋なタンパク質または細胞外マトリックス成分で構成される。他の有望なマトリックスは、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミナートまたは他のセラミックなどの、非生分解性で、化学的に規定されるものである。マトリックスは、ポリ乳酸およびヒドロキシアパタイト、またはコラーゲンおよびリン酸三カルシウムなどの上記で述べた種類の材料のいずれかの組合せで構成され得る。バイオセラミックは、カルシウム - アルミナート - ホスフェート中などの組成物中で改変されても

40

50

よく、処理して孔径、粒子径、粒子形状および生分解性が改変される。

【0238】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、経口的に、所定量の薬剤を活性成分としてそれぞれ含有する、例えば、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ（風味付けされた基剤、通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカントを使用する）、散剤、顆粒剤の形態で、あるいは水性もしくは非水性液体中の液剤または懸濁剤として、あるいは水中油型もしくは油中水型の液体エマルジョンとして、あるいはエリキシル剤もしくはシロップ剤として、あるいはトローチ（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤を使用する）として、ならびに／あるいは洗口剤などとして投与することができる。薬剤はまた、ポーラス、舐剤またはペーストとして投与されてもよい。

10

【0239】

経口投与用の固体剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣剤、散剤、顆粒剤など）において、本発明の1つまたは複数の治療用化合物は、1つまたは複数の薬学的に許容される担体、例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸ニカルシウム、および／または以下のいずれかと混合され得る：（1）フィラーまたは増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよび／またはケイ酸；（2）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシアなど；（3）保湿剤、例えば、グリセロール；（4）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のシリケートおよび炭酸ナトリウム；（5）溶解遅延剤、例えば、パラフィン；（6）吸収促進剤、例えば、第4級アンモニウム化合物；（7）湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびグリセロールモノステアレートなど；（8）吸収剤、例えば、カオリンおよびベントナイトクレー；（9）滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物；ならびに（10）着色剤。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合において、医薬組成物はまた、緩衝剤を含んでいてもよい。同様の種類の固体組成物はまた、ラクトースまたは乳糖などの賦形剤、および高分子量ポリエチレングリコールなどを使用する、軟および硬ゼラチンカプセルにおいてフィラーとして用いられてもよい。

20

【0240】

経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤が挙げられる。活性成分に加えて、液体剤形は、当技術分野において一般に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルピタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物を含有していてもよい。不活性希釈剤以外に、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、甘味剤、香味剤、着色剤、香料ならびに保存剤などの補助剤も含み得る。

30

40

【0241】

懸濁剤は、活性化合物に加えて、懸濁化剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルピタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにこれらの混合物を含有していてもよい。

【0242】

本発明の組成物はまた、補助剤、例えば、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤を含有していてもよい。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルピン酸などの包含によって、確実にされ得る。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを組成物に含めることも望ましくあり得る。加

50

えて、注射可能な医薬形態の持続的吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅らせる薬剤の包含によって、もたらされ得る。

【0243】

投薬量レジメンは、対象の本発明の化合物（例えば、TGF アンタゴニスト）の作用を変える様々な要因を考慮して、主治医によって決定されることが理解される。様々な要因としては、限定されるものではないが、患者の年齢、性別および食事、疾患の重症度、投与時間、ならびに他の臨床的要因が挙げられる。必要に応じて、投薬量は、再構成において使用されるマトリックスの種類、および組成物中の化合物の種類によって変化し得る。最終組成物への他の公知の成長因子の添加も投薬量に影響を与え得る。進行は、骨の成長および/または修復、例えば、X線（DEXAを含む）、組織形態計測的決定およびペ

10

【0244】

ある特定の実施形態では、本発明は、TGF アンタゴニストの*in vivo*産生のための遺伝子治療も提供する。このような治療は、上記で列挙したような障害を有する細胞または組織へのTGF アンタゴニストポリヌクレオチド配列の導入によって、その治療効果を達成するであろう。TGF アンタゴニストポリヌクレオチド配列の送達は、キメラウイルスなどの組換え発現ベクター、またはコロイド分散系を使用して、達成することができる。標的化リポソームの使用が、TGF アンタゴニストポリヌクレオチド配列の治療的送達のために好ましい。

【0245】

本明細書において教示されている遺伝子治療のために利用され得る様々なウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、または好ましくは、レトロウイルスなどのRNAウイルスが挙げられる。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウスまたは鳥類レトロウイルスの誘導体である。単一の外来遺伝子が挿入され得るレトロウイルスベクターの例としては、限定されるものではないが、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMuLV）、ハーベイマウス肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MuMTV）およびラウス肉腫ウイルス（RSV）が挙げられる。いくつかの追加のレトロウイルスベクターは、複数の遺伝子を組み込むことができる。すべてのこれらのベクターは、形質導入細胞を特定および作製することができるように、選択マーカー用の遺伝子を移行または組み込むことができる。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質またはタンパク質を付着させることによって、標的特異的にすることができる。好ましい標的化は、抗体を使用することによって、達成される。当業者は、特定のポリヌクレオチド配列が、TGF アンタゴニストポリヌクレオチドを含有するレトロウイルスベクターの標的特異的送達を可能にするために、レトロウイルスゲノムに挿入され、またはウイルスエンベロープに付着され得ることを認識する。好ましい実施形態では、ベクターは、骨または軟骨に標的化される。

20

30

【0246】

あるいは、組織培養細胞は、従来のリン酸カルシウムトランスフェクションによって、レトロウイルス構造遺伝子 *gag*、*pol* および *env* をコードするプラスミドで直接トランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞は、目的の遺伝子を含有するベクタープラスミドでトランスフェクトされる。得られる細胞は、レトロウイルスベクターを培養培地に放出する。

40

【0247】

TGF アンタゴニストポリヌクレオチドのための別の標的化送達系は、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質に基づく系が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系は、リポソームである。リポソームは、*in vitro* および *in vivo* での送達ビヒクルとして有用な人工膜小胞である。RNA、DNA および無傷のビリオンが水性の内部に封入され、生物学的に活性化形態で細胞に送達され得る（例えば、Fraley, et al., Trends Bi

50

ochem. Sci., 6:77, 1981を参照されたい)。リポソームビヒクルを使用する効率的な遺伝子導入のための方法は、当技術分野において公知であり、例えば、Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988を参照されたい。リポソーム組成物は、通常、リン脂質の組合せ、通常、ステロイド、特に、コレステロールとの組合せである。他のリン脂質または他の脂質も使用し得る。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価カチオンの存在に依存する。

【0248】

リポソームの製造において有用な脂質の例としては、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシドおよびガングリオシドなどのホスファチジル化合物が挙げられる。例示的なリン脂質としては、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。リポソームの標的化はまた、例えば、器官特異性、細胞特異性および細胞小器官特異性に基づくことによっても可能であり、当技術分野において公知である。

10

【0249】

本開示は、pHを調整するための酸および塩基；ならびに狭い範囲内でpHを保つための緩衝剤を含んで、変更され得る製剤を提供する。

例示

【0250】

以下、本発明を一般に記載し、本発明のある特定の実施形態の例示の目的のために単に含まれ、本発明を限定することを意図するものではない、以下の実施例を参照することによって、より容易に理解されるであろう。

20

【実施例】

【0251】

(実施例1)

受容体融合タンパク質バリエーションの作製

T R I I E C Dバリエーション

ヒトT R I Iの可溶性細胞外部分およびヒトFc部分を含むT R I I融合タンパク質を作製した。それぞれの融合タンパク質について、配列番号18のアミノ酸配列を有するT R I Iアミノ酸配列を、いくつかの異なるリンカーの1つによって、配列番号49のアミノ酸配列を有するI g G Fc部分と融合した。それぞれの融合タンパク質は、配列番号23のアミノ酸配列(下記)を有するT P Aリーダー配列も含んでいた。

30

【0252】

組織プラスミノーゲン活性化因子(TPA): M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V S P (配列番号23)

【0253】

いくつかの設計された構築物の実施例の概要を図3として提示する。例示項において試験された異なる構築物についての配列を詳述した表を下記に提示する。

40

50

【表 1】

構築物の名称	構築物のアミノ酸配列	リンカー配列
hTβRII-hFc	配列番号 9	TGGG (配列番号 3)
hTβRII (G4S)2-hFc	配列番号 15	TGGGSGGGGS (配列番号 4)
hTβRII (G4S)3-hFc	配列番号 11	TGGGSGGGSGGGGS (配列番号 5)
hTβRII (G4S)4-hFc	配列番号 13	TGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 6)
hTβRII extended hinge-hFc	配列番号 17	TGGGPKSCDK (配列番号 7)
hTβRII (G4S)5-hFc	配列番号 44	TGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 25)
hTβRII (G4S)6-hFc	配列番号 45	TGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 26)

10

【0254】

構築物の成分についてのアミノ酸配列およびそれぞれの構築物を、これらの構築物を発現するために使用される核酸配列とともに、下記に提示する。

【化27】

20

TβRII 部分 :アミノ酸配列

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEYNTSN PD (配列番号 18)

Fc 部分 :アミノ酸配列

1 THTCPPEPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFL
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLP GK (配列番号 49)

30

hTβRII-hFc: 核酸配列

1 ATGATGCAA TGAAGAGAG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
 101 ATGTGGAAAT GGAGGCCAG AAAGATGAAA TCATCTGCCC CAGCTGTAAT
 151 AGGACTGCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
 201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAAC GTGTAAATTT TGTGATGTGA
 251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
 301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
 351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
 401 CCTACCATGA CTTTATCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
 451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
 501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
 551 ATCTGACAC CGGTGGTGA ACTCACACAT GCCCACCGTG CCCAGCACCT
 601 GAACTCCTGG GGGGACGTC AGTCTTCTC TCCCCCAA AACCAAGGA
 651 CACCCTCATG ATCTCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGAGC

40

50

【化 2 8】

```

701 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGITCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
751 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC
801 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG
851 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCCATC
901 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAAAC CACAGGTGTA
951 CACCCCTGCC CCATCCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1001 CCTGCCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
1051 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGGA
1101 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTATAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA
1151 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
1201 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCGG GTAATGA (

```

配列番号 8)

10

hTβRII-hFc: アミノ酸配列

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
51 RTAHLPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
101 TSICEKPQEV CVAVWRKND E NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
151 KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSE EY NTSNPDITGGG THTCP PCPAP
201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTP E VTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
251 EVHNAKT KPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKKEYKCK VSNKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVY TLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
351 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
401 HNHYTQKSL S LSPGK (配列番号 9)

```

20

【0 2 5 5】

下記に記載の動物実験のために、配列番号 9 のマウスバージョンを、ヒト T R I I のアイソフォーム A に対応する T R I I のマウス細胞外ドメインを、リンカードメイン (T G G G) を介してマウス G 1 F c に融合することによって、作製した。この融合タンパク質は、本明細書において m T R I I - m F c という。

【0 2 5 6】

【化 2 9】

hTβRII (G4S)3-hFc: 核酸配列

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 ATGTGGA AAT GGAGGCC CAG AAAGATGAAA TCATCTGCCC CAGCTGTAAT
151 AGGACTGCCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACA ACT GTGTAAATTT TGTGATGTGA
251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
401 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
551 ATCCTGACAC CGGTGGTGGA GGAAGTGGTG GAGGTGGTTC TGGAGGTGGT
601 GGAAGTACTC ACACATGCC CACCGTGCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG
651 ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCC AAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
701 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
751 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC
801 CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA
851 GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
901 TGCAAGGTCT CCAACAAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC
951 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
1001 CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAA
1051 GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC

```

30

40

50

【化 3 0】

1101 GGAGAACAAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT
 1151 TCTTCTCTA TAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
 1201 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
 1251 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA (配列番号 10)

hTβRII (G4S)3-hFc: アミノ酸配列

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
 51 RTAHLRHRIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
 101 TSICEKPQEV CVAVWRKND E NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
 151 KEKKKPGETF FMCSCSSEDEC NDNIIFSE EY NTSNPDTGGG GSGGGGSGGG
 201 GSTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 251 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 301 CKVSNKALPA PIEKTIISKAK GQPREPQVY T LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
 351 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 401 NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (配列番号 11)

10

hTβRII (G4S)4-hFc: 核酸配列

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGCGC CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
 101 ATGTGGAAAT GGAGGCCAG AAAGATGAAA TCATCTGCC CAGCTGTAAT
 151 AGGACTGCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
 201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAAC TGTGTAATTT TGTGATGTGA
 251 GATTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
 301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
 351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
 401 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
 451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
 501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
 551 ATCCTGACAC CGGTGGTGGG GGTCTGGAG GTGGAGGAAG TGGTGGAGGT
 601 GGTCTGGAG GTGGTGGAG TACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCACC
 651 TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCAAGG
 701 ACACCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGTGGAC
 751 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT
 801 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCCGG GGAGGAGCAG TACAACAGCA
 851 CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT
 901 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCAT
 951 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT
 1001 ACACCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTACGCTG
 1051 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
 1101 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCCT CCCGTGCTGG
 1151 ACTCCGACGG CTCTTCTTC CTCTATAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC
 1201 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
 1251 GCACAACCAC TACACGAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGA

20

(配列番号 12)

hTβRII (G4S)4-hFc: アミノ酸配列

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
 51 RTAHLRHRIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
 101 TSICEKPQEV CVAVWRKND E NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
 151 KEKKKPGETF FMCSCSSEDEC NDNIIFSE EY NTSNPDTGGG GSGGGGSGGG
 201 GSGGGGSTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 251 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 301 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 351 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTF PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS

40

【化 3 1】

401 RWQQGNVFSV SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK (配列番号 13)

hTβRII (G4S)4-hFc: リーダー配列を欠くアミノ酸配列

1 GATIPPHVQK SDVEMEAQKD EIICPSCNRT AHPLRHINND MIVTDNNGAV
 51 KFPQLCKFCD VRFSTCDNQK SCMSNCSITS ICEKPQEVCV AVWRKNDENI
 101 TLETVCHDPK LPYHDFILED AASPKCIMKE KKKPGETFFM CSCSSDECND
 151 NIIFSEEYNT SNPDTGGGGS GGGSGGGGS GGGGSTHTCP PCPAPELLGG
 201 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
 251 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
 301 KAKQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
 351 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSV MHEALHNNHYT
 401 QKSLSLSPGK (配列番号 63)

10

hTβRII (G4S)4-hFc: リーダー配列を欠き、hTβ RII部分の前の
グリシンを欠く、アミノ酸配列

1 ATIPPHVQKS DVEMEAQKDE IICPSCNRTA HPLRHINNDM IVTDNNGAVK
 51 FPQLCKFCDV RFSTCDNQKS CMSNCSITSI CEKPQEVCA VWRKNDENIT
 101 LETVCHDPKL PYHDFILED ASPKCIMKEK KKPGETFFMC SCSSDECNDN
 151 IIFSEEYNTS NPDTGGGGSG GGGSGGGSG GGGSTHTCPP CPAPELLGGP
 201 SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 251 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 301 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 351 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSV SVM HEALHNNHYTQ
 401 KSLSLSPGK (配列番号 64)

20

hTβRII (G4S)4-hFc: リーダー配列を欠き、hTβ RII部分の前の
グリシン、アラニンおよびトレオニンを欠く、アミノ酸配列

1 IPPHVQKSDV EMEAQKDEII CPSCNRTAHP LRHINNDMIV TDNNGAVKFP
 51 QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE KPQEVCAVWR RKNDENITL
 101 TVCHDPKLPY HDFILED AASP KCIMKEKKK PGETFFMCSS SDECNDNIIF
 151 FSEYNTSNP DTGGGGSGGG GSGGGSGGG GSTHTCPPCP APELLGGPSV
 201 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 251 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 301 QPREPQVYTL LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 351 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNNHYTQKS
 401 LSLSPGK (配列番号 65)

30

hTβRII (G4S)4-hFc: リーダー配列を欠き、hTβ RII部分の前の
グリシン、アラニン、トレオニンおよびイソロイシンを欠く、アミノ酸配列

1 PPHVQKSDVE MEAQKDEIIC PSCNRTAHPL RHINNDMIVT DNNGAVKFPQ
 51 LCKFCDVRF S TCDNQKSCMS NCSITSICEK PQEVCAVWR KNDENITLET
 101 VCHDPKLPYH DFILED AASP KCIMKEKKK GETFFMCSS SDECNDNIIF
 151 SEEYNTSNPD TGGGGSGGG SGGGGSGGG STHTCPPCPA PELLGGPSVF
 201 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 251 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYK KVSNAKALPA IEKTISKAKG
 301 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 351 KTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSVMSVMHEA LNNHYTQKSL
 401 SLSPGK (配列番号 66)

40

50

【化 3 2】

hTβRII (G4S)4-hFc: リーダー配列を欠き、hTβRII部分の前のグリシン、アラニン、
トレオニン、イソロイシンおよびプロリンを欠く、アミノ酸配列

```

1   PHVQKSDVEM EAQKDEIICP SCNRTAHPLR HINNDMIVTD NNGAVKFPQL
51  CKFCDVRFST CDNQKSCMSN CSITSICEKP QEVCAVAVWRK NDEKITLETV
101 CHDPKLPYHD FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFFMCSCSS DECNDNIIFS
151 EEYNTSNPDT GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS THTCPPCPAP ELLGGPSVFL
201 FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
251 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
301 PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
351 TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL
401 LSPGK ( 配列番号 67)

```

10

hTβRII (G4S)4-hFc: リーダー配列を欠き、hTβRII部分の前のグリシン、アラニン、
トレオニン、イソロイシン、プロリンおよびプロリンを欠く、アミノ酸配列

```

1   HVQKSDVEME AQKDEIICPS CNRTAHPLRH INNDMIVTDN NGAVKFPQLC
51  KFCDFVRFSTC DNQKSCMSNC SITSICEKPQ EVCVAVWRKN DENITLETVC
101 HDPKLPYHDF ILEDAASPKC IMKEKKKPGF TFFMCSCSSD ECNDNIIFSE
151 EYNTSNPDTG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF
201 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
251 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
301 REPQVYTLFP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
351 TPPVLDSDGS FFLYSKLTV DKSRRWQQGNV SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
401 SPGK ( 配列番号 68)

```

20

hTβRII (G4S)2-hFc: 核酸配列

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
101 ATGTGGAAT GGAGGCCAG AAAGATGAAA TCATCTGCCC CAGCTGTAAT
151 AGGACTGCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTACTGA
201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAAC GIGTAAATTT TGTGATGIGA
251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
401 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
551 ATCCTGACAC CGGTGGAGGT GGTTCGGAG GTGGTGGAAG TACTCACACA
601 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCTC
651 CTTCCCCCA AAACCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG
701 TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC
751 AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG
801 GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC
851 TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
901 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA
951 GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA
1001 CCAAGAACCA GGTGAGCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC
1051 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA
1101 GACCACGCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTATAGCA
1151 AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
1201 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC
1251 CCTGTCTCCG GGTAAATGA ( 配列番号 14)

```

30

40

【化 3 3】

hTβRII (G4S)2-hFc: アミノ酸配列

1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHLPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM
151	KEKKKPGETF	FMCSCSSDEC	NDNIIFSEBY	NTSNPDTGGG	GSAGGGSTHT
201	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF
251	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN
301	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS
351	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGSEFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC
401	SVMHEALHNNH	YTQKLSLSLP	GK (配列番号	15)	

hTβRII 拡張ヒンジ -*hFc*: 核酸配列

1	ATGGATGCAA	TGAAGAGAGG	GCTCTGCTGT	GTGCTGCTGC	TGTGTGGAGC
51	AGTCTTCGTT	TCGCCCCGGC	CCACGATCCC	ACCGCACGTT	CAGAAGTCGG
101	ATGTGGAAAT	GGAGGCCCAG	AAAGATGAAA	TCATCTGCC	CAGCTGTAAT
151	AGGACTGCCC	ATCCACTGAG	ACATATTAAT	AACGACATGA	TAGTCACTGA
201	CAACAACGGT	GCAGTCAAGT	TCCACAAC	GTGTAATTT	TGTGATGTGA
251	GATTTTCCAC	CTGTGACAAC	CAGAAATCCT	GCATGAGCAA	CTGCAGCATC
301	ACCTCCATCT	GTGAGAAGCC	ACAGGAAGTC	TGTGTGGCTG	TATGGAGAAA
351	GAATGACGAG	AACATAACAC	TAGAGACAGT	TTGCCATGAC	CCCAAGCTCC
401	CCTACCATGA	CTTTATTCTG	GAAGATGCTG	CTTCTCCAAA	GTGCATTATG
451	AAGGAAAAAA	AAAAGCCTGG	TGAGACTTTC	TTCATGTGTT	CCTGTAGCTC
501	TGATGAGTGC	AATGACAACA	TCATCTTCTC	AGAAGAATAT	AACACCAGCA
551	ATCCTGACAC	CGGTGGTGG	CCCAAATCTT	GTGACAAAAAC	TCACACATGC
601	CCACCGTGCC	CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG	GGACCGTCAG	TCTTCCTCTT
651	CCCCCAAAA	CCAAGGACA	CCCTCATGAT	CTCCCGACC	CCTGAGGTCA
701	CATGCGTGGT	GGTGGACGTG	AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTTCAAC
751	TGGTACGTGG	ACGGCGTGG	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA
801	GGAGCAGTAC	AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCTC	ACCGTCTTGC
851	ACCAGGACTG	GCTGAATGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA
901	GCCCTCCAG	CCCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAGCCA	AAGGGCAGCC
951	CCGAGAACCA	CAGGTGTACA	CCCTGCCCC	ATCCCGGGAG	GAGATGACCA
1001	AGAACCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	TCCAGCGGAC
1051	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGGAGAACA	ACTACAAGAC
1101	CAGGCTCCC	GTGCTGGACT	CCGACGGCTC	CTTCTCTCTC	TATAGCAAGC
1151	TCACCGTGG	CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC
1201	GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAAGA	GCCTCTCCCT
1251	GTCCCCGGGT	AAATGA (配列番号	16)		

hTβRII 拡張ヒンジ -*hFc*: アミノ酸配列

1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHLPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM
151	KEKKKPGETF	FMCSCSSDEC	NDNIIFSEBY	NTSNPDTGGG	PKSCDKTHTC
201	PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	KPKDTLMISR	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN
251	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK
301	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD
351	IAVEWESNGQ	PENNYKTPP	VLDSGSEFFL	YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS
401	VMHEALHNNH	TQKLSLSLSP	K (配列番号	17)	

hTβRII (G4S)5-hFc: アミノ酸配列

1	MDAMKRGLCC	VLLLCGAVFV	SPGATIPPHV	QKSDVEMEAQ	KDEIICPSCN
51	RTAHLPLRHIN	NDMIVTDNNG	AVKFPQLCKF	CDVRFSTCDN	QKSCMSNCSI
101	TSICEKPQEV	CVAVWRKNDE	NITLETVCHD	PKLPYHDFIL	EDAASPKCIM

10

20

30

40

50

【化 3 4】

151 KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEEY NTSNPDTGGG GSGGGGSGGG
 201 GSGGGGSGGG GSTHTCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
 251 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
 301 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 351 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 401 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (配列番号 44)

hTβRII (G4S)6-hFc: アミノ酸配列

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGATIPPHV QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN
 51 RTAHLPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI
 101 TSICEKPEQEV CVAVWRKND E NITLETVCHD PKLPYHDFIL EDAASPKCIM
 151 KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEEY NTSNPDTGGG GSGGGGSGGG
 201 GSGGGGSGGG GSGGGGSTHT CPPCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 251 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWFYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 301 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
 351 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP VLDSGDSFF
 401 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTKSLSLSP GK (配列番号
 45)

10

20

hTβRII (G4S)5-hFc: ヌクレオチド配列

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
 101 ATGTGGAAAT GGAGGCCCCAG AAAGATGAAA TCATCTGCCC CAGCTGTAAT
 151 AGGACTGCCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
 201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAAC GTGTAATTT TGTGATGTGA
 251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
 301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
 351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
 401 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATTATG
 451 AAGGAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
 501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
 551 ATCCTGACAC CGGTGGAGGA GGTTCTGGTG GTGGAGGTTT TGGAGGTGGA
 601 GGAAGTGGTG GAGGTGGTTC TGGAGGTGGT GGAAGTACTC ACACATGCCC
 651 ACCCTGCCCA CCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGT TTCCTCTTCC
 701 CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCAACA
 751 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTCAACTG
 801 GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
 851 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC
 901 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
 951 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC
 1001 GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG
 1051 AACCAGGTCA GCCTGACCCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
 1101 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
 1151 CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA TAGCAAGCTC
 1201 ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGCTTCT CATGCTCCGT
 1251 GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT
 1301 CTCCGGGTAA ATGA (配列番号 46)

30

40

hTβRII (G4S)6-hFc: ヌクレオチド配列

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCACGATCCC ACCGCACGTT CAGAAGTCGG
 101 ATGTGGAAAT GGAGGCCCCAG AAAGATGAAA TCATCTGCCC CAGCTGTAAT
 151 AGGACTGCCC ATCCACTGAG ACATATTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
 201 CAACAACGGT GCAGTCAAGT TTCCACAAC GTGTAATTT TGTGATGTGA
 251 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC

50

【化 3 5】

```

301 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
351 GAATGACGAG AACATAACAC TAGAGACAGT TTGCCATGAC CCCAAGCTCC
401 CCTACCATGA CTTTATTC TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
451 AAGGAAAAAAA AAAAGCCTGG TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
501 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC AGAAGAATAT AACACCAGCA
551 ATCCTGACAC CGGTGGAGGT GGAAGTGGTG GAGGAGGTTT TGGTGGTGA
601 GGTCTCGGAG GTGGAGGAAG TGGTGGAGGT GGTCTCGGAG GTGGTGGAA
651 TACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGGGGACCGT
701 CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG
751 ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA
801 GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA
851 CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
901 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA
951 GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG
1001 CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG
1051 GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT
1101 CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA
1151 ACAACTACAA GACCACGCTT CCGGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
1201 CTCTATAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT
1251 CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA
1301 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGA (配列番号 47)

```

10

【0 2 5 7】

様々な構築物は、CHO細胞中で成功裏に発現され、分析的なサイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによって決定されるように、高純度に精製された。hT R I I (G 4 S) 2 - h F c、hT R I I (G 4 S) 3 - h F c、hT R I I (G 4 S) 4 - h F c、hT R I I (G 4 S) 5 - h F cおよびhT R I I (G 4 S) 6 - h F cタンパク質は、37 で13日間PBS中で保持された場合に、SDS-PAGE分析によって決定される同様の強い安定性を示した。hT R I I (G 4 S) 2 - h F c、hT R I I (G 4 S) 3 - h F c、hT R I I (G 4 S) 4 - h F cタンパク質は、ラット、マウスまたはヒト血清中でも保持され、同様の強い安定性を示した。

T R I I E C Dバリエーション

【0 2 5 8】

上記に記載の融合タンパク質（例えば、配列番号18）に含まれるT R I Iドメインに加えて、本開示は、代替のT R I Iドメインを含む融合タンパク質も企図する。例えば、融合タンパク質は、下記に示す野生型hT R I I_{short}(23~159)配列(配列番号27)、または下記に開示する任意の他のT R I Iポリペプチドを含んでいてもよい。

【化 3 6】

```

1 TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
51 ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPKCI
101 MKEKKKPGET FFMCSRSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPD (配列番号
27)

```

40

【0 2 5 9】

(1) 下記に示すhT R I I_{short}(23~159/D110K)アミノ酸配列(配列番号36)、ここで、置換された残基に下線を引いている。

50

【化37】

1 TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
 51 ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHKFI LEDAASPCCI
 101 MKEKKKPGET FFMCS^SSSDE CNDNIIFSEE YNTSNPD (配列番号
 36)

【0260】

(2) 下記に示すN末端で切断されたhT R I I s h o r t (2 9 ~ 1 5 9) アミノ酸配列 (配列番号28)。

【化38】

1 QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
 51 KPQEV^CVA^VWRKNDENITL TVCHDPKLPY HDFILED^AAAS PKCIMKEKKK
 101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEEYNTSNP D (配列番号 28)

【0261】

(3) 下記に示すN末端で切断されたhT R I I s h o r t (3 5 ~ 1 5 9) アミノ酸配列 (配列番号29)。

【化39】

1 DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV^C
 51 VAVWRKNDEN ITLETVCHDP KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF
 101 MCSCSSDECN DNIIFSEEYN TSNPD (配列番号 29)

【0262】

(4) 下記に示すC末端で切断されたhT R I I s h o r t (2 3 ~ 1 5 3) アミノ酸配列 (配列番号30)。

【化40】

1 TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS
 51 ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPCCI
 101 MKEKKKPGET FFMCS^SSSDE CNDNIIFSEE Y (配列番号 30)

【0263】

(5) 下記に示すC末端で切断されたhT R I I s h o r t (2 3 ~ 1 5 3 / N 7 0 D) アミノ酸配列 (配列番号38)、ここで、置換された残基に下線を引いている。

【化41】

1 TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSDCS
 51 ITSICEKPQE VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPCCI
 101 MKEKKKPGET FFMCS^SSSDE CNDNIIFSEE Y (配列番号 38)

【0264】

出願人はまた、上記および下記に示す野生型hT R I I l o n g (2 3 ~ 1 8 4) 配列 (配列番号20) に基づいて、対応する5つのバリエーション (配列番号37、33、34、39) も構想し、ここで、25アミノ酸の挿入に下線を引いている。スプライシングが、挿入に隣接するC末端位での保存的アミノ酸置換 (Val Ile) をもたらすことに留意されたい。

10

20

30

40

50

【化42】

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEYNTSN PD (配列番号 20)

【0265】

(1) 下記に示す hT R I I l o n g (2 3 ~ 1 8 4 / D 1 3 5 K) アミノ酸配列 (配列番号 37)、ここで、置換された残基に二重下線を引いている。

10

【化43】

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHKFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEYNTSN PD (配列番号 37)

【0266】

(2) 下記に示す N 末端で切断された hT R I I l o n g (2 9 ~ 1 8 4) アミノ酸配列 (配列番号 33)。

20

【化44】

1 QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF
 51 CDVRFSTCDN QKSCMSNCI TSICEKPQEV CAVWRKNDE NITLETVCHD
 101 PKLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF FMCSCSSDEC NDNIIFSEY
 151 NTSNPD (配列番号 33)

【0267】

(3) 下記に示す N 末端で切断された hT R I I l o n g (6 0 ~ 1 8 4) アミノ酸配列 (配列番号 29 と同じ)。

30

【化45】

1 DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCIT SICEKPQEV
 51 VAVWRKNDE ITLETVCHD KLPYHDFILE DAASPKCIM EKKKPGETFF
 101 MCSCSSDECN DNIIIFSEYN TSNPD (配列番号 29 と同一)

【0268】

(4) 下記に示す C 末端で切断された hT R I I l o n g (2 3 ~ 1 7 8) アミノ酸配列 (配列番号 34)。

【化46】

40

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF
 51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSNCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEY (配列番号 34)

【0269】

(5) 下記に示す C 末端で切断された hT R I I l o n g (2 3 ~ 1 7 8 / N 9 5 D) アミノ酸配列 (配列番号 39)、ここで、置換された残基に二重下線を引いている。

50

【化47】

1 TIPPHVQKSD VEMEAQKDEI ICPSCNRTAH PLRHINNDMI VTDNNGAVKF

【化48】

51 PQLCKFCDVR FSTCDNQKSC MSDCSITSIC EKPQEVCAV WRKNDENITL
 101 ETVCHDPKLP YHDFILEDAA SPKCIMKEKK KPGETFFMCS CSSDECNDNI
 151 IFSEEY (配列番号 39)

【0270】

10

追加のT R I I E C Dバリエーションとしては、以下が挙げられる。

(A) 下記に示すNおよびC末端で切断されたhT R I I _{short} (35~153) またはhT R I I _{long} (60~178) アミノ酸配列 (配列番号32)。

【化49】

1 DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV
 51 VAVWRKNDEN ITLETVCHDP KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF
 101 MCSCSSDECN DNIIFSEEY (配列番号 32)

【0271】

20

(B) 下記に示すNおよびC末端で切断されたhT R I I _{short} (29~153) アミノ酸配列 (配列番号31)。

【化50】

1 QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
 51 KPQEVCAVAV RKNDENITL TVCHDPKLPY HDFILEDAA S PKCIMKEKKK
 101 PGETFFMCS SCSSDECNDNII FSEEY (配列番号 31)

【0272】

(C) 下記に示すNおよびC末端で切断されたhT R I I _{long} (29~178) アミノ酸配列 (配列番号35)。

30

【化51】

1 QKSDVEMEAQ KDEIICPSCN RTAHPLRHIN NDMIVTDNNG AVKFPQLCKF
 51 CDVRFSTCDN QKSCMSNCSI TSICEKPQEV CAVAVWRKNDE NITLETVCHD
 101 PKLPYHDFIL EDAASPKCIM KEKKKPGETF FMCS SCSSDEC NDNIIFSEEY
 (配列番号 35)

【0273】

上記のバリエーション (配列番号36、28、29、30、38、37、33、34、39、32、31および35) のいずれかは、hT R I I アイソフォームCにおいて天然に存在するように (Konrad et al., BMC Genomics 8:318, 2007)、hT R I I E C DのC末端の近くに位置するグルタミン酸残基の対 (配列番号1の151位および152位、または配列番号2の176位および177位) の間の36アミノ酸 (配列番号41) の挿入を組み込むことができた。

40

【化52】

GRCKIRHIGS NNRLQRSTCQ NTGWESAHVM KTPGFR (配列番号 41)

【0274】

50

例として、任意の挿入部位に隣接する対のグルタミン酸残基を、hT R I I s h o r t (2 9 ~ 1 5 9) バリエーション (配列番号 2 8) について、下記に表す (下線)。

【化 5 3】

```

1  QKSVNNDMIV TDNNGAVKFP QLCKFCDVRF STCDNQKSCM SNCSITSICE
51  KPQEVCAVAV RKNDENITILE TVCHDPKLPY HDFILEDAAAS PKCIMKEKKK
101 PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEEYNTSNP D ( 配列番号 28)

```

Fcドメインバリエーション

【0275】

上記に記載の構築物を、配列番号49のアミノ酸配列を有するFcドメインを用いて作製したが、本開示は、ヒトIgG2 Fcドメイン (配列番号42、下記) または全長ヒトIgG1 Fc (hG1Fc) (配列番号43、下記) を含む、代替Fcドメインを含むhT R I I - hFc融合タンパク質を企図する。必要に応じて、Fcドメインと無関係のポリペプチドを、Fcドメインの場所に付着させることができた。

【化 5 4】

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK ( 配列番号 42)

```

```

1  GPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
51  DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL
101 NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS
151 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGDSF FLYSKLTVDK
201 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK ( 配列番号 43)

```

リーダー配列バリエーション

【0276】

上記に記載の作製された構築物は、TPAリーダー配列を含んでいたが、天然のリーダー配列 (配列番号22、下記) またはミツバチメリチン (配列番号24、下記) のリーダー配列などの代替リーダー配列を使用し得る。

【化 5 5】

天然 : MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAS (配列番号 22)

ミツバチメリチン (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (配列番号 24)

(実施例 2)

細胞に基づくアッセイにおける受容体融合タンパク質バリエーションによる分化リガンド阻害

【0277】

hT R I I (G 4 S) 2 - hFc、hT R I I (G 4 S) 3 - hFc、hT R I I (G 4 S) 4 - hFc、hT R I I - hFcおよびhT R I I 拡張ヒンジ - hFcタンパク質に対するTGF β 1、TGF β 2ならびにTGF β 3の親和性を、Biacore (商標) 装置により*in vitro*で評価し、結果を図4Aおよび4Bにまとめる。それぞれの融合タンパク質は、高親和性でTGF β 1およびTGF β 3に結合する能力があったが、(G 4 S) 4より長いか、または(G 4 S) 4と同じ長さのリンカーを有する構築物は、驚くべきことに、(G 4 S) 4より短い長さのリンカーを有する構築物より

10

20

30

40

50

も、高親和性でTGF β 1およびTGF β 3の両方に結合する能力があった。TGF β 2およびいずれかの構築物の間の結合は、低いか、または一過性であった。構築物の脱グリコシル化は、結合を変化させなかった。

【0278】

A549細胞におけるレポーター遺伝子アッセイを使用して、TGF β 1、TGF β 2およびTGF β 3の活性を阻害するhT β RII-hFcバリアントの能力を決定した。このアッセイは、pGL3(CAGA)12レポータープラスミド(Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100)、およびトランスフェクト効率について制御するためのRenillaレポータープラスミド(pRLCMV)でトランスフェクトされたヒト肺癌細胞系に基づく。CAGAモチーフは、TGF β 応答遺伝子(例えば、PAI-1)のプロモーター中に存在し、そのため、このベクターは、一般に、SMAD2およびSMAD3を介してシグナル伝達する因子のために使用される。

10

【0279】

アッセイの初日に、A549細胞(ATCC(登録商標):CCL-185(商標))を48ウェルプレートに分配した。2日目に、pGL3(CAGA)12、pRLCMV、X-tremeGENE 9(Roche Applied Science)およびOptiMEM(Invitrogen)を含有する溶液をプレインキュベートし、次いで、0.1%のBSAで補充されたEagle最小必須培地(EMEM、ATCC(登録商標))に添加し、これを、37 $^{\circ}$ C、5%のCO $_2$ で終夜、インキュベーションのために、蒔かれた細胞に適用した。3日目に、培地を除去し、細胞を、下記に記載のようにして調製されたリガンドおよび阻害剤の混合物とともに、37 $^{\circ}$ C、5%のCO $_2$ で終夜インキュベートした。

20

【0280】

被験物質の連続希釈を、アッセイ緩衝液(EMEM+0.1%のBSA)中、48ウェルプレートで行った。試験リガンドを含有する等体積のアッセイ緩衝液を添加して、以前に決定されたEC50と等しい最終リガンド濃度を得た。ヒトTGF β 1、ヒトTGF β 2およびヒトTGF β 3は、PeproTechから入手した。試験溶液を、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、次いで、混合物の一部をすべてのウェルに添加した。試験溶液との終夜のインキュベートの後、細胞をリン酸緩衝食塩水ですすぎ、次いで、passively lysis 緩衝液(Promega E1941)で溶解し、-70 $^{\circ}$ Cで終夜保管した。4日目および最終日に、プレートを穏やかに振とうしながら室温に温めた。細胞溶解物を二反復で化学発光プレート(96ウェル)に移し、Dual-Luciferase Reporterアッセイシステム(Promega E1980)からの試薬を用いて発光光度計で分析して、正規化されたルシフェラーゼ活性を決定した。

30

【0281】

図5A~5Fにおいて示されるように、hT β RII(G4S)2-hFc、hT β RII(G4S)3-hFc、hT β RII(G4S)4-hFc、hT β RII(G4S)5-hFc、hT β RII(G4S)6-hFc、hT β RII-hFcおよびhT β RII拡張ヒンジ-hFcタンパク質はすべて、TGF β 1およびTGF β 3の両方を阻害する能力があった。興味深いことに、改善されたTGF β 1およびTGF β 3阻害とhT β RII(G4S)2-hFc、hT β RII(G4S)3-hFcおよびhT β RII(G4S)4-hFc構築物についてのリンカーの長さの間に相関が存在したが(図5E)、この改善傾向は、hT β RII(G4S)5-hFcおよびhT β RII(G4S)6-hFc構築物について、プラトーになったように見えた(図5F)。

40

(実施例3)

異所性骨化動物モデルにおけるT β RII-hFcの効果

【0282】

異所性骨化(HO)は、一般に重度の外傷、火傷の後に起こり得、先天性疾患の進行性骨化性線維形成異常症(FOP)の衰弱の帰結である。病因は、十分に理解されていないままであり、しかしながら、炎症は、HOの発生部位に動員されるいくつかの炎症細胞の

50

種類とともに重要な役割を果たしている」と推定される。HOの進行における上記に記載の mT R I I - m F c の効果を、HO動物モデルを使用して検討した。

【0283】

動員されたマクロファージは、炎症微小環境に影響を与えるサイトカインの公知の起源である。したがって、培養マクロファージにおける T G F 1 の分泌を最初に評価した。骨髄由来マクロファージを分離し、M2表現型に *in vitro* で分極させた。分泌された T G F 1 を、E L I S A を使用して条件培地中で測定した。興味深いことに、M0マクロファージは、最小限の T G F 1 のみを分泌するが、HOにおける骨沈着の部位で起こるものなどの炎症部位に動員されることが公知の再生M2マクロファージは、T G F 1 分泌において500倍の増加であることが観察された。さらにまた、T G F 1 分泌における増加は、mT R I I - m F c (5 . 4 4 μ g / m l) が培養培地中に存在する場合、完全に無効化された(図6A)。

10

【0284】

次に、全身投与された mT R I I - m F c の効果を、30%の背面の熱傷およびアキレス腱切除術を含む外傷性異所性骨化のモデルで観察した。Agarwal et al. (2016) Proc Natl Acad Sci USA 113(3): E338-347。6週齢の雄性 C 5 7 B L / 6 マウスをHOについて誘導し、次いで、1) mT R I I - m F c (1 0 m g / k g) による処置 (n = 1 0) または 2) P B S 対照 (n = 1 0) の 2 つの処置群の 1 つに無作為化した。これに、週に2回、3週間、皮下投与した。3週目に、組織学試料を収集し、脱灰し、サフランinOで染色して、HO原基の形成を評価した。成熟型HOの体積を、9週目に、マイクロCT分析および画像再構成を使用して、定量化した。3週間の処置の後、mT R I I - m F c で処置されたマウスにおける実質的に減弱されたHO原基の発生を、骨沈着および骨髄腔の形成の減少とともに、組織学的実験の際に観察した(図6B)。さらにまた、成熟HOの体積は、mT R I I - m F c 処置群において顕著に減少した(図6C)。

20

【0285】

この研究において、T G F 1 シグナル伝達が、HO形成において重要な役割を果たし、mT R I I - m F c による処置が、異所性骨沈着の減弱において有効であり、したがって、HOの体積の減少をもたらすことを実証した。したがって、これらのデータは、T R I I ポリペプチドおよび他の T G F 1 アンタゴニストがHOを処置するために使用され得ることを示唆し、ヒト患者におけるこの状態の処置のための新たな手段を明らかにする。

30

参照による組み込み

【0286】

本明細書において言及されたすべての刊行物および特許は、各個の刊行物または特許が、参照により本明細書に組み込まれると具体的かつ個々に示されている場合のように、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0287】

主題の特定の実施形態を説明してきたが、上記の明細書は例示的なものであって、限定的なものではない。多くの改変は、本明細書および下記の特許請求の範囲の検討の際に、当業者に明らかになるであろう。本発明の全範囲は、特許請求の範囲を均等物のその全範囲と一緒に参照し、本明細書をこのような変形と一緒に参照することによって、決定されるべきである。

40

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

有効量の形質転換成長因子 - (T G F 1) アンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、異所性骨化 (H O) を処置するための方法。

(項目2)

前記異所性骨化が、脊髄損傷、外傷、脳損傷、熱傷、骨折、筋肉挫傷、関節形成術/関節置換術、股関節手術/人工股関節置換術、寛骨臼手術/寛骨臼置換術、肘の骨折、下腿

50

の長骨の骨折、戦闘関連外傷、肢切断、成人の呼吸促迫症候群を管理するために使用される神経筋遮断、非外傷性脊髄症からなる群から選択される1つもしくは複数の障害または状態と関連する、項目1に記載の方法。

(項目3)

有効量のTGFアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、進行性骨化性線維異形成症(FOP)を処置するための方法。

(項目4)

有効量のTGFアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、進行性骨性異形成症(POH)を処置するための方法。

(項目5)

有効量のTGFアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、線維性骨異形成症を処置するための方法。

(項目6)

関節拘縮、関節強直、疼痛、痙縮、腫脹の発熱、神経血管圧迫症候群および褥瘡からなる群から選択されるHOの1つまたは複数の合併症の重症度または期間を予防または低減する、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目7)

前記患者における異所性骨化の重症度または期間を予防または低減する、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目8)

前記異所性骨化が、骨、皮膚、皮下組織、骨格筋、関節の近傍の線維症組織、血管壁および靭帯からなる群から選択される1つまたは複数の組織で起こる、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目9)

異所性骨化、FOP、POHまたは線維性骨異形成症を処置するための追加の活性薬剤または支持療法の投与をさらに含む、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目10)

異所性骨化、FOP、POHまたは線維性骨異形成症を処置するための前記追加の活性薬剤または支持療法が、イソトレチノイン、エチドロネートと経口コルチコステロイド、マレイン酸ペルヘキシリン、ALK2低分子阻害剤、パロパロテン、レチノイン酸受容体ガンマアゴニスト、レチノイン酸受容体アルファアゴニスト、アクチビン抗体(例えば、REGN 2477などのアクチビンA抗体)、ALK2の対立遺伝子特異的RNA干渉、ビスホスホネート、放射線療法、抗炎症剤(例えば、インドメタシン、イブプロフェンおよびアスピリン)および他動可動域の訓練または他の可動化技術などの保存的処置からなる群から選択される、項目10に記載の方法。

(項目11)

前記追加の活性薬剤または支持療法が、アクチビンアンタゴニストによる処置である、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビン抗体である、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記アクチビン抗体が、アクチビンA抗体である、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記TGFアンタゴニストが、形質転換成長因子-受容体II(TRII)ポリペプチドである、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目15)

前記TRIIポリペプチドが、

a. 配列番号1の23~35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153~159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも75%同一のアミノ酸配列;および

b. 配列番号2の23~60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178~184位

10

20

30

40

50

のいずれか1つで終了する配列と少なくとも75%同一のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号1の23~35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153~159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目17)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号1の23~35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153~159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

10

(項目18)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号1の23~35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153~159位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目19)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号1の23~35位のいずれか1つで開始し、配列番号1の153~159位のいずれか1つで終了するアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目20)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号2の23~60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178~184位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

20

(項目21)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号2の23~60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178~184位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目22)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号2の23~60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178~184位のいずれか1つで終了する配列と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

30

(項目23)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号2の23~60位のいずれか1つで開始し、配列番号2の178~184位のいずれか1つで終了するアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目24)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号18と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目25)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号18と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

40

(項目26)

前記T RIIポリペプチドが、配列番号18のアミノ酸配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目27)

前記T RIIポリペプチドが、

a. T RII部分の細胞外ドメイン；および

b. 異種部分

を含む融合ポリペプチドであり、

前記T RII部分の細胞外ドメインが、

i) 配列番号1の23~35位のいずれかで開始し、配列番号1の153~159位のい

50

ずれかで終了する配列、または

i i) 配列番号 2 の 23 ~ 60 位のいずれかで開始し、配列番号 2 の 178 ~ 184 位のいずれかで終了する配列

と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列を含む、

項目 14 に記載の方法。

(項目 28)

前記 T R I I ポリペプチドが、配列番号 18 と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列を含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

前記 T R I I 部分の細胞外ドメインが、配列番号 1 の 23 ~ 35 位のいずれかで開始し、配列番号 1 の 153 ~ 159 位のいずれかで終了する配列と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列からなる、項目 27 に記載の方法。

10

(項目 30)

前記 T R I I 部分の細胞外ドメインが、配列番号 2 の 23 ~ 60 位のいずれかで開始し、配列番号 2 の 178 ~ 184 位のいずれかで終了する配列と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列からなる、項目 27 に記載の方法。

(項目 31)

前記 T R I I 部分の細胞外ドメインが、配列番号 18 と少なくとも 80 % 同一のアミノ酸配列からなる、項目 27 に記載の方法。

(項目 32)

前記異種部分が、免疫グロブリン F c ドメインである、項目 27 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 33)

前記免疫グロブリン F c ドメインが、ヒト免疫グロブリン F c ドメインである、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

前記異種部分が、配列番号 49 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 32 に記載の方法。

(項目 35)

前記異種部分が、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む、項目 32 に記載の方法。

30

(項目 36)

融合タンパク質が、リンカードメインをさらに含む、項目 27 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

前記リンカーが、10 ~ 25 アミノ酸長の間である、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記リンカーが、

a . (G G G G S)_n (式中、 n = 2) ;

b . (G G G G S)_n (式中、 n = 3) ;

c . (G G G G S)_n (式中、 n = 4) ; ならびに

d . 配列番号 4 ~ 7、19、21、25、26 および 40 のいずれか 1 つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 36 に記載の方法。

40

(項目 39)

前記リンカーが、(G G G G S)_n (式中、 n = 5) を含む、項目 36 に記載の方法。

(項目 40)

前記 T R I I ポリペプチドが、配列番号 11 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 14 に記載の方法。

(項目 41)

前記 T R I I ポリペプチドが、配列番号 13、65 または 68 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 14 に記載の方法。

50

(項目 4 2)

前記 T R I I ポリペプチドが、配列番号 1 5 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 1 8 5 ~ 5 9 2 を含まない、項目 1 4 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 2 2 を含まない、項目 1 4 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記 T R I I ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、および 1 0、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む T R I I ポリペプチド部分；

b) 配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、および 5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含むリンカー部分；

c) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列、および 2 5、2 0、1 5、1 0、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む異種部分；ならびに

c) 必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号 2 3）

からなるか、またはこれらから本質的になる、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記 T R I I ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列、および 1 0、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む T R I I ポリペプチド部分；

b) 配列番号 6 のアミノ酸配列、および 5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含むリンカー部分；

c) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列、および 2 5、2 0、1 5、1 0、5、4、3、2 または 1 以下の追加のアミノ酸を含む異種部分；ならびに

d) 必要に応じて、リーダー配列（例えば、配列番号 2 3）

からなるか、またはこれらから本質的になる、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記 T R I I ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 8 の配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、T R I I 部分の細胞外ドメイン；

b) 配列番号 4 9 の配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、異種部分；

c) 前記細胞外ドメインおよび前記異種部分を連結するリンカー部分であって、前記リンカーが、配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、リンカー部分

を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記 T R I I ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む、T R I I 部分の細胞外ドメイン；

b) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む、異種部分；

c) 前記細胞外ドメインおよび前記異種部分を連結するリンカー部分であって、前記リンカーが、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、リンカー部分

を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 4 9)

10

20

30

40

50

前記 T R I I ポリペプチドが、配列番号 4 8 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記 T R I I ポリペプチドが、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、リーダー配列を含まないか、または前記リーダー配列が、除去されている、項目 1 4 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、グリコシル化アミノ酸、ペグ化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、および脂質部分とコンジュゲートされたアミノ酸から選択される 1 つまたは複数の改変アミノ酸残基を含む、項目 1 4 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、グリコシル化される、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、C H O 細胞におけるポリペプチドの発現のグリコシル化パターン特性を有する、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、T G F 1 および T G F 3 に結合する、項目 1 4 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定される、T G F 1 および T G F 3 のシグナル伝達を阻害する、項目 1 4 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記 T R I I ポリペプチドまたは融合ポリペプチドが、ホモ二量体である、項目 1 4 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 8)

前記 T G F アンタゴニストが、T G F 1、T G F 2、T G F 3、T R I I、A L K 5 およびベータグリカンの 1 つもしくは複数に結合する抗体または抗体の組合せである、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記 T G F アンタゴニストが、T G F 1、T G F 2 および T G F 3 に結合する抗体または抗体の組合せである、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 0)

前記抗体が、フレソリムマブである、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記 T G F アンタゴニストが、T G F 1 および T G F 3 に結合する抗体または抗体の組合せであるが、前記抗体または抗体の組合せが、T G F 2 に結合しない、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記 T G F アンタゴニストが、T G F 1、T G F 2、T G F 3、T R I I、A L K 5 およびベータグリカンの 1 つもしくは複数に結合する低分子または低分子の組合せである、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記 T G F アンタゴニストが、T G F 1、T G F 2、T G F 3、T R I I、

10

20

30

40

50

ALK5 およびベータグリカンの1つもしくは複数を阻害するヌクレオチドまたはヌクレオチドの組合せである、項目1から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目64)

前記アクチビンアンタゴニストが、低分子またはヌクレオチドから選択される、項目11に記載の方法。

(項目65)

前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビンAを阻害する低分子またはヌクレオチドである、項目11に記載の方法。

(項目66)

有効量の形質転換成長因子 - (T G F) アンタゴニストおよびアクチビンアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、異所性骨化 (H O) を処置するための方法。

10

(項目67)

有効量の T G F アンタゴニストおよびアクチビンアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、進行性骨化性線維異形成症 (F O P) を処置するための方法。

(項目68)

有効量の T G F アンタゴニストおよびアクチビンアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、進行性骨性異形成症 (P O H) を処置するための方法。

(項目69)

有効量の T G F アンタゴニストおよびアクチビンアンタゴニストを必要な患者に投与することを含む、線維性骨異形成症を処置するための方法。

20

(項目70)

前記 T G F アンタゴニストが、項目14から63に定義されるいずれか1つに対応する、項目66から69のいずれか一項に記載の方法。

(項目71)

前記アクチビンアンタゴニストが、抗体、低分子またはヌクレオチドから選択される、項目66から69のいずれか一項に記載の方法。

(項目72)

前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビンAを阻害する、項目71に記載の方法。

(項目73)

前記 T G F アンタゴニストが、 T G F 1、 T G F 2 もしくは T G F 3 の1つまたは複数に結合する抗体であり、前記アクチビンアンタゴニストが、アクチビンに結合する抗体である、項目66から69のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目74)

前記 T G F 抗体が、 T G F 1、 T G F 2 および T G F 3 に結合する、項目73に記載の方法。

(項目75)

前記 T G F 抗体が、 T G F 1 および T G F 3 に結合するが、 T G F 2 に結合しないか、または T G F 2 に (例えば、少なくとも 1×10^{-7} M の K_D を超えて) 実質的に結合しない、項目73に記載の方法。

(項目76)

前記抗体が、アクチビンAに結合する、項目73から75のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目77)

前記 T G F アンタゴニストおよびアクチビンアンタゴニストが、 T G F 1、 T G F 3 およびアクチビンAに結合する多重特異性抗体である、項目66から69のいずれか一項に記載の方法。

(項目78)

前記 T G F アンタゴニストが、ベータグリカンポリペプチドである、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目79)

前記 T G F アンタゴニストが、 T R I I ポリペプチドおよび A L K 5 ポリペプチド

50

を含むヘテロ多量体である、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目 8 0)

前記 T G F アンタゴニストが、T R I I ポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチドを含むヘテロ多量体である、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目 8 1)

前記 T G F アンタゴニストが、A L K 5 ポリペプチドおよびベータグリカンポリペプチドを含むヘテロ多量体である、先行する項目のいずれかに記載の方法。

(項目 8 2)

前記ベータグリカンポリペプチドが、配列番号 5 1 もしくは 5 5 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 7 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物活性断片を含む、項目 8 0 または 8 1 に記載の方法。

10

(項目 8 3)

前記 A L K 5 ポリペプチドが、配列番号 7 0 もしくは 7 4 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 7 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列、またはこれらの生物活性断片を含む、項目 7 9 または 8 1 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記ヘテロ多量体が、ヘテロ二量体である、項目 7 9 から 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 図 面 】

20

【 図 1 】

```

1  mrgllrlglw plhivlwtri astipphvgk synndmiavd nngavkfpql
51  ckfcdvrfst cdngkscmsn csitsicekp gevavvrk ndenitlet
101 chdpklpyhd filedaaspk cimkekkpg etffmcscs decndniifs
151 eeyntsnpdlllvifqvtgi sllpplgvai sviiifycyr vnrqklsst
201 wetgktrklm efsehcaii eddrsdisst canninhnte llpieldtlv
251 gkgrfaevyk akkqntseq fetvavkifp yeeyaswkte kdifsdinlk
301 henilqflta eerktelgkq ywlitafhak gnlqeyltrh viswedlrkl
351 gsslargiah lhsdhtpcgr pkmpivhrdl kssnilvknd ltccldcfdgl
401 slrldptlsv ddiansgqvg tarymavevl esrmlenve sfkqtdvysm
451 alvlwemtsr cnavgevkdy eppfgskvre hpcvesmkdn vlrdgrpei
501 pswlnhqqi qmvcelttec wdhdpearlt aqcvaerfse lehldrlsgr
551 scseekiped gslnttk (配列番号 1)

```

【 図 2 】

```

1  mrgllrlglw plhivlwtri astipphvgk sdvemeaqkd eiicpncrnt
51  ahplrhiind miavdnngav kfpqckfcd vrfstcdngk scmsncsits
101 icekpgevavvrkndeni tletvchdpk lpyhdfiled aaspkcimke
151 kkkpgetffm cscsdecnd niifseeynt snpdlllvif qvtgisllpp
201 lgvaisviii fycyrvnrqk klsstwetgk trklmefseh caileddrs
251 disstcanni nhntellpie ldtlvkgkrf aevyaklkq ntseqfetva
301 vkifpyeeya swktekdifs dinlksenil qfltaeertk elgkqywlit
351 afhakgnlqe yltrhviswe dlrklgssla rgiahlsdh tpcgrpkmpi
401 vhrdlkssni lvkndltcccl cdfglslrld ptlsvddlan sgqvgtarym
451 apevlesrml lenvesfkqt dvysmalvlw emtsrcnavg evkdyepfpg
501 skvrehpcve smkdnvlrd grpeipsfwl nhqigmvce tltewdhdhp
551 earltaqcva erfselehld rlsgrscsee kipedgslnt tk (配列番号 2)

```

30

FIGURE 1

FIGURE 2

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/62 Z
 C 1 2 N 15/12
 A 6 1 K 45/00

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100172683

弁理士 綾 聡平

(74)代理人 100219265

弁理士 鈴木 崇大

(74)代理人 100203208

弁理士 小笠原 洋平

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 レヴィ, ベンジャミン

アメリカ合衆国 ミシガン 48109, アン アーバー, ヒューロン パークウェイ 1600,
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァシティ オブ ミシガン 気付

(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

(72)発明者 アガルワル, シャイレシュ

アメリカ合衆国 ミシガン 48109, アン アーバー, ヒューロン パークウェイ 1600,
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァシティ オブ ミシガン 気付

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第2017/070194(WO, A1)

国際公開第2016/164089(WO, A1)

特表2016-528295(JP, A)

国際公開第2016/164501(WO, A1)

Genetics and Molecular Research, 2015年, Vol.14, No.4, pp.19360-19370

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2014年, Vol.289, No.20, pp.14392-14398

Journal of Oral Biosciences , 2017年 , Vol.59 , pp.121-126

NATURE COMMUNICATIONS , 2018年02月07日 , Vol. 9, 551 , 13 pages

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K

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