

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-14207

(P2017-14207A)

(43) 公開日 平成29年1月19日 (2017. 1. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 19 O L 外国語出願 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-129498 (P2016-129498)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成28年6月30日 (2016. 6. 30)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2014-70238 (P2014-70238)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
	の分割		3 5
原出願日	平成22年4月23日 (2010. 4. 23)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	61/173, 004		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成21年4月27日 (2009. 4. 27)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	61/306, 137	(74) 代理人	100176094
(32) 優先日	平成22年2月19日 (2010. 2. 19)		弁理士 箱田 満
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		(72) 発明者	カトリン・ベルガー
			ドイツ82110ゲルメリング、クリーガ
			ーシュトラーセ72番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋肉増殖を増加させるための組成物および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 筋肉障害患者における筋肉量および強度を増加させる方法の提供。

【解決手段】 アクチビン受容体 I I B (A c t R I I B) に対するミオスタチン結合を阻害し、S m a d 活性化を阻害し、それにより骨格筋分化を誘導し、例えば、病理学的障害の処置をもたらすために、A c t R I I B の機能を阻害する、すなわち拮抗するために抗 A c t R I I B 抗体の使用。抗 A c t R I I B 抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含むクロニングまたは発現ベクター及びその宿主。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療用抗 A c t R I I B 抗体または機能性タンパク質。

【請求項 2】

A c t R I I B のリガンド結合ドメインに結合する抗 A c t R I I B 抗体または機能性タンパク質。

【請求項 3】

配列番号：181 のアミノ酸 19－134 間で A c t R I I B に結合する抗 A c t R I I B 抗体または機能性タンパク質。

【請求項 4】

1 nM 以下、好ましくは 100 pM 以下の K_D で A c t R I I B に結合する、前記請求項のいずれかに記載の抗 A c t R I I B 抗体または機能性タンパク質。

【請求項 5】

A c t R I I B に対するミオスタチン結合を阻害する、前記請求項のいずれかに記載の抗 A c t R I I B 抗体。

【請求項 6】

S m a d 依存性レポーター遺伝子アッセイにより測定されるとき、ミオスタチン誘導シグナル伝達を阻害する、前記請求項のいずれかに記載の抗 A c t R I I B 抗体。

【請求項 7】

A c t R I I A に結合するよりも 10 倍以上の親和性で A c t R I I B に結合する、前記請求項のいずれかに記載の抗 A c t R I I B 抗体。

【請求項 8】

配列番号：1－84 に記載されている少なくとも 1 つの C D R に対して少なくとも 95 % 同一性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、前記請求項のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 9】

配列番号：29－42 に記載されている少なくとも 1 つの C D R 3 に対して少なくとも 95 % 同一性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、請求項 1－7 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 10】

配列番号：99－112 の少なくとも 1 つに対して少なくとも 95 % 配列同一性を有する V H ポリペプチド配列を含む、請求項 1－7 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 11】

配列番号：85－98 の少なくとも 1 つに対して少なくとも 95 % 配列同一性を有する V L ポリペプチド配列を含む、請求項 1－7 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 12】

配列番号：99－112 の少なくとも 1 つに対して少なくとも 95 % 配列同一性を有する V H ポリペプチド配列および配列番号：85－98 の少なくとも 1 つに対して少なくとも 95 % 配列同一性を有する V L ポリペプチド配列を含む、請求項 1－7 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 13】

配列番号：1－14 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1；配列番号：15－28 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2；配列番号：29－42 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3；配列番号：43－56 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 1；配列番号：57－70 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 2；および配列番号：71－84 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1－7 のいずれかに記載の抗体または機能

10

20

30

40

50

性タンパク質。

【請求項 14】

(a) 配列番号：1 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：15 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：29 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：43 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：57 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：71 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(b) 配列番号：2 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：16 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：30 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：44 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：58 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：72 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(c) 配列番号：3 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：17 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：31 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：45 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：59 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：73 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(d) 配列番号：4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：18 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：32 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：46 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：60 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：74 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(e) 配列番号：5 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：19 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：33 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：47 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：61 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：75 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(f) 配列番号：6 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：20 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：34 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：48 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：62 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：76 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(g) 配列番号：7 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：21 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：35 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：49 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：63 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：77 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(h) 配列番号：8 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：22 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：36 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：50 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：64 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：78 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(i) 配列番号：9 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：23 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：37 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：51 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：65 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：79 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(j) 配列番号：10 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：24 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：38 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：52 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：66 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：80 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(k) 配列番号：11 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：25 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：39 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：53 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：67 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：81 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(l) 配列番号：12 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：26 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：40 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：54 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：68 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：82 の軽鎖可変領域 C D R 3、

(m) 配列番号：13 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：27 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：41 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：55 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：69 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：83 の軽鎖可変領域 C D R 3、

または

(n) 配列番号：14 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：28 の重鎖可変領域 C D R 2 ; 配列番号：42 の重鎖可変領域 C D R 3 ; 配列番号：56 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号：70 の軽鎖可変領域 C D R 2 ; および配列番号：84 の軽鎖可変領域 C D R 3

を含む、請求項 1-7 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 15】

配列番号：146-150 および 156-160 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列に対して少なくとも 95 % 配列同一性を有する全長重鎖アミノ酸配列を含む、請求項 1-7 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 16】

配列番号：141-145および151-155からなる群から選択される少なくとも1つの配列に対して少なくとも95%配列同一性を有する全長軽鎖アミノ酸配列を含む、請求項1-7のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 17】

(a) 配列番号：85の可変重鎖配列および配列番号：99の可変軽鎖配列；
 (b) 配列番号：86の可変重鎖配列および配列番号：100の可変軽鎖配列；
 (c) 配列番号：87の可変重鎖配列および配列番号：101の可変軽鎖配列；
 (d) 配列番号：88の可変重鎖配列および配列番号：102の可変軽鎖配列；
 (e) 配列番号：89の可変重鎖配列および配列番号：103の可変軽鎖配列；
 (f) 配列番号：90の可変重鎖配列および配列番号：104の可変軽鎖配列；
 (g) 配列番号：91の可変重鎖配列および配列番号：105の可変軽鎖配列；
 (h) 配列番号：92の可変重鎖配列および配列番号：106の可変軽鎖配列；
 (i) 配列番号：93の可変重鎖配列および配列番号：107の可変軽鎖配列；
 (j) 配列番号：94の可変重鎖配列および配列番号：108の可変軽鎖配列；
 (k) 配列番号：95の可変重鎖配列および配列番号：109の可変軽鎖配列；
 (l) 配列番号：96の可変重鎖配列および配列番号：110の可変軽鎖配列；
 (m) 配列番号：97の可変重鎖配列および配列番号：111の可変軽鎖配列；または
 (n) 配列番号：98の可変重鎖配列および配列番号：112の可変軽鎖配列を含む、抗体。

10

20

【請求項 18】

(a) 配列番号：146の重鎖配列および配列番号：141の軽鎖配列；
 (b) 配列番号：147の重鎖配列および配列番号：142の軽鎖配列；
 (c) 配列番号：148の重鎖配列および配列番号：143の軽鎖配列；
 (d) 配列番号：149の重鎖配列および配列番号：144の軽鎖配列；
 (e) 配列番号：150の重鎖配列および配列番号：145の軽鎖配列；
 (f) 配列番号：156の重鎖配列および配列番号：151の軽鎖配列；
 (g) 配列番号：157の重鎖配列および配列番号：152の軽鎖配列；
 (h) 配列番号：158の重鎖配列および配列番号：153の軽鎖配列；
 (i) 配列番号：159の重鎖配列および配列番号：154の軽鎖配列；または
 (j) 配列番号：160の重鎖配列および配列番号：155の軽鎖配列を含む、抗体。

30

【請求項 19】

ActRIIBとの結合を請求項18に記載の少なくとも1つの抗体により交差阻止するか、または交差阻止される抗体または機能性タンパク質。

【請求項 20】

ActRIIBとの結合を請求項18に記載の少なくとも1つの抗体により交差阻止するか、または交差阻止される請求項1-17のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 21】

請求項17または請求項18に記載の抗体により認識されるエピトープに結合する、抗体または機能性タンパク質。

40

【請求項 22】

請求項17または請求項18に記載の抗体により認識されるエピトープに結合する、請求項1-16のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項 23】

(a) 配列番号：181のアミノ酸78-83(WLDDFN-配列番号：188)；
 (b) 配列番号：181のアミノ酸76-84(GCWLDDFNC-配列番号：186)；
 (c) 配列番号：181のアミノ酸75-85(KGCWLDDFNKY-配列番号：1

50

90) ;

(d) 配列番号：181のアミノ酸52-56 (EQDKR-配列番号：189) ;

(e) 配列番号：181のアミノ酸49-63 (CEGEQDKRLHCYASW-配列番号：187) ; または

(f) 配列番号：181のアミノ酸78-83 (WLDDFN) および配列番号：181のアミノ酸52-56 (EQDKR)

を含むか、またはからなるエピトープに結合する請求項1-18のいずれかに記載の抗体。

【請求項24】

同じエピトープへの交差阻止または結合がBIACOREアッセイまたはELISAにおいて検出される、請求項19-22のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質。

【請求項25】

IgG1アイソタイプの抗体である、前記請求項のいずれかに記載の抗ActRIIB抗体。

【請求項26】

Fc領域の変異を介して改変されたエフェクター機能を有する、前記請求項のいずれかに記載の抗ActRIIB抗体。

【請求項27】

前記請求項のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド配列。

【請求項28】

配列番号：113-140または161-180の1つまたはそれ以上を含む、請求項27に記載の単離されたポリヌクレオチド配列。

【請求項29】

1つまたはそれ以上の請求項27または請求項28に記載の単離されたポリヌクレオチド配列を含むクローニングまたは発現ベクター。

【請求項30】

配列番号：113-140または161-180の1つまたはそれ以上、または少なくとも1つのCDR領域をコードするそれらのフラグメントを含む、請求項29に記載のベクター。

【請求項31】

請求項29または請求項30に記載の1つまたはそれ以上のベクターを含む宿主細胞。

【請求項32】

請求項1-26のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質の生産のための方法であって、請求項31に記載の宿主細胞を培養し、該抗体または機能性タンパク質を単離することを含む方法。

【請求項33】

請求項1-26のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質または請求項27または請求項28に記載のポリヌクレオチド配列を含む医薬組成物。

【請求項34】

薬学的に許容される希釈剤または担体をさらに含む、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項35】

1つまたはそれ以上のさらなる活性剤をさらに含む、請求項33または34に記載の医薬組成物。

【請求項36】

さらなる活性剤がIGF-1、IGF-2またはIGF-1もしくはIGF-2の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIBに結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2アゴニスト、Ghrelinアゴニスト、SARM、GHアゴニスト/模擬物またはフォリスタチンから選択される請求項35に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

筋骨格疾患または障害；急性および／または慢性腎疾患または不全；肝線維症または肝硬変症；癌、例えば、乳癌；パーキンソン病；神経細胞死と関連する状態、例えば、ALS、脳萎縮または認知症および貧血；肝、腎および肺線維症；加齢関連状態；および、限定はしないが、横紋筋肉腫、骨量減少を誘導する癌、肝細胞腺腫、消化器癌により例示される癌に罹患している患者を処置する方法であって、請求項 1－26 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質の有効用量を該患者に投与することを含む方法。

【請求項 38】

医薬として使用するための、請求項 1－26 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質、請求項 27 または請求項 28 に記載のポリヌクレオチド配列、または請求項 33－36 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 39】

筋骨格疾患または障害；急性および／または慢性腎疾患または不全；肝線維症または肝硬変症；癌、例えば、乳癌；パーキンソン病；神経細胞死と関連する状態、例えば、ALS、脳萎縮または認知症および貧血；肝、腎および肺線維症；加齢関連状態；および限定はしないが、横紋筋肉腫、骨量減少を誘導する癌、肝細胞腺腫、消化器癌により例示される癌の処置のための医薬の製造における、請求項 1－26 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質、請求項 27 または請求項 28 に記載のポリヌクレオチド配列、または請求項 33－36 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 40】

筋骨格疾患または障害；急性および／または慢性腎疾患または不全；肝線維症または肝硬変症；癌、例えば、乳癌；パーキンソン病；神経細胞死と関連する状態、例えば、ALS、脳萎縮、または認知症および貧血；肝、腎および肺線維症；および限定はしないが、横紋筋肉腫、骨量減少を誘導する癌、肝細胞腺腫、消化器癌により例示される癌の処置における使用のための、請求項 1－26 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質、請求項 27 または請求項 28 に記載のポリヌクレオチド配列、または請求項 33－36 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 41】

筋骨格疾患または障害が、例えば、筋障害、例えば、筋緊張症、先天性筋障害、例えば、ネマリン筋障害、マルチミニコア(multi/minicore)筋障害および筋細管（中心核）筋障害、ミトコンドリア性筋障害、家族性周期性四肢まひ、炎症性筋炎、例えば、グリコーゲンもしくは脂質蓄積症により引き起こされる、代謝性筋障害、皮膚筋炎、多発性筋炎、封入体筋炎、骨化性筋炎、横紋筋融解症およびミオグロビン尿症；ジストロフィー、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張、顔面肩甲上腕、エメリー・ドレフュス、眼咽頭筋、肩甲上腕、肢帯、福山、先天型筋ジストロフィー、または遺伝的末梢性ミオパシー；骨粗鬆症；骨折；低身長症；小人症；長期のベッド休養；自発的不活化；または不随意不活化により引き起こされる筋萎縮である、請求項 39 または 40 に記載の使用。

【請求項 42】

処置される患者が、IGF-1、IGF-2 または IGF-1 もしくは IGF-2 の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIB に結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2 アゴニスト、Ghrelin アゴニスト、SARM、GH アゴニスト／模擬物またはフォリスタチンで以前に処置されている、請求項 41 に記載の使用。

【請求項 43】

処置される患者が、IGF-1、IGF-2 または IGF-1 もしくは IGF-2 の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIB に結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2 アゴニスト、Ghrelin アゴニスト、SARM、GH アゴニスト／模擬物またはフォリスタチンでの処置に対して以前に屈折性であった、請求項 41 に記載の使用。

【請求項 4 4】

処置される患者が、高齢者であるか、無重力状態で過ごしているか、または不活化の期間を経験している、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 5】

強化された不活化の期間または無重力状態の時間の前に、有効用量の請求項 1 - 2 6 のいずれかの抗体または機能性タンパク質を投与することを含む、強化された不活化または無重力状態の時間の筋肉疲労効果を改善する方法。

【請求項 4 6】

処置される患者が、肢（すなわち脚または腕）または関節（すなわち膝関節または股関節）に対する骨折を有する、請求項 4 1 に記載の使用。

10

【請求項 4 7】

患者が、股関節または膝関節置換術を経験しているか、または経験しようとしている、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 8】

p B W 5 2 2 (D S M 2 2 8 7 3) または p B W 5 2 4 (D S M 2 2 8 7 4) によってコードされる抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

技術分野

20

本発明は、抗アクチビン受容体 I I B (A c t R I I B) 抗体の分野である。特に、疾患または不使用による筋肉障害、例えば、筋肉疲労を処置するための該抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景技術

アクチビンは、構造的に関係があるシグナル伝達タンパク質の形質転換増殖因子-ベータ (T G F -ベータ) スーパーファミリーに属する二量体の増殖および分化因子である。アクチビンは、少なくとも 2 つの I 型 (I および I B) および 2 つの I I 型 (I I および I I B 、 a k a A C V R 2 A および A C V R 2 B) 受容体を含む受容体セリンキナーゼのヘテロ二量体複合体を介して信号を送る。これらの受容体は、システインリッチ領域を有するリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および予測されるセリン/スレオニン特異性を有する細胞質ドメインを含む全て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、I I 型受容体はリガンド結合および I 型受容体の発現のために必要である。I および I I 型受容体は、リガンド結合後に安定な複合体を形成し、I I 型受容体による I 型受容体のリン酸化をもたらす。

30

【0 0 0 3】

アクチビン受容体 I I B (A c t R I I B) は、ミオスタチンに対する受容体である。ミオスタチンとこの受容体間の相互作用は、S m a d 依存経路を介する骨格筋分化の阻害を制御する。したがって、ミオスタチンの A c t R I I B への結合を阻害または防止することにより、骨格筋の形成を誘導することができる。

40

【0 0 0 4】

種々のグループがこれを研究している。Bogdanovich et al (Nature, 2002, 420:418-421) は、抗ミオスタチン抗体がミオスタチンを阻止し、デュシェンヌ筋ジストロフィーのマウスモデルにおける筋肉量の増加をもたらすことができることを記載している。Bradley et al (Cell Mol. Life Sci. 2008, 65:2119-2124) は、ミオスタチンプロペプチドを投与すること、ミオスタチン受容体を阻止するためにフォリスタチンを投与すること、フォリスタチン生産を誘導するために H D A C 阻害剤を投与すること、ミオスタチンの受容体への結合を防止する改変されたミオスタチンペプチドを投与すること、およびミオスタチンに対する可溶性デコイ受容体を投与することにより成熟ミオスタチンの放出を阻害する

50

、前記抗ミオスタチン抗体を含むミオスタチン／A c t R I I B相互作用を調節するための異なる利用できるアプローチを記載している。

【0005】

これらの可能性のある治療にもかかわらず、患者の処置のために利用できる製品は存在しない。事実、最近、1つの会社がその抗ミオスタチン抗体プロジェクトを解散した。

したがって、患者における筋肉量および強度を増加させる方法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0006】

発明の開示

A c t R I I B受容体に指向する抗体が、ミオスタチンの受容体への結合を防止し、したがってS m a d依存経路による筋肉の分化の障害を防止することができることを見出した。これは、患者における筋肉量および強度の増加をもたらす。

【0007】

したがって、1つの局面において、本発明は、抗A c t R I I B抗体、または該抗体の抗原結合部分を含む機能性タンパク質を提供する。1つの態様において、A c t R I I BはヒトA c t R I I Bである。ヒトA c t R I I Bのポリペプチド配列は配列番号：181に記載されている（A A C 6 4 5 1 5 . 1、G I : 3 7 6 9 4 4 3）。1つの態様において、抗体または機能性タンパク質は、例えば、ヒトまたはラクダ起源を有する哺乳動物由来である。したがって、該抗体は、キメラ、ヒトまたはヒト化抗体であり得る。特定の態様において、抗A c t R I I B抗体は、標的タンパク質A c t R I I Bに特異的であり、A c t R I I BまたはA c t R I I Bのフラグメントに結合する抗原結合領域を有するとして特徴付けられる。好ましくは、該抗体は治療における使用のために適当である。

【0008】

1つの態様において、本発明の抗体は、アゴニスト活性が存在しないか、または該活性が低いA c t R I I Bアンタゴニストである。別の態様において、該抗体または機能性フラグメントは、標的タンパク質A c t R I I Bに結合し、ミオスタチンのA c t R I I Bへの結合を基底レベルに減少させる。この態様の1つの局面において、該抗体または機能性フラグメントは、A c t R I I Bに結合するミオスタチンの量を減少させる。この態様のさらなる局面において、該抗体または機能性フラグメントは、ミオスタチンのA c t R I I Bへの結合を完全に防止する。さらなる態様において、該抗体または機能性フラグメントは、S m a d活性化を阻害する。さらなる態様において、該抗体または機能性フラグメントは、S m a d依存経路を介する骨格分化のアクチビン受容体I I B型介在ミオスタチン誘導阻害を阻害する。

【0009】

該結合は、抗体による拮抗作用または作動作用(agonism)のいずれかの活性を測定するために使用することができる1つ以上のアッセイにより測定され得る。好ましくは、該アッセイは、A c t R I I Bに対する抗体の少なくとも1つの効果を測定する。E L I S AによるA c t R I I Bに対するミオスタチン結合の阻害、ミオスタチン誘導シグナル伝達の阻害（例えば、S m a d依存性レポーター遺伝子アッセイによる）、ミオスタチン誘導S m a dリン酸化の阻害（P-S m a d E L I S A）および骨格筋細胞分化のミオスタチン誘導阻害の阻害（例えば、クレアチンキナーゼアッセイによる）を含む。

【0010】

1つの態様において、本発明は、A c t R I I Bのミオスタチン結合領域（すなわち、リガンド結合ドメイン）に特異的に結合する抗体を提供する。このリガンド結合ドメインは、配列番号：181のアミノ酸19-134からなり、本明細書において配列番号：182と指定されている。

【0011】

1つの態様において、該抗体は、100 n M以下、10 n M以下、1 n M以下のK_DでA c t R I I Bに結合する。好ましくは、本発明の抗体は、100 p M以下（すなわち100 p M、50 p M、10 p M、1 p M以下）の親和性でA c t R I I Bに結合する。1

10

20

30

40

50

つの態様において、本発明の抗体は、10から20 pMの親和性でA c t R I I Bに結合する。

【0012】

1つの態様において、本発明の抗体は、A c t R I I B関連タンパク質と交差反応せず、特に、ヒトA c t R I I A (N P _ 0 0 1 6 0 7 . 1、G I : 4 5 0 1 8 9 7)と交差反応しない。

【0013】

1つの態様において、本発明の抗体は、A c t R I I AよりもA c t R I I Bに優先的に結合する。1つの態様において、本発明の抗体は、A c t R I I Aへの結合よりも5倍以上、さらに好ましくは10倍、さらに好ましくは50倍、さらに好ましくは100倍の親和性でA c t R I I Bに結合する。

10

【0014】

1つの態様において、本発明の抗体は、100 pM以上（すなわち250 pM、500 pM、1 nM、5 nM以上）の親和性でA c t R I I Aに結合する。

1つの態様において、本発明の抗体は、I g G 2アイソタイプである。

【0015】

別の態様において、本発明の抗体はI g G 1アイソタイプである。さらなる態様において、本発明の抗体はI g G 1アイソタイプであり、F c領域の変異を介する改変されたエフェクター機能を有する。1つの態様において、該改変されたエフェクター機能は、A D C CおよびC D C活性を減少させる。1つの態様において、該改変されたエフェクター機能は、A D C CおよびC D C活性をサイレンスにさせる。

20

【0016】

別の関連態様において、本発明の抗体は、抗体依存細胞毒性(A D C C)活性またはC D C活性を有さない完全ヒトまたはヒト化I g G 1抗体であり、配列番号：181のアミノ酸19-134からなるA c t R I I Bの領域に結合する。

【0017】

別の関連態様において、本発明の抗体は、減少した抗体依存細胞毒性(A D C C)活性またはC D C活性を有する完全ヒトまたはヒト化I g G 1抗体であり、配列番号：181のアミノ酸19-134からなるA c t R I I Bの領域に結合する。

【0018】

本発明は、A c t R I I Bに対するミオスタチン結合を阻害し、インビトロおよびインビボでの骨格筋分化を活性化する単離された抗体、特にヒトまたはヒト化抗体に関する。1つの態様において、本発明の抗体は、特定の重鎖および軽鎖配列由来であり、および／または特定の構造的特徴、例えば、特定のアミノ酸配列を含むC D R領域を含む。本発明は、単離された抗体、このような抗体を作製する方法、このような抗体を含む免疫抱合体および多量体または多特異的分子、ならびに該抗体を含む医薬組成物、本発明の免疫抱合体または二重特異性分子を提供する。本発明は、また、S m a d活性化を阻害し、それにより骨格筋分化を誘導し、例えば、病理学的障害の処置をもたらすために、A c t R I I Bの機能を阻害する、すなわち拮抗するために抗体を使用する方法に関する。

30

【0019】

病理学的障害は、筋骨格疾患または障害、例えば、筋萎縮であり得る。グルココルチコイド、例えば、コルチゾール、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、またはプレドニゾンでの処置の結果として含む、筋萎縮の多数の原因が存在する。筋萎縮は、また、神経外傷による脱神経の結果または、変性、代謝性または炎症性神経障害（例えば、G u i l l i a n - B a r r e症候群、末梢性神経障害、または環境毒素または薬物への暴露）の結果であり得る。

40

【0020】

加えて、筋萎縮は、筋障害、例えば、筋緊張症；先天性筋障害、例えば、ネマリン筋障害、マルチミニコア(multi/minicore)筋障害および筋細管（中心核）筋障害；ミトコンドリア性筋障害；家族性周期性四肢まひ；炎症性筋炎；例えば、グリコーゲンまたは脂質蓄

50

積症により引き起こされる代謝性筋障害；皮膚筋炎；多発性筋炎；封入体筋炎；骨化性筋炎；横紋筋融解症およびミオグロビン尿症の結果であり得る。

【0021】

筋障害は、筋ジストロフィー症候群、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張、顔面肩甲上腕、エメリー・ドレフュス、眼咽頭筋、肩甲上腕、肢帯、福山、先天型筋ジストロフィー、または遺伝的末梢性ミオパシーにより引き起こされ得る。筋骨格疾患は、また、骨粗鬆症、骨折、低身長症、または小人症であり得る。

【0022】

加えて、筋萎縮は、成人運動ニューロン疾患、小児脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、若年性脊髄性筋萎縮症、多巣性伝導ブロックでの自己免疫性運動神経障害、卒中または脊髄損傷による麻痺、外傷による骨格固定化、長期のベッド休養、自発的不活化、不随意不活化、代謝ストレスまたは栄養不足、癌、AIDS、空腹時、甲状腺障害、糖尿病、良性先天性低血圧、セントラルコア病、やけど、慢性閉塞性肺疾患、肝臓疾患（例えば、線維症、肝硬変症）、敗血症、腎不全、鬱血性心不全、加齢、宇宙旅行または無重力状態で過ごすことの結果であり得る。

【0023】

処置され得る加齢関連状態の例は、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、平均寿命の減少、衰弱、記憶障害、しわ、腎機能障害、および加齢性難聴；代謝障害、例えば、II型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖、および肥満を含む。

【0024】

本発明の抗体で処置され得る他の状態は、急性および／または慢性腎疾患または不全、肝線維症または肝硬変症、癌、例えば、乳癌、パーキンソン病；神経細胞死と関連する状態、例えば、ALS、脳萎縮、または認知症および貧血を含む。

【0025】

さらなる状態は、悪液質、リウマチ性関節炎に伴う悪液質および癌に伴う悪液質を含む。

今日までに、これらの障害を処置するための信頼できる、または有効な治療は、ほとんど開発されていない。

【0026】

肝、腎および肺線維症に寄与する他の受容体中のActRIIBへのアクチビン結合の役割（Werner and Alzheimer, Cytokine Growth Factors Rev 2006, 17(3):157-171）、ならびに癌におけるミオスタチン、アクチビンまたはActRIIBに対する役割（Tsuchida et al, Endo J, 2008, 55(1):11-21）の報告されている証拠に基づいて、本発明の抗体は、肝臓、腎臓、肺線維症、および限定はしないが、横紋筋肉腫、骨量減少を誘導する癌、肝細胞腺腫、消化器癌により例示される癌を処置するために使用され得る。

【0027】

防止は、加齢関連状態または代謝障害の完全非存在、例えば、全非存在であり得る。防止は、また、対象における加齢関連状態または代謝障害の発生する可能性が、本発明の抗体を受けていない対象よりも起こる可能性が低いという部分的であり得る。

【0028】

本発明の理解をさらに容易にするために、特定の用語を最初に定義する。さらなる定義は、詳細な説明中に記載する。

【0029】

「免疫応答」なる用語は、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌細胞、または、自己免疫もしくは病理学的な炎症の場合、正常なヒト細胞もしくは組織の選択的な損傷、破壊または人体からの除去をもたらす、例えば、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および上記細胞または肝臓により生産される可溶性巨大分子（抗体、サイトカインおよび補体を含む）の作用を示す。

【0030】

「シグナル変換経路」または「シグナル伝達活性」は、一般的にタンパク質-タンパク質相互作用、例えば、受容体への増殖因子の結合に開始し、ある部分の細胞から別の部分の細胞へシグナルの伝達をもたらす生化学的因果関係を示す。一般的に、伝達は、シグナル変換を引き起こす一連の反応における1つ以上のタンパク質上の1つ以上のチロシン、セリンまたはスレオニン残基の特異的なリン酸化を含む。最後から2番目のプロセスは、一般的に、遺伝子発現の変化をもたらす核事象を含む。

【0031】

A c t R I I BまたはA c t I I B受容体なる用語は、配列番号：181（A A C 6 4 5 1 5. 1、G I：3 7 6 9 4 4 3）において定義されるヒトA c t R I I Bを示す。研究レベルのポリクローナルおよびモノクローナル抗A c t R I I B抗体、例えば、R&D Systems（登録商標）、MN, USAにより作製されているものは、当該分野で知られている。治療用抗A c t R I I B抗体は、以前に公開されていない。もちろん、抗体を他の種由来のA c t R I I Bに対して作製し、これらの種における病理学的状態を処置するために使用することができる。

【0032】

本明細書において示される「抗体」なる用語は、全抗体およびそれらのあらゆる抗原結合フラグメント（すなわち「抗原結合部分」）または一本鎖を含む。天然「抗体」は、ジスルフィド結合により相互結合された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質である。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（ V_H と略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（ V_L と略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 C_L を含む。 V_H および V_L 領域は、さらにフレームワーク領域（FR）と称されるより保存されている領域で散在されている相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域に細分することができる。それぞれの V_H および V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順番：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配列された3つのCDRおよび4つのFRを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1の成分（C1q）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を介在し得る。

【0033】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗原部分」）なる用語は、抗原に特異的に結合する能力を維持している抗体の全長または1つ以上のフラグメント（例えば、A c t R I I Bの部分）を示す。抗体の抗原結合機能が全長抗体のフラグメントにより行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」なる用語内に包含される結合フラグメントの例は、F a bフラグメント、 V_L 、 V_H 、 C_L およびCH1ドメインからなる一価フラグメント； $F(a b)_2$ フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2つのF a bフラグメントを含む二価フラグメント； V_H およびCH1ドメインからなるF dフラグメント；抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインからなるF vフラグメント； V_H ドメインからなるd A bフラグメント（Ward et al., 1989 Nature 341:544-546）；および単離された相補性決定領域（CDR）を含む。

【0034】

さらに、F vフラグメントの2つのドメイン、 V_L および V_H が別々の遺伝子によりコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、b y V_L および V_H 領域が対合し、一価分子を形成する単一のタンパク質鎖（一本鎖F v（s c F v））として知られている；例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426;およびHuston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883参照）として作製することが可能である合成リンカーにより結合させることができる。このような一本鎖抗体は、また、抗体の「抗原結合領域」なる用語内に包含されることが意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に知られている慣用の技術を使用して得られ、該フラグメントは、無傷な抗体と同じ方法において有

用性についてスクリーニングされる。

【0035】

本明細書において使用される「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を示す（例えば、A c t R I I Bに特異的に結合する単離された抗体は、A c t R I I B以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、A c t R I I Bに特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原、例えば、他の種由来のA c t R I I B分子に対する交差反応性を有し得る。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まないこともある。

【0036】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を示す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【0037】

本明細書において使用される「ヒト抗体」なる用語は、フレームワークおよびC D R領域の両方がヒト起源の配列由来である可変領域を有する抗体を含むことが意図される。さらに、抗体が定常領域を含むとき、定常領域は、また、かかるヒト配列、例えば、ヒト生殖細胞系配列、または変異型ヒト生殖細胞系配列または、例えば、Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57-86)に記載されている、ヒトフレームワーク配列分析に由来する抗体含有コンセンサスフレームワーク配列に由来する。

【0038】

本発明のヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発またはインビボでの体細胞変異により導入される変異）。しかしながら、本明細書において使用される「ヒト抗体」なる用語は、別の哺乳動物種、例えば、マウスの生殖細胞系由来のC D R配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含むことを意図しない。

【0039】

「ヒトモノクローナル抗体」なる用語は、フレームワークおよびC D R領域の両方がヒト配列に由来する可変領域を含む単一の結合特異性を示す抗体を示す。1つの態様において、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合されたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する遺伝子導入非ヒト動物、例えば、遺伝子導入マウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマにより生産される。

【0040】

本明細書において使用される「組換えヒト抗体」なる用語は、組換え方法により調製、発現、創造または単離されるすべてのヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子の遺伝子導入または導入染色体を含む動物（例えば、マウス）またはそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマ、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列のすべてまたは一部の他のD N A配列へのスプライシングを含むあらゆる他の方法により調製、発現、創造または単離される抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、フレームワークおよびC D R領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。1つの態様において、しかしながら、このような組換えヒト抗体は、インビトロで変異誘発（または、ヒトI g配列に対する動物遺伝子導入を使用するとき、インビボ体細胞変異誘発）に付すことができ、したがって、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系V_HおよびV_L配列に由来し関連するけれども、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に天然に存在し得ない配列である。

【0041】

本明細書において使用される「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子により提供される抗体クラス（例えば、I g M、I g E、I g G、例えば、I g G 1またはI g G 2）を示す。

10

20

30

40

50

【0042】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」なる句は、「抗原に特異的に結合する抗体」なる用語と互換的に使用される。

【0043】

本明細書において使用される、「A c t R I I Bポリペプチドに特異的に結合する」抗体は、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下の K_D でヒトA c t R I I Bポリペプチドに結合する抗体を示すことが意図される。「A c t R I I B以外の抗原と交差反応する」抗体は、 10×10^{-9} M以下、 5×10^{-9} M以下または 2×10^{-9} M以下の K_D で抗原に結合する抗体を示すことが意図される。「特定の抗原と交差反応しない」抗体は、 1.5×10^{-8} M以上の K_D または $5 - 10 \times 10^{-8}$ Mもしくは 1×10^{-7} M以上の K_D で抗原に結合する抗体を示すことが意図される。1つの態様において、抗原と交差反応しないこのような抗体は、標準結合アッセイにおいてこれらのタンパク質に対する本質的に検出不可能な結合を示す。 K_D は、バイオセンサーシステム、例えば、B i a c o r e（登録商標）システム、またはSolution Equilibrium滴定を使用して決定され得る。

10

【0044】

本明細書において使用される「アンタゴニスト抗体」なる用語は、ミオスタチンの存在下でA c t R I I B誘導シグナル伝達活性を阻害する抗体を示すことが意図される。これを検出するためのアッセイの例は、ミオスタチン誘導シグナル伝達の阻害（例えば、S m a d依存性レポーター遺伝子アッセイによる）、ミオスタチン誘導S m a dリン酸化の阻害（P-S m a d E L I S A）および骨格筋細胞分化のミオスタチン誘導阻害の阻害（例えば、クレアチンキナーゼアッセイによる）を含む。

20

【0045】

いくつかの態様において、抗体は、10 nM以下、1 nM以下または100 pM以下のI C 50でS m a d依存性レポーター遺伝子アッセイにおいて測定されるミオスタチン誘導シグナル伝達を阻害する。

【0046】

本明細書において使用される「アゴニスト活性を有さない」抗体は、ミオスタチンの非存在下で細胞ベースアッセイ、例えば、ミオスタチン誘導シグナル伝達の阻害（例えば、S m a d依存性レポーター遺伝子アッセイによる）、ミオスタチン誘導S m a dリン酸化の阻害（P-S m a d E L I S A）および骨格筋細胞分化のミオスタチン誘導阻害の阻害（例えば、クレアチンキナーゼアッセイによる）において、A c t R I I B介在シグナル伝達活性を有意に増加させない抗体を示すことが意図される。このようなアッセイは、以下の実施例でより詳細に記載されている。

30

【0047】

本明細書において使用される「 $K_{a s s o c}$ 」または「 K_a 」なる用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を示すことが意図され、一方で、本明細書において使用される「 $K_{d i s}$ 」または「 K_d 」なる用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を示すことが意図される。本明細書において使用される「 K_D 」なる用語は、解離定数を示すことが意図され、 K_d 対 K_a の割合（すなわち K_d/K_a ）から得られ、モル濃度（M）として示される。抗体に対する K_D 値は、当該分野で確立された方法を使用して決定することができる。抗体の K_D を決定するための方法は、表面プラズモン共鳴、例えば、B i a c o r e（登録商標）のバイオセンサーシステム、またはSolution Equilibrium滴定（S E T）を使用することによる方法である（Friguet B et al. (1985) J. Immunol Methods; 77(2): 305-319およびHanel C et al. (2005) Anal Biochem; 339(1): 182-184、参照）。

40

【0048】

本明細書において使用される「親和性」なる用語は、単一の抗原性部位での抗体と抗原間の相互作用の強度を示す。それぞれの抗原部位内で、抗体「アーム」の可変領域は、多数の部位で抗原と弱い非共有の力を介して相互作用し；相互作用が増すほど、親和性は強

50

くなる。

【0049】

本明細書において使用される「アビディティー」なる用語は、抗体－抗原複合体の全体的な安定性または強度の情報尺度を示す。3つの主要な因子：抗体エпитープ親和性；抗原および抗体両方の価数；および相互作用部分の構造的配置により制御される。結局、これらの因子は、抗体の特異性、すなわち、特定の抗体が正確な抗原エпитープと結合する確率を定義する。

【0050】

本明細書において使用される、「ADCC」または「抗体依存性細胞毒性」活性なる用語は、ヒトB細胞欠失活性を示す。ADCC活性は、当該分野で知られているヒトB細胞欠失アッセイにより測定することができる。

10

【0051】

より高いアビディティープロープを得るために、二量体抱合体（FACSマーカーと結合している抗体タンパク質の2分子）を構築することができ、したがって親和性の低い相互作用（例えば、生殖細胞系抗体と）がFACSによりさらに容易に検出できるようにさせる。加えて、抗原結合のアビディティーを増強する別の方法は、本明細書に記載されている抗ActRIIB抗体の構築物のいずれかの二量体、三量体または多量体を作製することを含む。このような多量体は、例えば、天然C-から-N-末端結合を模倣することにより、または定常領域を介してともに保持される抗体二量体を模倣することにより、個々のモジュール間の共有結合を介して作製され得る。Fc/Fc接触に操作される結合は、共有または非共有であり得る。加えて、Fc以外の二量体または多量体パートナーは、ActRIIBハイブリッドにおいて使用され、このようなより高次の構造を作製することができる。例えば、多量体ドメイン、例えば、WO2004/039841に記載されている三量体ドメインまたはWO98/18943に記載されている五量体ドメインを使用することが可能である。

20

【0052】

本明細書において使用される抗体に対する「選択性」なる用語は、特定の標的ポリペプチドに結合するが、密接に関連するポリペプチドに結合しない抗体を示す。

【0053】

本明細書において使用される抗体に対する「高親和性」なる用語は、標的抗原に対して1nM以下の K_D を有する抗体を示す。本明細書において使用される「対象」なる用語は、すべてのヒトまたは非ヒト動物を含む。

30

【0054】

「非ヒト動物」なる用語は、すべての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類などを含む。

【0055】

本明細書において使用される「最適化された」なる用語は、ヌクレオチド配列が、生産細胞または生物、一般的に、真核細胞、例えば、ピチア細胞、トリコデルマ細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはヒト細胞において好ましいコドンを使用してアミノ酸配列をコードするように改変されているヌクレオチド配列を意味する。最適化されたヌクレオチド配列は、出発ヌクレオチド配列（「親」配列としても知られている）によりもともとコードされるアミノ酸配列を完全に保持するか、もしくははできるだけ保持するように操作される。本明細書において最適化された配列は、CHO哺乳動物細胞において好ましいコドンを有するように操作されているが、しかしながら、他の真核細胞におけるこれらの配列の最適化された発現は、また、本明細書で想定される。最適化されたヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列は、また、最適化されていることを示す。

40

【0056】

本発明の種々の局面は、以下のサブセクションにさらに詳細に記載されている。

50

種々の種のA c t R I I Bに対する抗体の結合能力を評価する標準アッセイは、当該分野で知られており、例えば、E L I S A、ウェスタンブロットおよびR I Aを含む。適当なアッセイは、実施例に詳細に記載されている。抗体の結合親和性は、また、当該分野で知られている標準アッセイ、例えば、B i a c o r e分析またはSolution Equilibrium滴定により評価することができる。表面プラズモン共鳴に基づく技術、例えば、B i a c o r eは、結合親和性の計算を可能にする結合反応速度を決定することができる。A c t R I I Bの機能特性に対する抗体の効果を評価するアッセイ（例えば、受容体結合、ヒトB細胞増殖またはI g G生産の防止または誘導）は、実施例に詳細に記載されている。

【0057】

したがって、当該分野で知られている、および本明細書に記載されている方法論にしたがって決定される1つ以上のこれらのA c t R I I B機能特性（例えば、生化学的、免疫化学的、細胞的、生理学的または他の生物学的活性など）を「阻害する」抗体は、抗体の非存在下で（例えば、または不適切な特異性のコントロール抗体が存在するとき）見られるものと比較して特定の活性における統計的に有意な減少に関係すると理解される。A c t R I I B活性を阻害する抗体は、測定されるパラメーターの少なくとも10%、少なくとも50%、80%または90%の統計的に有意な減少をもたらし、1つの態様において、本発明の抗体は、95%、98%または99%以上のA c t R I I B機能活性を阻害し得る。

【0058】

「交差阻止する」、「交差阻止された」および「交差阻止」なる用語は、本明細書において互換的に使用され、標準競合結合アッセイにおいて、他の抗体または結合剤のA c t R I I B、特にリガンド結合ドメインへの結合を妨げる抗体または他の結合剤の能力を意味する。

【0059】

抗体または他の結合剤が別の抗体または結合分子のA c t R I I Bへの結合を妨げることができる能力または程度、したがって本発明による交差阻止することができるか否かは、標準競合結合アッセイを使用して測定することができる。1つの適当なアッセイは、表面プラズモン共鳴技術を使用して相互作用の程度を測定することができるB i a c o r e技術（例えば、B I A c o r e装置(Biacore, Uppsala, Sweden)を使用することによる）の使用を含む。交差阻止を測定するための別のアッセイは、E L I S Aベースのアプローチを使用する。さらなるアッセイは、A c t R I I B発現細胞への結合に対する種々の抗体の競合を試験するF A C S分析を使用する（例えば、実施例に記載されている）。

【0060】

本発明において、本発明の交差阻止する抗体または他の結合剤は、抗体または結合剤の組合せ（混合物）の記録された結合が、組合せにおける2つの抗体または結合剤の最大理論結合の80%から0.1%（例えば、80%から4%）、具体的には最大理論結合の75%から0.1%（例えば、75%から4%）、さらに具体的には最大理論結合（上記のとおり）の70%から0.1%（例えば、70%から4%）、さらに具体的には65%から0.1%（例えば、65%から4%）であるように、記載されているB I A c o r e交差阻止アッセイにおいてA c t R I I Bに結合する。

【0061】

試験抗体が陽性コントロールウェルと比較したとき（すなわち、同じ抗A c t R I I B抗体およびA c t R I I Bであり、交差阻止する「試験」抗体でない）、60%から100%、具体的には70%から100%、さらに具体的には80%から100%のA c t R I I Bへの抗A c t R I I B抗体結合の減少を引き起こすことができるとき、抗体はE L I S Aアッセイにおいて本発明の抗A c t R I I B抗体が交差阻止すると定義される。本明細書に記載されているとおり交差阻止抗体の例は、M O R 0 8 1 5 9およびM O R 0 8 2 1 3である。したがって、本発明は、A c t R I I Bへの結合に対してM O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3を交差阻止する抗体を提供する。

【0062】

組換え抗体

本発明の抗体は、実施例に記載されているとおりに単離され、構造的に特性化されたヒト組換え抗体を含む。本発明の単離された抗体のV_Hアミノ酸配列は、配列番号：99-112に示されている。本発明の単離された抗体のV_Lアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：85-98に示されている。本発明の抗体の好ましい全長重鎖アミノ酸配列の例は、配列番号：146-150および156-160に示されている。本発明の抗体の好ましい全長軽鎖アミノ酸配列の例は、それぞれ配列番号：141-145および151-155に示されている。本発明の他の抗体は、アミノ酸欠失、挿入または置換により変異されているが、CDR領域において上記の配列に示されるCDR領域と少なくとも60、70、80、90、95、97または99パーセントの同一性を有するアミノ酸を含む。いくつかの態様において、それは、上記の配列に示されるCDR領域と比較したとき、わずか1、2、3、4または5個のアミノ酸がCDR領域においてアミノ酸欠失、挿入または置換により変異されている変異体アミノ酸配列を含む。

【0063】

さらに、可変重鎖親ヌクレオチド配列は、配列番号：127-140に示されている。可変軽鎖親ヌクレオチド配列は、配列番号：113-126に示されている。哺乳動物細胞における発現のために最適化された全長軽鎖ヌクレオチド配列は、配列番号：161-165および171-175に示されている。哺乳動物細胞における発現のために最適化された全長重鎖ヌクレオチド配列は、配列番号：166-170および176-180に示されている。本発明の他の抗体は、変異されているが、上記の配列と少なくとも60以上（すなわち、80、90、95、97、99以上）パーセントの同一性を有するアミノ酸または核酸を含む。いくつかの態様において、それは、上記の配列に示される可変領域と比較したとき、わずか1、2、3、4または5個のアミノ酸が可変領域においてアミノ酸欠失、挿入または置換により変異されている変異体アミノ酸配列を含む。

【0064】

これらの抗体のそれぞれが同じエピトープに結合し、同じ親抗体由来の産物であるため、V_H、V_L、全長軽鎖、および全長重鎖配列（ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列）を「混合し、マッチングして」、本発明の他の抗A c t R I I B結合分子を創造することができる。このような「混合し、マッチングした」抗体のA c t R I I B結合は、上記されている、および実施例に記載されている結合アッセイ（例えば、E L I S A）を使用して試験することができる。これらの鎖を混合し、マッチングするとき、特定のV_H/V_L対由来のV_H配列は、構造的に同様のV_H配列と置き換えられるべきである。同様に、特定の全長重鎖/全長軽鎖対由来の全長重鎖配列は、構造的に同様の全長重鎖配列と置き換えられるべきである。同様に、特定のV_H/V_L対由来のV_L配列は、構造的に同様のV_L配列と置き換えられるべきである。同様に、特定の全長重鎖/全長軽鎖対由来の全長軽鎖配列は、構造的に同様の全長軽鎖配列と置き換えられるべきである。したがって、1つの局面において、本発明は、配列番号：99-112からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および配列番号：85-98からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する、単離された組換え抗A c t R I I B抗体またはそれらの抗原結合領域を提供する。

【0065】

別の局面において、本発明は以下のものを提供する：

- (i) 配列番号：99-112からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む全長重鎖；および配列番号：85-98からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む全長軽鎖を有する単離された組換え抗A c t R I I B抗体、または
- (ii) それらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質。

【0066】

別の局面において、本発明は以下のものを提供する：

- (i) 配列番号：127-140からなる群から選択される哺乳動物の細胞における発現のために最適化されているヌクレオチド配列によってコードされる全長重鎖、および配列

番号：113-126からなる群から選択される哺乳動物の細胞における発現のために最適化されているヌクレオチド配列によってコードされる全長軽鎖を有する単離された組換え抗A c t R I I B抗体、または

(i i) それらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質。

【0067】

抗体のV_H CDR1のアミノ酸配列は、配列番号：1-14に示されている。抗体のV_H CDR2のアミノ酸配列は、配列番号：15-28に示されている。抗体のV_H CDR3のアミノ酸配列は、配列番号：29-42に示されている。抗体のV_L CDR1のアミノ酸配列は、配列番号：43-56に示されている。抗体のV_L CDR2のアミノ酸配列は、配列番号：57-70に示されている。抗体のV_L CDR3のアミノ酸配列は、配列番号：71-84に示されている。CDR領域は、K a b a t系 (Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) を使用して表される。CDR領域を決定する代替方法は、C h o t h i a (Chothia et al., 1989, Nature, 342:877-883) により考案された方法を使用する。C h o t h i a 定義は、構造ループ領域の位置に基づく。しかしながら、C h o t h i a により使用された番号付け系の変化によって (例えば、<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html> および <http://www.bioinf.org.uk/abs/>、参照)、現在、この系はあまり一般的に使用されていない。CDRを定義するための他の系が存在し、また、2つのウェブサイトにおいても記載されている。

【0068】

これらの抗体のそれぞれがA c t R I I Bに結合することができる、抗原結合特異性が主にCDR1、2および3領域により提供されることを考えると、V_H CDR1、2および3配列ならびにV_L CDR1、2および3配列を「混合し、マッピングする」ことができる (すなわち、異なる抗体由来のCDRを混合し、マッピングすることができ、V_H CDR1、2および3ならびにV_L CDR1、2および3を含むそれぞれの抗体は、本発明の他の抗A c t R I I B結合分子を創造する)。このような「混合し、マッピングした」抗体のA c t R I I B結合は、上記されている、および実施例に記載されている結合アッセイ (例えば、E L I S A) を使用して試験することができる。V_H CDR配列を混合し、マッピングするとき、特定のV_H 配列由来のCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は、構造的に同様のCDR配列と置き換えられるべきである。同様に、V_L CDR配列を混合し、マッピングするとき、特定のV_L 配列由来のCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は、構造的に同様のCDR配列と置き換えられるべきである。新規V_H およびV_L 配列が1つ以上のV_H および/またはV_L CDR領域配列を本発明のモノクローナル抗体のために本明細書で示されるCDR配列由来の構造的に同様の配列と置き換えることにより創造できることが、当業者に容易に理解される。

【0069】

単離された組換え抗A c t R I I B抗体、またはそれらの抗原結合領域は、配列番号：1-14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；配列番号：15-28からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；配列番号：29-42からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；配列番号：43-56からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；配列番号：57-70からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：71-84からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3を有する。

【0070】

1つの態様において、抗体は、配列番号：1の重鎖可変領域CDR1；配列番号：15の重鎖可変領域CDR2；配列番号：29の重鎖可変領域CDR3；配列番号：43の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：57の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：71の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0071】

1つの態様において、抗体は、配列番号：2の重鎖可変領域CDR1；配列番号：16の重鎖可変領域CDR2；配列番号：30の重鎖可変領域CDR3；配列番号：44の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：58の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：72の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0072】

1つの態様において、抗体は、配列番号：3の重鎖可変領域CDR1；配列番号：17の重鎖可変領域CDR2；配列番号：31の重鎖可変領域CDR3；配列番号：45の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：59の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：73の軽鎖可変領域CDR3を含む。

10

【0073】

1つの態様において、抗体は、配列番号：4の重鎖可変領域CDR1；配列番号：18の重鎖可変領域CDR2；配列番号：32の重鎖可変領域CDR3；配列番号：46の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：60の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：74の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0074】

1つの態様において、抗体は、配列番号：5の重鎖可変領域CDR1；配列番号：19の重鎖可変領域CDR2；配列番号：33の重鎖可変領域CDR3；配列番号：47の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：61の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：75の軽鎖可変領域CDR3を含む。

20

【0075】

1つの態様において、抗体は、配列番号：6の重鎖可変領域CDR1；配列番号：20の重鎖可変領域CDR2；配列番号：34の重鎖可変領域CDR3；配列番号：48の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：62の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：76の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0076】

1つの態様において、抗体は、配列番号：7の重鎖可変領域CDR1；配列番号：21の重鎖可変領域CDR2；配列番号：35の重鎖可変領域CDR3；配列番号：49の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：63の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：77の軽鎖可変領域CDR3を含む。

30

【0077】

1つの態様において、抗体は、配列番号：8の重鎖可変領域CDR1；配列番号：22の重鎖可変領域CDR2；配列番号：36の重鎖可変領域CDR3；配列番号：50の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：64の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：78の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0078】

1つの態様において、抗体は、配列番号：9の重鎖可変領域CDR1；配列番号：23の重鎖可変領域CDR2；配列番号：37の重鎖可変領域CDR3；配列番号：51の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：65の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：79の軽鎖可変領域CDR3を含む。

40

【0079】

1つの態様において、抗体は、配列番号：10の重鎖可変領域CDR1；配列番号：24の重鎖可変領域CDR2；配列番号：38の重鎖可変領域CDR3；配列番号：52の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：66の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：80の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0080】

1つの態様において、抗体は、配列番号：11の重鎖可変領域CDR1；配列番号：25の重鎖可変領域CDR2；配列番号：39の重鎖可変領域CDR3；配列番号：53の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：67の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：81の軽鎖可変領域CDR3を含む。

50

【0081】

1つの態様において、抗体は、配列番号：12の重鎖可変領域CDR1；配列番号：26の重鎖可変領域CDR2；配列番号：40の重鎖可変領域CDR3；配列番号：54の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：68の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：82の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0082】

1つの態様において、抗体は、配列番号：13の重鎖可変領域CDR1；配列番号：27の重鎖可変領域CDR2；配列番号：41の重鎖可変領域CDR3；配列番号：55の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：69の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：83の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0083】

1つの態様において、抗体は、配列番号：14の重鎖可変領域CDR1；配列番号：28の重鎖可変領域CDR2；配列番号：42の重鎖可変領域CDR3；配列番号：56の軽鎖可変領域CDR1；配列番号：70の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号：84の軽鎖可変領域CDR3を含む。

【0084】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号：85の可変重鎖配列および配列番号：99の可変軽鎖配列；(b)配列番号：86の可変重鎖配列および配列番号：100の可変軽鎖配列；(c)配列番号：87の可変重鎖配列および配列番号：101の可変軽鎖配列；(d)配列番号：88の可変重鎖配列および配列番号：102の可変軽鎖配列；(e)配列番号：89の可変重鎖配列および配列番号：103の可変軽鎖配列；(f)配列番号：90の可変重鎖配列および配列番号：104の可変軽鎖配列；(g)配列番号：91の可変重鎖配列および配列番号：105の可変軽鎖配列；(h)配列番号：92の可変重鎖配列および配列番号：106の可変軽鎖配列；(i)配列番号：93の可変重鎖配列および配列番号：107の可変軽鎖配列；(j)配列番号：94の可変重鎖配列および配列番号：108の可変軽鎖配列；(k)配列番号：95の可変重鎖配列および配列番号：109の可変軽鎖配列；(l)配列番号：96の可変重鎖配列および配列番号：110の可変軽鎖配列；(m)配列番号：97の可変重鎖配列および配列番号：111の可変軽鎖配列；または(n)配列番号：98の可変重鎖配列および配列番号：112の可変軽鎖配列を含む抗体を提供する。

【0085】

1つの態様において、本発明は、(a)配列番号：146の重鎖配列および配列番号：141の軽鎖配列；(b)配列番号：147の重鎖配列および配列番号：142の軽鎖配列；(c)配列番号：148の重鎖配列および配列番号：143の軽鎖配列；(d)配列番号：149の重鎖配列および配列番号：144の軽鎖配列；(e)配列番号：150の重鎖配列および配列番号：145の軽鎖配列；(f)配列番号：156の重鎖配列および配列番号：151の軽鎖配列；(g)配列番号：157の重鎖配列および配列番号：152の軽鎖配列；(h)配列番号：158の重鎖配列および配列番号：153の軽鎖配列；(i)配列番号：159の重鎖配列および配列番号：154の軽鎖配列；または(j)配列番号：160の重鎖配列および配列番号：155の軽鎖配列を含む抗体を提供する。

【0086】

本明細書において使用されるヒト抗体は、抗体の可変領域または全長鎖がヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られるとき、特定の生殖細胞系配列の「産物」または「由来」である重鎖もしくは軽鎖可変領域または全長重鎖もしくは軽鎖を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有する遺伝子導入マウスを興味ある抗原で免疫化すること、またはファージディスプレイされたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーを興味ある抗原でスクリーニングすることを含む。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の「産物」または「由来」であるヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、ヒト抗体の配列と非常に近い配列（すなわち、同一性%が非常に高い）であるヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を選択することに

10

20

30

40

50

よりそれ自体同定することができる。特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の「産物」または「由来」であるヒト抗体は、例えば、天然体細胞変異または部位特異的変異の意図的導入による、生殖細胞系配列と比較してアミノ酸の違いを含み得る。しかしながら、選択されたヒト抗体は、一般的に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と、アミノ酸配列において少なくとも90%同一であり、他の種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウス生殖細胞系配列）と比較して、ヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含む。1つの場合において、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と、アミノ酸配列において少なくとも80%、90%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、97%、98%、または99%同一であり得る。一般的に、特定のヒト生殖細胞系配列由来のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と、わずか10個のアミノ酸の違いを示し得る。1つの場合において、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と、わずか5、またはわずか4、3、2もしくは1個のアミノ酸の違いを示し得る。

10

【0087】

1つの態様において、本発明の抗体は、pBW522またはpBW524によってコードされるものである（それぞれ寄託番号DSMZ 22873およびDSMZ 22874の下に、2009年8月18日付け、DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに寄託された）。

【0088】

相同抗体

さらに別の態様において、本発明の抗体は、本明細書に記載されている抗体のアミノ酸およびヌクレオチド配列と相同である全長重鎖および軽鎖アミノ酸配列；全長重鎖および軽鎖ヌクレオチド配列、可変領域重鎖および軽鎖ヌクレオチド配列、または可変領域重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有し、本発明の抗A c t R I I B抗体の所望の機能特性を維持している。

20

【0089】

例えば、本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離された組換え抗A c t R I I B抗体（またはそれらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質）を提供し、ここで：重鎖可変領域が配列番号：99-112からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、または少なくとも90%（好ましくは、少なくとも95、97または99%）同一であるアミノ酸配列を含み；軽鎖可変領域が配列番号：85-98からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、または少なくとも90%（好ましくは、少なくとも95、97または99%）同一であるアミノ酸配列を含み；抗体が以下の機能特性の少なくとも1つを示す：（i）インビトロまたはインビボでミオスタチン結合を阻害する、および／または（ii）Sma d依存経路を介する筋肉分化の阻害を減少させる。

30

【0090】

さらなる例において、本発明は、全長重鎖および全長軽鎖を含む単離された組換え抗A c t R I I B抗体（またはそれらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質）を提供し、ここで：全長重鎖が配列番号：146-150および156-160からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、または少なくとも90%（好ましくは、少なくとも95、97または99%）同一であるアミノ酸配列を含み；全長軽鎖が配列番号：141-145および151-155からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、または少なくとも90%（好ましくは、少なくとも95、97または99%）同一であるアミノ酸配列を含み；抗体が以下の機能特性の少なくとも1つを示す：（i）インビトロまたはインビボでミオスタチン結合を阻害する、および／または（ii）Sma d依存経路を介する筋肉分化の阻害を減少させる。好ましくは。このような抗体は、A c t R I I Bのリガンド結合ドメインに結合する。

40

【0091】

50

別の例において、本発明は、全長重鎖および全長軽鎖を含む単離された組換え抗 A c t R I I B 抗体（またはそれらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質）を提供し、ここで：全長重鎖が配列番号：166-170および176-180からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも80%、または少なくとも90%（好ましくは、少なくとも95、97または99%）同一であるヌクレオチド配列によってコードされ；全長軽鎖が配列番号：161-165および171-175からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも80%、または少なくとも90%（好ましくは、少なくとも95、97または99%）同一であるヌクレオチド配列によってコードされ；抗体が以下の機能特性の少なくとも1つを示す：（i）インビトロまたはインビボでミオスタチン結合を阻害する、および／または（i i）S m a d 依存経路を介する筋肉分化の阻害を減少させる。好ましくは、このような抗体は、A c t R I I B のリガンド結合ドメインに結合する。

10

【0092】

種々の態様において、抗体は上記の1つ以上の、2つ以上の、または3つの機能特性を示し得る。抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であり得る。好ましくは、抗体は完全ヒト I g G 1 抗体である。

【0093】

他の態様において、V_H および／または V_L アミノ酸配列は、上記の配列と80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。他の態様において、V_H および／または V_L アミノ酸配列は、わずか1、2、3、4または5個のアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を除いて同一であり得る。それぞれ配列番号99-112および配列番号：85-98のV_H および V_L 領域と高い（すなわち、80%以上）同一性を有するV_H および V_L 領域を有する抗体は、それぞれ核酸分子配列番号：127-140および113-126の変異誘発（例えば、部位特異的またはPCR-介在変異誘発）により得て、次に、本明細書に記載されている機能性アッセイを使用して、維持されている機能（すなわち、上記機能）についてコードされた改変された抗体を試験することができる。

20

【0094】

他の態様において、全長重鎖および／または全長軽鎖アミノ酸配列は、上記配列と80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。それぞれ、配列番号：146-150および156-160のいずれかの全長重鎖および配列番号：141-145および151-155のいずれかの全長軽鎖と、高い（すなわち、80%以上）同一性を有する全長重鎖および全長軽鎖を有する抗体は、それぞれ核酸分子配列番号：166-170および176-180ならびに配列番号：161-165および171-175の変異誘発（例えば、部位特異的またはPCR-介在変異誘発）により得て、次に、本明細書に記載されている機能性アッセイを使用して、維持されている機能（すなわち、上記機能）についてコードされた改変された抗体を試験することができる。

30

【0095】

他の態様において、全長重鎖および／または全長軽鎖ヌクレオチド配列は、上記配列と80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。

【0096】

他の態様において、重鎖および／または軽鎖ヌクレオチド配列の可変領域は、上記配列と80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。

40

【0097】

本明細書において使用される、2つの配列間のパーセント同一性は、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て、配列で共有される同一の位置の数の関数（すなわち、%同一性＝同一の位置の＃／位置の全＃×100）である。配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、以下に記載される数学アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0098】

50

2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、A L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. M e y e r sおよびW. M i l l e r (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) のアルゴリズムを使用して、P A M 1 2 0 ウェイト残基テーブル (weight residue table)、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用して決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間パーセント同一性は、G C G ソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>で利用できる) のG A P プログラムに組み込まれているN e e d l e m a n and W u n s c h (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) アルゴリズムを使用して、B l o s s o m 62マトリックスまたはP A M 2 5 0 マトリックスのいずれか、ならびにギャップウェイト16、14、12、10、8、6または4および長ウェイト1、2、3、4、5または6を使用して決定することができる。

10

【0099】

保存的修飾を有する抗体

1つの態様において、本発明の抗体は、C D R 1、C D R 2およびC D R 3配列を含む重鎖可変領域ならびにC D R 1、C D R 2およびC D R 3配列を含む軽鎖可変領域を有し、ここで、これらのC D R 配列の1つ以上が本明細書に記載されている抗体に基づいて記載されているアミノ酸配列またはそれらの保存的修飾を有し、抗体が本発明の抗A c t R I I B抗体の所望の機能特性を維持している。したがって、本発明は、C D R 1、C D R 2およびC D R 3配列を含む重鎖可変領域ならびにC D R 1、C D R 2およびC D R 3配列を含む軽鎖可変領域からなる単離された組換え抗A c t R I I B抗体、またはそれらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質を提供し、ここで：重鎖可変領域C D R 1アミノ酸配列が配列番号：1-14、およびそれらの保存的修飾からなる群から選択され；重鎖可変領域C D R 2アミノ酸配列が配列番号：15-28、およびそれらの保存的修飾からなる群から選択され；重鎖可変領域C D R 3アミノ酸配列が配列番号：29-42、およびそれらの保存的修飾からなる群から選択され；軽鎖可変領域C D R 1アミノ酸配列が配列番号：43-56、およびそれらの保存的修飾からなる群から選択され；軽鎖可変領域C D R 2アミノ酸配列が配列番号：57-70、およびそれらの保存的修飾からなる群から選択され；軽鎖可変領域C D R 3アミノ酸配列が配列番号：71-84、およびそれらの保存的修飾からなる群から選択される。好ましくは、抗体は、以下の機能特性の少なくとも1つを示す：(i) インビトロまたはインビボでミオスタチン結合を阻害する、および/または(ii) S m a d 依存経路を介する筋肉分化の阻害を減少させる。

20

30

【0100】

種々の態様において、抗体は、上記の機能特性の1つまたは両方を示し得る。このような抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であり得る

【0101】

他の態様において、哺乳動物細胞における発現のために最適化された本発明の抗体は、全長重鎖配列および全長軽鎖配列を有し、ここで、これらのC D R 配列の1つ以上が本明細書に記載されている抗体に基づいて記載されているアミノ酸配列またはそれらの保存的修飾を有し、抗体が本発明の抗A c t R I I B抗体の所望の機能特性を維持している。したがって、本発明は、全長重鎖および全長軽鎖からなる哺乳動物細胞における発現のために最適化された単離されたモノクローナル抗A c t R I I B抗体を提供し、ここで：全長重鎖が配列番号：146-150および156-160群から選択されるアミノ酸配列、およびそれらの保存的修飾を有し；全長軽鎖が配列番号：141-145および151-155の群から選択されるアミノ酸配列、およびそれらの保存的修飾を有し；抗体は、以下の機能特性の少なくとも1つを示す：(i) インビトロまたはインビボでミオスタチン結合を阻害する、および/または(ii) S m a d 依存経路を介する筋肉分化の阻害を減少させる。

40

【0102】

種々の態様において、抗体は、上記の機能特性の1つまたは両方を示し得る。このような抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であり得る

【0103】

50

本明細書において使用される「保存的配列修飾」なる用語は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意に影響しないか、または改変しないアミノ酸修飾を示すことが意図される。このような保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。修飾は、当該分野で知られている標準技術、例えば、部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発により本発明の抗体に導入することができる。

【0104】

保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベーター分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族性側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。したがって、本発明の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基が同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と置き換えることができ、改変された抗体は、本明細書に記載されている機能性アッセイを使用して維持されている機能について試験することができる。

10

【0105】

本発明の抗A c t R I I B抗体と同じエピトープに結合する抗体

20

別の態様において、本発明は、本明細書に記載されている本発明の種々の特定の抗A c t R I I B抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。A c t R I I Bに対するミオスタチン結合を阻止することができる実施例に記載されている全ての抗体は、高親和性を有するA c t R I I Bにおける配列番号：181のアミノ酸19-134間に含まれる同じエピトープに結合する。

【0106】

したがって、さらなる抗体は、標準A c t R I I B結合アッセイにおいて本発明の他の抗体と交差競合する（例えば、統計的に有意な様式において結合を競合的に阻害する）能力に基づいて同定することができる。本発明の抗体のヒトA c t R I I Bへの結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がヒトA c t R I I Bに結合する抗体と競合することができ；このような抗体が、非限定的な理論によって、競合する抗体とヒトA c t R I I Bにおける同じまたは関連する（例えば、構造的に同様の、または空間的に近接な）エピトープに結合し得ることを証明する。1つの態様において、ヒトA c t R I I B上における本発明の抗体と同じエピトープに結合する抗体は、ヒト組換え抗体である。このようなヒト組換え抗体は、実施例に記載されているとおりに調製および単離することができる。

30

【0107】

したがって、本発明は、配列番号：85に記載されている可変重鎖配列および配列番号：99に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0108】

したがって、本発明は、配列番号：86に記載されている可変重鎖配列および配列番号：100に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

40

【0109】

したがって、本発明は、配列番号：87に記載されている可変重鎖配列および配列番号：101に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0110】

したがって、本発明は、配列番号：88に記載されている可変重鎖配列および配列番号：102に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合

50

する抗体を提供する。

【0111】

したがって、本発明は、配列番号：89に記載されている可変重鎖配列および配列番号：103に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0112】

したがって、本発明は、配列番号：90に記載されている可変重鎖配列および配列番号：104に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0113】

したがって、本発明は、配列番号：91に記載されている可変重鎖配列および配列番号：105に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0114】

したがって、本発明は、配列番号：92に記載されている可変重鎖配列および配列番号：106に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0115】

したがって、本発明は、配列番号：93に記載されている可変重鎖配列および配列番号：107に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0116】

したがって、本発明は、配列番号：94に記載されている可変重鎖配列および配列番号：108に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0117】

したがって、本発明は、配列番号：95に記載されている可変重鎖配列および配列番号：109に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0118】

したがって、本発明は、配列番号：96に記載されている可変重鎖配列および配列番号：110に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0119】

したがって、本発明は、配列番号：97に記載されている可変重鎖配列および配列番号：111に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0120】

したがって、本発明は、配列番号：98に記載されている可変重鎖配列および配列番号：112に記載されている可変軽鎖配列を有する抗体により認識されるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0121】

さらに詳細なエピトープマッピング試験にしたがって、本発明の好ましい抗体結合領域がより明白に定義されている。

【0122】

したがって、本発明は、配列番号：181のアミノ酸78-83（WLDDFN-配列番号：188）を含むエピトープに結合する抗体を提供する。

【0123】

本発明は、また、配列番号：181のアミノ酸76-84（GCWLDDFNC-配列番号：186）を含むエピトープに結合する抗体を提供する。

10

20

30

40

50

【0124】

本発明は、また、配列番号：181のアミノ酸75-85（KGCWLDDFN CY-配列番号：190）を含むエピトープに結合する抗体を提供する。

【0125】

本発明は、また、配列番号：181のアミノ酸52-56（EQDKR-配列番号：189）を含むエピトープに結合する抗体を提供する。

【0126】

本発明は、また、配列番号：181のアミノ酸49-63（CEGEQDKRLHCYASW-配列番号：187）を含むエピトープに結合する抗体を提供する。

【0127】

本発明は、また、これらの配列からなるエピトープまたはこれらのエピトープ領域の組合せを含むエピトープに結合する抗体を提供する。

【0128】

したがって、本発明は、また、配列番号：181のアミノ酸78-83（WLDDFN）および配列番号：181のアミノ酸52-56（EQDKR）を含むか、またはからなるエピトープに結合する抗体を提供する。

【0129】

操作および修飾された抗体

本発明の抗体は、さらに、出発抗体からの改変された特性を有し得る修飾された抗体を操作する出発物質として、本明細書に示されている1つ以上の V_H および/または V_L 配列を有する抗体を使用して製造することができる。抗体は、1つまたは両方の可変領域（すなわち V_H および/または V_L ）内で、例えば、1つ以上のCDR領域内および/または1つ以上のフレームワーク領域内で、1つ以上の残基を修飾することにより操作することができる。さらに、またはあるいは、抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能を改変するように、定常領域内で残基を修飾することにより操作することができる。

【0130】

実施することができる可変領域操作の1つの型はCDRグラフティングである。抗体は、6つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域（CDR）に位置するアミノ酸残基を介して主に標的抗原と相互作用する。この理由のため、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも個々の抗体間で異なっている。CDR配列がほとんどの抗体-抗原相互作用に参与するため、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列上にグラフトされた特定の天然抗体由来のCDR配列を含む発現ベクターを構築することにより、特定の天然抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現することが可能である（例えば、Riechman, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winterの米国特許第5, 225, 539号、ならびにQueen et al.の米国特許第5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762および6, 180, 370号、参照）。

【0131】

したがって、本発明の別の態様は、それぞれ、配列番号：1-14からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1配列；配列番号：15-28からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR2配列；配列番号：29-42からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR3配列を含む重鎖可変領域；ならびに、それぞれ、配列番号：43-56からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR1配列；配列番号：57-70からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDR2配列；および配列番号：71-84からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるCDR3配列を有する軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗A c t R I I B抗体、またはそれらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質に関する。したがって、このような抗体は、モノクローナル抗体の V_H および V_L のCDR配列を含むが、これらの抗体と異なるフレームワーク配列を含み得る。

【0132】

このようなフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体の遺伝子配列を含む公共DNAデータベースまたは公開された文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子に対する生殖細胞系のDNA配列は、「V B a s e」ヒト生殖細胞系の配列データベース（インターネットにおいてwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで入手可能）、ならびにKabat, E. A., et al., [上記]; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836において見出すことができる。

【0133】

本発明の抗体における使用のためのフレームワーク配列の例は、選択された本発明の抗体により使用されるフレームワーク配列、例えば、本発明のモノクローナル抗体により使用されるコンセンサス配列および／またはフレームワーク配列と構造的に同様であるものである。V_HのCDR1、2および3配列ならびにV_LのCDR1、2および3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子において見られるものと同じの配列を有するフレームワーク領域上にグラフトでき、または、CDR配列は、生殖細胞系配列と比較して1つ以上の変異を含むフレームワーク領域上にグラフトできる。例えば、特定の例において、抗体の抗原結合能を維持または増強するためにフレームワーク領域内の残基を変異させることが有益であることが見出されている（例えば、Queen et alの米国特許5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762および6, 180, 370、参照）。

【0134】

可変領域修飾の別の型は、V_Hおよび／またはV_LのCDR1、CDR2および／またはCDR3領域内のアミノ酸残基を変異させ、それにより興味ある抗体の1つ以上の結合特性（例えば、親和性）を改善させることであり、これは「親和性成熟」として知られる。部位特異的変異誘発またはPCR介在変異誘発は、変異、抗体結合における効果または興味ある他の機能特性を導入するために実施でき、本明細書に記載されている、および実施例に提供されているインビトロまたはインビボでのアッセイにおいて評価することができる。保存的修飾（上記のとおり）を導入することができる。該変異は、アミノ酸置換、付加または欠失であり得る。さらに、一般的にCDR領域内のわずか1、2、3、4または5個の残基が変異される。

【0135】

したがって、別の態様において、本発明は、配列番号：1-14を有する群から選択されるアミノ酸配列を有するからなるV_HのCDR1領域、もしくは配列番号：1-14と比較して1、2、3、4または5個のアミノ酸置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列；配列番号：15-28からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_HのCDR2領域、もしくは配列番号：15-28と比較して1、2、3、4または5個のアミノ酸置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列；配列番号：29-42からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_HのCDR3領域、もしくは配列番号：29-42と比較して1、2、3、4または5個のアミノ酸置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域からなる；配列番号：43-56からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_LのCDR1領域、もしくは配列番号：43-56と比較して1、2、3、4または5個のアミノ酸置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列；配列番号：52-70からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_LのCDR2領域、もしくは配列番号：52-70と比較して1、2、3、4または5個のアミノ酸置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列；ならびに配列番号：71-84からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV_LのCDR3領域、もしくは配列番号：71-84と比較して1、2、3、4または5個のアミノ酸置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列を有する単離された抗A c t R I I Bモノクローナル抗体、またはそれらの抗原結合部分を含む機能性タンパク質を提供する。

【0136】

代替のフレームワークまたはスカフォールド(scaffold)への抗原結合ドメインのグラフト

イング

多種多様の抗体／免疫グロブリンのフレームワークまたはスカフォールドは、得られたポリペプチドが A c t R I I B に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合領域を含む限り、使用することができる。このようなフレームワークまたはスカフォールドは、ヒト免疫グロブリンの 5 つの主要なイデオタイプ、またはそれらのフラグメント（例えば、本明細書の他で開示されているもの）を含み、他の動物種の免疫グロブリン、好ましくはヒト化の局面を有するものを含む。単一の重鎖抗体、例えば、ラクダにおいて同定されたものは、この点で特に重要である。新規フレームワーク、スカフォールドおよびフラグメントは、当業者により発見および開発され続けている。

【0137】

1 つの局面において、本発明は、本発明の C D R をグラフトすることができる非免疫グロブリンのスカフォールドを使用して非免疫グロブリンベースの抗体を作製することに関する。既知または未知の非免疫グロブリンのフレームワークおよびスカフォールドは、配列番号：181 の標的タンパク質に特異的な結合領域（好ましくは、配列番号：182 に示されているそれらのリガンド結合ドメイン）を含む限り、使用され得る。このような化合物は、「標的特異的な結合領域を含むポリペプチド」として本明細書において知られる。非免疫グロブリンのフレームワークの例は、以下のセクション（ラクダ抗体および非抗体スカフォールド）でさらに記載されている。

【0138】

ラクダ抗体

新世界(New World)メンバー、例えば、ラマ種 (*Lama paccos*, *Lama glama* および *Lama vicugna*) を含むラクダおよびヒトコブラクダ科 (*Camelus bactrianus* および *Camelus dromedarius*) のメンバーから得られる抗体タンパク質は、サイズ、構造的複雑性およびヒト対象に対する抗原性に対して特徴付けられている。この科の哺乳動物において自然に見られる特定の I g G 抗体は軽鎖を欠き、したがって他の動物の抗体において典型的な 2 つの重鎖および 2 つの軽鎖を有する 4 鎖の四次構造とは構造的に異なる (W O 9 4 / 0 4 6 7 8 参照)。

【0139】

V_{H H} として同定された小さい 1 本の可変ドメインであるラクダ抗体の領域は、標的に対して高い親和性を有する小さいタンパク質を得るための遺伝子工学により得ることができる、「ラクダナノボディ」として既知の低分子量抗体由来タンパク質が得られる (U S 5 , 7 5 9 , 8 0 8 ; Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; および Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520 参照)。ラクダ抗体および抗体フラグメントの操作されたライブラリーは、例えば、A b l y n x、G h e n t、B e l g i u m から市販されている。非ヒト起源の他の抗体に関して、ラクダ抗体のアミノ酸配列はヒト配列をより密接に似ている配列を得るために組換え的に改変させることができる、すなわち、ナノボディはヒト化することができる。したがって、ヒトに対するラクダ抗体の本来の低い抗原性をさらに低減することができる。

【0140】

ラクダナノボディは、ヒト I g G 分子の分子量の約 1 / 1 0 を有し、該タンパク質はわずか数ナノメートルの物理的直径を有する。小さいサイズの 1 つの結果は、より大きい抗体タンパク質によっては機能的に見えない抗原部位に結合するラクダナノボディの能力であり、すなわち、ラクダナノボディは従来の免疫技術を使用して他の方法では隠れている抗原を検出する試薬、および可能性としては治療剤として有用である。したがって、小さいサイズのさらなる結果は、ラクダナノボディが標的タンパク質の溝または狭い切れ目の特定の部位に結合する結果として阻害することができ、したがって従来の抗体よりも従来の低分子量薬物の機能とより密接に似ている能力で働き得ることである。

【0141】

さらに、低分子量および緻密化サイズの結果、ラクダナノボディが極めて熱安定性であり、極端な pH およびタンパク質分解消化に対して安定であり、抗原性が低い。さらなる結果は、ラクダナノボディが循環系から組織へ、血液脳関門を介する場合でも容易に移動し、神経組織に影響する障害を処置することができることである。さらにナノボディは、血液脳関門を介する薬物輸送を促進することができる (US 2004/0161738 参照)。これらの特徴は、ヒトにおける低い抗原性と結合して、大きな治療的可能性を示す。さらに、これらの分子は、原核細胞、例えば、大腸菌において完全に発現することができ、バクテリオファージで融合タンパク質として発現し、機能性である。

【0142】

したがって、本発明の特徴は、ActRIIB に対して高い親和性を有するラクダ抗体またはナノボディである。本明細書における 1 つの態様において、ラクダ抗体またはナノボディは、ラクダ動物で自然に生産され、すなわち ActRIIB またはそのペプチドフラグメントで免疫化した後、他の抗体に関して本明細書に記載されている技術を使用してラクダにより生産される。あるいは、抗 ActRIIB ラクダナノボディは、例えば、適当に変異させたラクダナノボディタンパク質を提示するファージのライブラリーから標的として本明細書の実施例に記載されている ActRIIB を使用したパンニング法を使用してにより操作、すなわち生産される。さらに、操作されたナノボディを、レシピエント対象において 45 分から 2 週間の半減期を有するように遺伝子操作によりカスタマイズすることができる。特定の態様において、ラクダ抗体またはナノボディは、例えば、WO 94/04678 に記載されているナノボディまたは単一のドメイン抗体フレームワーク配列に、本発明のヒト抗体の重鎖または軽鎖の CDR 配列をグラフティングすることにより得られる。

【0143】

非抗体スカフォールド

既知の非免疫グロブリンのフレームワークまたはスカフォールドは、アドネクチン (フィブロネクチン) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、アンキリン (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、ドメイン抗体 (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) and Ablynx nv (Zwijnaarde, Belgium))、リボカリン (アンティカリン) (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小分子免疫医薬 (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、マキシボディ (Avidia, Inc. (Mountain View, CA))、プロテイン A (Affibody AG, Sweden) およびアフィリン (ガンマークリスタリンまたはユビキチン) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)、タンパク質エピトープ模倣物 (Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland) を含むが、これらに限定されない。

【0144】

(i) フィブロネクチンスカフォールド

フィブロネクチンスカフォールドは、好ましくはフィブロネクチン III 型ドメイン (例えば、フィブロネクチン III 型の 10 番目のモジュール (10 Fn3 ドメイン)) に基づく。フィブロネクチン III 型ドメインは、互いにバックしてタンパク質のコアを形成する 2 つのベータシート間に分布している 7 または 8 個のベータストランドを有し、さらにベータストランドに互いに接続し、溶媒に暴露されるループ (CDR に類似する) を含む。ベータストランドの方向と垂直なタンパク質の境界である、ベータシートサンドイッチのそれぞれのエッジで少なくとも 3 つのこのようなループが存在する (US 6, 818, 418)。

【0145】

これらのフィブロネクチンベースのスカフォールドは免疫グロブリンではないが、全体の折りたたみは、ラクダおよびラマ IgG における全体の抗原認識単位を含む重鎖の可変領域である最も小さい機能性抗体フラグメントのものと密接に関連している。この構造のため、非免疫グロブリン抗体は、性質および親和性において抗体のものと類似している抗原結合特性を模倣する。これらのスカフォールドは、ループのランダム化およびインビボでの抗体の親和性成熟のプロセスと同様であるインビトロでのシャッフリング戦略にお

いて使用することができる。これらのフィブロネクチンベースの分子は、分子のループ領域を標準クローニング技術を使用して本発明のCDRと置き換えることができるスカフォールドとして使用することができる。

【0146】

(ii) アンキリン-Molecular Partners

技術は、異なる標的への結合に対して使用することができる可変領域を支えるためのスカフォールドとして、アンキリン由来反復モジュールを有するタンパク質を使用することに基づく。アンキリン反復モジュールは、2つの抗平行 α -ヘリックスおよび β -ターンからなる33個のアミノ酸ポリペプチドである。可変領域の結合は、リボソームディスプレイを使用することによりほぼ最適化される。

10

【0147】

(iii) マキシボディ/アビマー(Avimer)-Avidia

アビマーは、タンパク質、例えば、LRP-1を含む天然A-ドメイン由来である。これらのドメインは、もともとタンパク質-タンパク質相互作用に使用され、ヒトにおいて、250を越えるタンパク質が構造的にA-ドメインに基づく。アビマーは、アミノ酸リンカーを介して連結される多くの異なる「A-ドメイン」モノマー(2-10)からなる。アビマーは、例えば、US2004/0175756; US2005/0053973; US2005/0048512; およびUS2006/0008844に記載されている方法論を使用して、標的抗原に結合することができるように作製することができる。

20

【0148】

(vi) プロテインA-Affibody

Affibody (登録商標) アフィニティリガンドは、プロテインAのIgG-結合ドメインの1つのスカフォールドに基づく3つのヘリックスバンドを含む小さく単純なタンパク質である。プロテインAは、黄色ブドウ球菌の表面タンパク質である。このスカフォールドドメインは58個のアミノ酸からなり、そのうちの13個は、多くのリガンド変異体を有するAffibody (登録商標) ライブラリーを生産するようにランダム化される(例えば、US5,831,012参照)。Affibody (登録商標) 分子は抗体を模倣し、150kDaである抗体の分子量と比較して6kDaの分子量を有する。サイズが小さいにもかかわらず、Affibody (登録商標) 分子の結合部位は、抗体のものと同様である。

30

【0149】

(v) Anticalin-Pieris

Anticalin (登録商標) は、Pieris ProteoLab AGにより開発された製品である。それらは、通常、生理学的輸送または化学的感受性もしくは不溶性化合物の保存に関与する小さく強力なタンパク質の広範なグループであるリポカリンに由来する。いくつかの天然のリポカリンは、ヒト組織または体液に存在する。

【0150】

該タンパク質構造は、堅いフレームワークの上に超可変ループを有しており、免疫グロブリンに似ている。しかしながら、抗体またはそれらの組換えフラグメントと対照的に、リポカリンは、160から180個のアミノ酸残基を有する単一のポリペプチド鎖を含み、単一の免疫グロブリンドメインよりもほんのわずかに大きい。

40

【0151】

結合ポケットを構成する4つのループのセットは、顕著な構造可塑性を示し、種々の側鎖を許容する。したがって、結合部位は、高親和性および特異性で異なる形状の所定の標的分子を認識するために、独自のプロセスにおいて再形成することができる。

【0152】

リポカリンファミリーの1つのタンパク質であるPieris brassicaeのビリン結合タンパク質(BBP)は、4つのループのセットを変異させることによりanticalinの開発に使用されている。「anticalin」を記載している特許出願の例は、WO1999/16873である。

50

【0153】

(v i) アフィリン-Sc i l P r o t e i n s

アフィリン^{T M}分子は、タンパク質および小分子に対する特異的親和性のために設計される小さい非免疫グロブリンタンパク質である。新規アフィリン^{T M}分子は、それぞれ異なるヒト由来スカフォールドタンパク質に基づく2つのライブラリーから非常に迅速に選択することができる。

【0154】

アフィリン^{T M}分子は、免疫グロブリンタンパク質と構造相同性を示さない。Sc i l P r o t e i n sは、一方がヒト眼球レンズの構造タンパク質であるガンマークリスタリンであり他方が「ユビキチン」スーパーファミリータンパク質である2つのアフィリン^{T M}スカフォールドを使用する。ヒトスカフォールドの両方が非常に小さく、高い温度安定性を示し、pH変化および変性剤にほとんど抵抗性である。この高い安定性は、主にタンパク質の拡張されたベータシートによる。ガンマークリスタリン由来タンパク質の例は、WO2001/004144に記載されており、「ユビキチン様」タンパク質の例は、WO2004/106368に記載されている。

【0155】

(v i i) タンパク質エピトープ模擬物 (P E M)

P E Mは、タンパク質のベターヘアピン二次構造を模倣する中サイズの環状ペプチド様分子(MW 1-2 k D a)であり、主要な二次構造は、タンパク質-タンパク質相互作用に参与する。

【0156】

フレームワークまたはF c 操作

本発明の操作された抗体は、修飾が、例えば、抗体の特性を改善するように、V_Hおよび/またはV_L内のフレームワーク残基に作られているものを含む。一般的に、このようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減少させるように作られる。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列に「復帰変異」することである。さらに具体的には、体細胞変異を行った抗体は、抗体が由来する生殖細胞系配列と異なるフレームワーク残基を含み得る。このような残基は、抗体が由来する生殖細胞系配列と抗体のフレームワーク配列を比較することにより同定することができる。フレームワーク領域の配列をこれらの生殖細胞系構成に戻すために、体細胞変異は、例えば、部位特異的変異誘発またはP C R介在変異誘発により、生殖細胞系配列に「復帰変異」することができる。このような「復帰変異」抗体もまた、本発明により包含されると意図される。

【0157】

別のタイプのフレームワーク修飾は、フレームワーク領域内または1つ以上のC D R領域内の1つ以上の残基を変異し、T細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的な免疫原性を減少させることを含む。このアプローチは、また「脱免疫化」と呼ばれ、U S 2003/0153043により詳細に記載されている。

【0158】

フレームワークまたはC D R領域内で作られた修飾に加えて、またはその代わりに、本発明の抗体は、一般的に1つ以上の抗体の機能特性、例えば、血清半減期、補体結合、F c受容体結合および/または抗原依存性細胞毒性を改変するように、F c領域内に修飾を含むように操作され得る。さらに、本発明の抗体は、再び抗体の1つ以上の機能特性を改変するように、化学的に修飾され得る（例えば、1つ以上の化学部分を抗体に結合することができる）、またはそのグリコシル化を改変して修飾され得る。これらの態様のそれぞれは、以下でさらに詳細に記載されている。F c領域の残基の番号は、K a b a t のE U インデックスのものである。

【0159】

1つの態様において、C H 1のヒンジ領域は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が改変される、例えば増加または減少させるように修飾される。このアプローチは、U S 5,

10

20

30

40

50

677, 425にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖と重鎖の集合を容易にするか、または抗体の安定性を増加または減少させるように改変される。

【0160】

別の態様において、抗体のFcヒンジ領域を、抗体の生物学的半減期を減少させるように変異する。さらに具体的には、抗体が、天然Fc-ヒンジドメインSpA結合と比較して、ブドウ球菌プロテインA (SpA) 結合を損なうように、Fc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメイン接合領域に1つ以上のアミノ酸変異を導入する。このアプローチは、US6, 165, 745にさらに詳細に記載されている。

【0161】

10

別の態様において、抗体は、生物学的半減期を増加させるように修飾される。種々のアプローチが可能である。例えば、US6, 277, 375に記載されているとおり1つ以上の以下の変異を導入することができる：T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるように、抗体は、US5, 869, 046およびUS6, 121, 022に記載されているIgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得られるサルベージ(salvage)受容体結合エピトープを含むように、CH1またはCL領域内で改変することができる。

【0162】

20

さらに他の態様において、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を改変するように少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に置換することにより改変される。例えば、1つ以上のアミノ酸は、抗体がエフェクターリガンドに対する改変された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を維持するように、異なるアミノ酸残基と置換することができる。親和性が改変されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。このアプローチは、両方ともWinter et al.によるUS5, 624, 821およびUS5, 648, 260にさらに詳細に記載されている。特に、残基234および235を変異し得る。特に、これらの変異はアラニンへであり得る。したがって、1つの態様において、本発明の抗体は、アミノ酸234および235の1つまたは両方でFc領域における変異を有する。別の態様において、アミノ酸234および235の1つまたは両方がアラニンに置換され得る。アミノ酸234および235の両方のアラニンへの置換は、ADCC活性の減少をもたらす。

30

【0163】

別の態様において、アミノ酸残基から選択される1つ以上のアミノ酸は、抗体が改変されたC1q結合および／または減少もしくは破壊された補体依存性細胞毒性(CDC)を有するように、異なるアミノ酸残基と置換することができる。このアプローチは、US6, 194, 551にさらに詳細に記載されている。

【0164】

別の態様において、1つ以上のアミノ酸残基を改変し、補体を固定する抗体の能力を改変する。このアプローチは、WO94/29351にさらに記載されている。

【0165】

40

さらに別の態様において、Fc領域は、抗体依存性細胞毒性(ADCC)を介在する抗体の能力を増加させる、および／またはFcγ受容体に対する抗体の親和性を増加させるように、1つ以上のアミノ酸を修飾することにより修飾される。このアプローチは、WO00/42072にさらに記載されている。さらに、FcγRI、FcγRII、FcγRIIIおよびFcRnに対するヒトIgG1上の結合部位はマッピングされ、改善された結合を有する変異体が記載されている(Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604参照)。

【0166】

さらに別の態様において、抗体のグリコシル化を修飾する。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる(すなわち、該抗体はグリコシル化を欠く)。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように修飾することができる。このよ

50

うな糖質修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を改変することにより、達成することができる。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらし、それによりその部位におけるグリコシル化を除去するように、1つ以上のアミノ酸置換を作ることができる。このような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。このようなアプローチは、C o e t a l. による米国特許第5, 714, 350および6, 350, 861号にさらに詳細に記載されている。

【0167】

さらに、またはあるいは、グリコシル化の改変された型を有する抗体、例えば、減少した量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体、または増加したバイセクティング(bisecting)G l c N a c 構造を有する抗体を作ることができる。このような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のA D C C能力を増加させることが証明されている。このような糖質修飾は、例えば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞で抗体を発現することにより成し遂げることができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は、当該分野で報告されており、本発明の組換え抗体を発現し、改変されたグリコシル化を有する抗体を生産する宿主細胞として使用することができる。例えば、H a n g e t a l. によるE P 1, 176, 195は、細胞系において発現される抗体が低フコシル化を示すように、機能的に破壊されたF U T 8遺伝子（フコシルトランスフェラーゼをコードする）を有する細胞株について記載している。したがって、1つの態様において、本発明の抗体は、低フコシル化パターンを示す細胞系、例えば、フコシルトランスフェラーゼをコードするF U T 8遺伝子の発現欠損の哺乳動物細胞系における組換え発現により生産される。W O 03/035835は、フコースをA s n (297)一連結糖質に接合する能力が低下し、宿主細胞において発現される抗体の低フコシル化も引き起こす変異体C H O細胞系であるL e c 13細胞を記載している(Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照)。W O 99/54342は、操作された細胞系において発現された抗体が増加したバイセクティングG l c N a c構造を示し、抗体の増加したA D C C活性をもたらすように、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ(1, 4) - NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI I I (G n T I I I))を発現するように操作された細胞系を記載している(Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180も参照)。あるいは、本発明の抗体は、哺乳動物様グリコシル化パターンについて改変され、グリコシル化パターンとしてフコースを欠く抗体を生産することができる酵母または糸状菌において生産することができる（例えば、E P 1297172 B 1参照）。

【0168】

本発明によって意図されている本抗体の別の修飾はペグ化である。抗体は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させるようにペグ化することができる。抗体をペグ化するために、抗体またはそのフラグメントを、一般的に、1つ以上のP E G基が抗体または抗体フラグメントに結合する条件下で、ポリエチレングリコール(P E G)、例えば、反応性エステルまたはP E Gのアルデヒド誘導体と反応させる。ペグ化は、反応性P E G分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とアシル化反応またはアルキル化反応することにより実施することができる。本明細書において使用される、「ポリエチレングリコール」なる用語は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているP E Gのあらゆる形態、例えば、モノ(C 1 - C 10)アルコキシまたはアリーロキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドを包含することを意図する。1つの態様において、ペグ化される抗体は非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は、当該分野で知られており、本発明の抗体に適用することができる（例えば、E P 0154316およびE P 0401384参照）。

【0169】

本発明に意図される抗体の別の修飾は、得られる分子の半減期を増加させるような、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域と血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンまたはそのフラグメントとの抱合体またはタンパク質融合である（例えば、E P 03220

94 参照)。

【0170】

別の可能性は、得られる分子の半減期を増加させるような、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域と血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンに結合することができるタンパク質との融合である（例えば、EP0486525 参照）。

【0171】

改変された抗体を操作する方法

上記のとおり、本明細書に示される V_H および V_L 配列または全長重鎖および軽鎖配列を有する抗 A c t R I I B 抗体を、全長重鎖および／または軽鎖配列、 V_H および／または V_L 配列、またはこれらに結合する定常領域を修飾することにより、新規抗 A c t R I I B 抗体を創造するために使用することができる。したがって、本発明の別の局面において、本発明の抗 A c t R I I B 抗体の構造的特徴は、本発明の抗体の少なくとも1つの機能特性、例えば、ヒト A c t R I I B への結合を維持するが、A c t R I I B の1つ以上の機能特性（例えば、S m a d 活性化の阻害）を阻害する構造的に関連する抗 A c t R I I B 抗体を創造するために使用される。

【0172】

例えば、本発明の抗体の1つ以上の C D R 領域またはそれらの変異体は、上記のとおり、既知のフレームワーク領域および／または他の C D R と組換え的に組み合わせられ、さらなる組換え的に操作された本発明の抗 A c t R I I B 抗体を創造することができる。修飾の他の型は、以前のセクションにおいて記載されているものを含む。操作する方法のための出発物質は、本明細書において提供される1つ以上の V_H および／または V_L 配列または1つ以上のそれらの C D R 領域である。操作された抗体を創造するために、本明細書において提供される1つ以上の V_H および／または V_L 配列または1つ以上のそれらの C D R 領域を有する抗体を実際に調製する（すなわち、タンパク質として発現する）必要はない。むしろ、配列に含まれる情報が、元の配列由来の「第二世代」配列を創造するために出発物質として使用され、次に「第二世代」配列がタンパク質として調製され発現される。

【0173】

したがって、別の態様において、本発明は、配列番号：1-14 からなる群から選択される C D R 1 配列、配列番号：15-28 からなる群から選択される C D R 2 配列および／または配列番号：29-42 からなる群から選択される C D R 3 配列を有する重鎖可変領域抗体配列；ならびに配列番号：43-56 からなる群から選択される C D R 1 配列、配列番号：57-70 からなる群から選択される C D R 2 配列および／または配列番号：71-84 からなる群から選択される C D R 3 配列を有する軽鎖可変領域抗体配列からなる抗 A c t R I I B 抗体を調製し；少なくとも1個の改変された抗体配列を創造するように、重鎖可変領域抗体配列および／または軽鎖可変領域抗体配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を改変し；タンパク質として改変された抗体配列を発現するための方法を提供する。

【0174】

したがって、別の態様において、本発明は、配列番号：146-150 および 156-160 の群から選択される配列を有する全長重鎖抗体配列；ならびに配列番号：141-145 および 151-155 の群から選択される配列を有する全長軽鎖抗体配列からなる哺乳動物細胞における発現に最適化された抗 A c t R I I B 抗体を調製し；少なくとも1つの改変された抗体配列を創造するように、全長重鎖抗体配列および／または全長軽鎖抗体配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を改変し；タンパク質として改変された抗体配列を発現するための方法を提供する。

【0175】

改変された抗体配列は、また、配列番号：29-42 および配列番号：71-84 からなる群から選択される固定された C D R 3 配列または U S 2 0 0 5 / 0 2 5 5 5 5 2 に記載されている最小必須結合決定基ならびに C D R 1 および C D R 2 配列における多様性を

有する抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより調製することができる。スクリーニングは、抗体ライブラリーから抗体をスクリーニングするために適当な任意のスクリーニング技術、例えば、ファージディスプレイ技術にしたがって実施することができる。

【0176】

標準分子生物学技術は、改変された抗体配列を調製および発現するために使用することができる。改変された抗体配列によってコードされる抗体は、本明細書に記載されている抗A c t R I I B抗体の機能特性の1つ、いくつかまたは全てを維持しているものであり、ここで、該機能特性は、ヒトA c t R I I Bに特異的な結合およびS m a d活性化の阻害を含むが、これらに限定されない。

【0177】

改変された抗体は、1つ以上、2つ以上または3つ以上の上記機能特性を示し得る。

改変された抗体の機能特性は、当該分野で利用できる、および／または本明細書に記載されている標準アッセイ、例えば、実施例に記載されているもの（例えば、E L I S A）を使用して評価することができる。

【0178】

本発明の抗体を操作する方法の1つの態様において、変異は、抗A c t R I I B抗体コード配列の全てまたは一部にランダム的または選択的に導入することができ、得られる修飾された抗A c t R I I B抗体は、本明細書に記載されている結合活性および／または他の機能特性についてスクリーニングすることができる。変異方法は、当該分野で公開されている。例えば、W O 0 2 / 0 9 2 7 8 0 は、飽和変異誘発、合成ライゲーションアセンブリまたはそれらの組合せを使用して抗体変異を創造およびスクリーニングするための方法を記載している。あるいは、W O 0 3 / 0 7 4 6 7 9 は、抗体の物理化学的特性を最適化するためのコンピューター使用のスクリーニング方法を使用する方法を記載している。

【0179】

本発明の抗体をコードする核酸分子

本発明の別の局面は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。哺乳動物細胞における発現のために最適化された全長軽鎖ヌクレオチド配列の例は、配列番号：1 6 1 - 1 6 5 および1 7 1 - 1 7 5 に示されている。哺乳動物細胞における発現のために最適化された全長重鎖ヌクレオチド配列の例は、配列番号：1 6 6 - 1 7 0 および1 7 6 - 1 8 0 に示されている。

【0180】

核酸は、細胞溶解物において細胞全体に存在してもよく、または部分的に精製された、もしくは実質的に純粋な形態であってもよい。核酸は、アルカリ／S D S 処理、C s C l 結合、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当該分野でよく知られているその他のものを含む標準技術により、他の細胞成分または他の汚染物質、例えば、他の細胞核酸またはタンパク質から精製されたとき、「単離された」または「実質的に純粋にされた」である。F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York、参照。本発明の核酸は、例えば、D N A またはR N A であってもよく、イントロン配列を含んでいても含まなくてもよい。1つの態様において、核酸はc D N A 分子である。核酸は、ベクター、例えば、ファージディスプレイベクターまたは組換えプラスミドベクター中に存在していてもよい。本発明は、また、p B W 5 2 2 およびp B W 5 2 4（それぞれ寄託番号D S M 2 2 8 7 3 およびD S M 2 2 8 7 4 の下に、2 0 0 9 年8月18日付け、DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに寄託された）として称されるベクターを提供する。

【0181】

本発明の核酸は、標準分子生物学技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、以下にさらに記載していると通りのヒト免疫グロブリン遺伝子を有する遺伝子導入マウスから製造されたハイブリドーマ）により発現された抗体に関して、ハイブリドーマにより製造された抗体の軽鎖および重鎖をコードするc D N A は、標準P C R 増幅また

10

20

30

40

50

は cDNA クローニング技術により得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）得られた抗体に関して、抗体をコードする核酸は、ライブラリーのメンバーである種々のファージクローンから回収することができる。

【0182】

1 つ以上の欠失、付加または置換を含む変異体核酸配列も、本発明の範囲内である。1 つの態様において、本発明は、保存的ヌクレオチド置換を含む 1 つ以上の配列番号：113-140 または 161-180 を含む。遺伝子コードの縮重によって、アミノ酸は、1 個以上のコドンによってコードされ得る。したがって、ヌクレオチド配列を修正して、翻訳されたアミノ酸配列は同じである可能性がある。

10

【0183】

V_H および V_L セグメントをコードする DNA フラグメントが得られたとき、これらの DNA フラグメントは、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子、Fab フラグメント遺伝子または scFv 遺伝子に変換するために、標準組換え DNA 技術によりさらに操作することができる。これらの操作において、V_L または V_H をコードする DNA フラグメントは、別のタンパク質、例えば、抗体定常領域もしくはフレキシブルリンカーをコードする別の DNA 分子またはフラグメントに作動可能に連結されている。この文脈において使用されるとき「作動可能に連結」なる用語は、2 つの DNA フラグメントが、例えば、2 つの DNA フラグメントによってコードされるアミノ酸配列がフレーム内に残るように、またはタンパク質が所望のプロモーターのコントロール下で発現されるように、機能する方法で連結されることを意味することを意図する。

20

【0184】

V_H 領域をコードする単離された DNA は、V_H をコードする DNA を重鎖定常領域（CH1、CH2 および CH3）をコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することにより全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該分野で知られており（例えば、Kabat, E. A., et al. [上記]、参照）、これらの領域を含む DNA フラグメントは、標準 PCR 増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM または IgD 定常領域であり得る。いくつかの態様において、重鎖定常領域は、IgG1 アイソタイプ中から選択される。Fab フラグメント重鎖遺伝子に関して、V_H をコードする DNA は、重鎖 CH1 定常領域のみをコードする別の DNA 分子に作動可能に連結され得る。

30

【0185】

V_L 領域をコードする単離された DNA は、V_L をコードする DNA を軽鎖定常領域 CL をコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することにより全長軽鎖遺伝子（ならびに Fab 軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当該分野で知られており（例えば、Kabat, E. A., et al. [上記]、参照）、これらの領域を含む DNA フラグメントは、標準 PCR 増幅により得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域であり得る。

【0186】

scFv 遺伝子を創造するために、V_H および V_L をコードする DNA フラグメントは、フレキシブルリンカーにより連結された V_L および V_H 領域を有する V_H および V_L 配列が連続する一本鎖タンパク質として発現することができるように、フレキシブルリンカー、例えば、アミノ酸配列（Gly4-Ser）₃ をコードするフレキシブルリンカーをコードする別のフラグメントに作動可能に連結される（例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426; Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990 Nature 348:552-554、参照）。

40

【0187】

本発明の核酸は、遺伝子送達において使用され得る。すなわち、本発明のポリペプチド（抗体または機能性タンパク質）をコードする核酸は、患者における翻訳のために患者に直接、送達され得る。

50

【0188】

該核酸は、一般的に、患者への投与のために「パッケージング」される。遺伝子送達ビクルは、非ウイルス、例えば、リボソーム、または複製欠損ウイルス、例えば、Berkner, K.L., in Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992)により記載されているアデノウイルスまたはMuzyczka, N., in Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 97-129 (1992)および米国特許第5, 252, 479号により記載されているアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり得る。あるいは、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスが使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、複製欠損レトロウイルスベクターにおける発現のために操作され得る。次に、この発現構築物は、単離され、パッケージング細胞が興味ある遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生産するように、ポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターを形質導入されたパッケージング細胞に導入され得る。これらの生産細胞は、インビボでの細胞の操作およびインビボでのポリペプチドの発現のために対象に投与され得る(Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (およびそこで引用されている文献) in Human Molecular Genetics (1996), T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd、参照)。

10

【0189】

別のアプローチは、治療用遺伝子が血流または筋肉組織に直接、注射される「裸のDNA」の投与である。

【0190】

20

本発明のモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体(mAb)は、慣用のモノクローナル抗体方法論を含む種々の技術、例えば、Kohler and Milstein (1975 Nature 256: 495)の標準体細胞ハイブリダイゼーション技術により生産することができる。モノクローナル抗体を生産するための多数の技術は、例えば、Bリンパ球のウイルスまたは発癌性形質転換を使用することができる。

【0191】

ハイブリドーマを作製するための動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ生産は、よく確立された方法である。免疫化プロトコールおよび免役された融合用脾細胞の単離のための技術は当該分野で知られている。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)および融合方法もまた知られている。

30

【0192】

本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように作製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて作製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、標準分子生物学技術を使用して、興味あるマウスハイブリドーマから得ることができ、非マウス(例えば、ヒト)免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。例えば、キメラ抗体を創造するために、マウス可変領域は、当該分野で知られている方法を使用して、ヒト定常領域に連結することができる(例えば、US 4, 816, 567参照)。ヒト化抗体を創造するために、マウスCDR領域は、当該分野で知られている方法を使用して、ヒトフレームワークに挿入することができる(例えば、米国特許第5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370号、参照)。

40

【0193】

特定の態様において、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。ActRIIBに対するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりむしろヒト免疫系部分を有する遺伝子導入されたまたは染色体導入されたマウスを使用して製造することができる。これらの遺伝子導入されたまたは染色体導入されたマウスは、本明細書において各々HuMAbマウスおよびKMマウスと称される、および本明細書において「ヒトIgマウス」と総称されるマウスを含む。

【0194】

HuMAbマウス(登録商標)(Medarex, Inc.)は、内因性μおよびκ鎖座を不活性

50

化する標的変異とともに、非再配置ヒト重鎖（ μ および γ ）および κ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座(miniloci)を含む（例えば、Lonberg, et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859参照）。したがって、マウスは、マウス Ig Mまたは κ の発現低下を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラス切り換えと体細胞変異を受け、高親和性ヒト Ig G κ モノクローナルを作製する（Lonberg, N. et al., 1994 [上記]; reviewed in Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546）。HuMAbマウスの作製および使用ならびにこのようなマウスにより実施されるゲノム修飾は、Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591;およびFishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851にさらに記載されている（これらの全ての内容を具体的な出典明示によりその全体を包含させる）。米国特許第5, 545, 806; 5, 569, 825; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 789, 650; 5, 877, 397; 5, 661, 016; 5, 814, 318; 5, 874, 299; 5, 770, 429; および5, 545, 807号; ならびにWO 92/103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/113852、WO 98/24884; WO 99/45962; およびWO 01/14424も参照。

【0195】

別の態様において、本発明のヒト抗体は、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウス、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を有するマウスを使用して製造することができる。「KMマウス」として本明細書で称されるこのようなマウスは、WO 02/43478において詳細に記載されている。

【0196】

なおさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別の遺伝子導入動物系は、当該分野で利用可能であり、本発明の抗A c t R I I B抗体を製造するために使用することができる。例えば、X e n o m o u s e (Abgenix, Inc.) と称される別の遺伝子導入系を使用することができる。このようなマウスは、例えば、米国特許第5, 939, 598; 6, 075, 181; 6, 114, 598; 6, 150, 584および6, 162, 963号に記載されている。

【0197】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別の染色体を導入した動物系が、当該分野で利用可能であり、本発明の抗A c t R I I B抗体を製造するために使用することができる。例えば、「TCマウス」と称されるヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を含むマウスを使用することができる; このようなマウスは、Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を有するウシは、当該分野で報告されており（Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894）、本発明の抗A c t R I I B抗体を製造するために使用することができる。

【0198】

本発明のヒト組換え抗体は、また、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ方法を使用して作製することができる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ方法は、当該分野で確立されているか、または以下の実施例に記載されている。例えば、米国特許第5, 223, 409; 5, 403, 484; 5, 571, 698; 5, 427, 908; 5, 580, 717; 5, 969, 108; 6, 172, 197; 5, 885, 793; 6, 521, 404; 6

， 5 4 4 ， 7 3 1 ； 6 ， 5 5 5 ， 3 1 3 ； 6 ， 5 8 2 ， 9 1 5 および 6 ， 5 9 3 ， 0 8 1 号、参照。

【0199】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、また、ヒト抗体応答が免疫化で産生することができるようにヒト免疫細胞を再構成された S C I D マウスを使用して作製することができる。このようなマウスは、例えば、米国特許第 5 ， 4 7 6 ， 9 9 6 および 5 ， 6 9 8 ， 7 6 7 号に記載されている。

【0200】

ヒトモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマの作製

本発明のヒトモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、免疫化マウスからの脾細胞および／またはリンパ節細胞を単離し、適当な不死化細胞系、例えば、マウス骨髄腫細胞系に融合することができる。得られたハイブリドーマを抗原－特異的抗体の生産に関してスクリーニングすることができる。例えば、免疫化マウスからの脾臓リンパ細胞の単細胞懸濁液を、1／6の数の P 3 X 6 3 － A g 8 . 6 5 3 非分泌マウス骨髄腫細胞 (A T C C 、 C R L 1 5 8 0) に 5 0 % の P E G で 融合 さ せ る こ と が で き る 。 細胞を平底マイクロタイタープレート中で約 2 × 1 4 5 で置き、次に、2 0 % の胎児クローン血清、1 8 % の「6 5 3」馴化培地、5 % の o r i g e n (I G E N) 、 4 m M の L - グルタミン、1 m M のピルビン酸ナトリウム、5 m M の H E P E S 、 0 : 0 5 5 m M の 2 - メルカプトエタノール、5 0 単位 / m l のペニシリン、5 0 m g / m l のストレプトマイシン、5 0 m g / m l のゲンタマイシンおよび 1 × H A T (S i g m a ; H A T を 融 合 2 4 時 間 後 に 加 え る) を 含 む 選 択 培 地 中 で 2 週 間 イ ン キ ュ ベ ー ト す る 。 約 2 週 後 、 細胞を H A T が H T と 置 き 換 え ら れ て い る 培 地 中 で 培 養 す る こ と が で き る 。 次 に 、 個 々の ウ ェ ル を ヒ ト モ ノ ク ロ ー ナ ル I g M お よ び I g G 抗 体 に 対 し て E L I S A に よ り ス ク リ ー ニ ン グ す る こ と が で き る 。 広 範 な ハ イ ブ リ ド ー マ 増 殖 が 起 こ る と 、 通 常 、 培 地 を 1 0 - 1 4 日 後 に 観 察 す る こ と が で き る 。 抗 体 を 分 泌 す る ハ イ ブ リ ド ー マ を 再 播 種 し 、 再 び ス ク リ ー ニ ン グ し 、 ま だ ヒ ト I g G 陽 性 の と き 、 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 制 限 希 釈 に よ り 少 なく と も 2 回 サ ブ ク ロ ー ニ ン グ す る こ と が で き る 。 次 に 、 安 定 な サ ブ ク ロ ー ン を イ ン ビ ト ロ で 培 養 し 、 特 性 化 の た め に 組 織 培 養 培 地 中 で 少 量 の 抗 体 を 作 製 す る 。

【0201】

ヒトモノクローナル抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマをモノクローナル抗体精製のために 2 リットルのスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清を濾過し、濃縮し、タンパク質 A - セファロース (Pharmacia) でアフィニティクロマトグラフィーに付すことができる。溶出した I g G をゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによりチェックし、純度を確認することができる。バッファー溶液を P B S に交換し、濃度を 1 . 4 3 の吸光係数を使用して O D ₂₈₀ により測定することができる。モノクローナル抗体をアリコートし、- 8 0 ° C で保存することができる。

【0202】

モノクローナル抗体を生産するトランスフェクトーマの作製

本発明の抗体は、また、例えば、当該分野でよく知られている組換え D N A 技術および遺伝子トランスフェクション法の組合せを使用して、宿主細胞トランスフェクトーマ中で生産することができる (例えば、Morrison, S. (1985) Science 229:1202) 。

【0203】

例えば、抗体またはその抗体フラグメントを発現させるため、部分的または全長軽鎖および重鎖をコードする D N A は、標準分子生物学技術 (例えば、P C R 増幅または興味ある抗体を発現するハイブリドーマを使用する c D N A クローニング) により得ることができ、D N A を、遺伝子が転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、発現ベクターに挿入することができる。これに関して、「作動可能に連結」なる用語は、抗体遺伝子が、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節する意図された機能を果たすように、ベクターにライゲートされることを意味することを意図する。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選

扱われる。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入するか、または、さらに一般的に、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入することができる。抗体遺伝子は、標準方法（例えば、抗体遺伝子フラグメント上の相補性制限部位およびベクターのライゲーション、または制限酵素認識部位が存在しないとき、平滑末端ライゲーション）により発現ベクターに挿入される。本明細書に記載されている抗体の軽鎖および重鎖可変領域は、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントに作動可能に連結され、そしてV_Lセグメントがベクター内のC_Lセグメントに作動可能に連結されるように、所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をすでにコードしている発現ベクターに挿入することにより、いずれかの抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を創造するために使用することができる。さらに、またはあるいは、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子を、シグナルペプチドがインフレームで抗体鎖遺伝子のアミノ末端に連結されるように、ベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）であり得る。

【0204】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現をコントロールする調節配列を有する。「調節配列」なる用語は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳をコントロールするプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel（Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990）に記載されている。調節配列の選択を含む発現ベクターのデザインが、形質転換された宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得ることが当業者に理解されよう。哺乳動物宿主細胞発現のための調節配列は、サイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））およびパピローマに由来する、哺乳動物細胞における高レベルタンパク質発現を指示するウイルスエレメント、例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサーを含む。あるいは、ユビキチンプロモーターまたはP-グロビンプロモーターのような非ウイルス調節配列が使用され得る。なおさらに、調節エレメントは、SV40初期プロモーターおよびヒト1型T細胞白血病ウイルスの長い末端反復配列からの配列を含む、異なる源からの配列、例えば、SRαプロモーター系を含む（Takebe, Y. et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472）。

【0205】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、さらなる配列、例えば、宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子を有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216、4,634,665および5,179,017参照）。例えば、一般的に、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞上で薬物、例えば、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートに対する耐性を付与する。選択マーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（メトトレキサート選択／増幅とともにdhfr-宿主細胞中で使用するため）およびneo遺伝子（G418を選択するため）を含む。

【0206】

軽鎖および重鎖の発現のため、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを、標準技術により宿主細胞にトランスフェクトする。「トランスフェクション」なる用語の種々の形態は、外来DNAの原核生物または真核生物宿主細胞への導入のために一般的に使用されている多種多様の技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを含むことを意図する。原核生物または真核生物宿主細胞のいずれにおいても本発明の抗体を発現させることは理論上可能である。

このような真核細胞、特に哺乳動物細胞が、原核細胞よりも適当に折りたたまれた免疫学的に活性な抗体をアッセンブルおよび分泌しやすいため、真核細胞、特に哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が議論される。抗体遺伝子の原核生物発現は、高収率の活性抗体の生産には無効であることが報告されている (Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 *Immunology Today* 6:12-13)。

【0207】

本発明の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞) (例えば、R.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 *Mol. Biol.* 159:601-621に記載されている DHFR 選択マーカーと使用される Urlaub and Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220に記載されている dhfr-CHO細胞を含む)、NSO骨髄腫細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む。1つの態様において、宿主細胞はCHO-K1PD細胞である。特に、NSO骨髄腫細胞の使用に関して、別の発現系は、WO87/04462、WO89/01036およびEP338,841において示されているGS遺伝子発現系である。1つの態様において、本発明の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞は、例えば、US6,946,292B2に記載されている、FUT8遺伝子発現を欠いている哺乳動物細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入するとき、宿主細胞中で抗体の発現または宿主細胞を増殖させる培養培地への抗体の分泌を可能にする十分な期間、宿主細胞を培養することにより抗体を生産する。抗体は、標準タンパク質精製方法を使用して培養培地から回収することができる。

【0208】

免疫抱合体

別の局面において、本発明は、治療的部分、例えば、細胞毒素、薬物 (例えば、免疫抑制剤) または放射性毒素に抱合された抗AcetRIB抗体またはそのフラグメント、接合を取りあげる。このような抱合体は、本明細書において「免疫抱合体」と称する。1つ以上の細胞毒素を含む免疫抱合体は、「免疫毒素」と称する。細胞毒素または細胞毒性剤は、細胞に有害である (例えば、殺す) あらゆる薬剤を含む。

【0209】

細胞毒素は、当該分野で利用できるリンカー技術を使用して、本発明の抗体に抱合させることができる。細胞毒素を抗体に抱合させるために使用されているリンカーの型の例、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィドおよびペプチド含有リンカーを含むが、これらに限定されない。例えば、リソソーム区画内の低いpHによる開裂に影響しやすい、またはプロテアーゼ、例えば、腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼ、例えば、カテプシン (例えば、カテプシンB、C、D) による開裂に影響しやすいリンカーを選択することができる。

【0210】

抗体へ治療剤を抱合させるための細胞毒素、リンカーおよび方法の型のさらなる議論について、Saito, G. et al., 2003 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al., 2003 *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. 2003 *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M., 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J., 2002 *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C. J., 2001 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264も参照。

【0211】

本発明の抗体は、また、放射性免疫抱合体としても称される細胞毒性放射性医薬品を生産するために放射性同位体に抱合することができる。診断的または治療的に使用するために抗体に抱合させることができる放射性同位体の例は、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰およびルテチウム¹⁷⁷を含むが、これらに限定されない。放射性免疫抱合体を製造する方法は、当該分野で確立されている。放射性免疫抱合体の例は、ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) およびBexxarTM (Corixa Pharmaceuticals) を含め市販されており、同様の方法は、本発明の抗体を使用して、放射性免疫抱合

体を製造するために使用することができる。

【0212】

本発明の抗体抱合体は、所定の生物学的応答を修飾するために使用することができ、薬物部分は、古典的な化学治療剤に限定解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、酵素活性毒素またはその活性フラグメント、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素またはジフテリア毒素；タンパク質、例えば、腫瘍壊死因子またはインターフェロン- γ ；または、生物学的応答修飾因子、例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）または他の増殖因子を含み得る。

10

【0213】

抗体にこのような治療部分を抱合する技術は、よく知られている、例えば、Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Therapy And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)、参照。

20

【0214】

二重特異性分子

別の局面において、本発明は、本発明の抗A c t R I I B抗体またはそのフラグメントを含む二重特異性または多重特異性分子を特徴とする。本発明の抗体またはその抗原結合領域は、誘導体化されるか、または別の機能性分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質（例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド）に連結し、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を作製することができる。実際に、本発明の抗体は、誘導体化されるか、または1つ以上の他の機能性分子に連結し、2つ以上の異なる結合部位および／または標的分子に結合する多重特異性分子を作製することができる；このような多重特異性分子は、また、本明細書において使用される「二重特異性分子」なる用語により包含されることを意図する。本発明の二重特異性分子を創造するために、本発明の抗体は、二重特異性分子となるように、（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合またはその他のものにより）1つ以上の他の結合分子、例えば、別の抗体、抗体フラグメント、ペプチドまたは結合模倣物に機能的に連結することができる。

30

40

【0215】

したがって、本発明は、A c t R I I Bに対する少なくとも1つの第1の結合特異性および第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。例えば、第2の標的エピトープは、第1の標的エピトープと異なるA c t R I I Bの別のエピトープであり得る。

【0216】

さらに、二重特異性分子が多重特異性である本発明について、該分子は、第1および第2の標的エピトープに加えて、第3の結合特異性をさらに含むことができる。

【0217】

1つの態様において、本発明の二重特異性分子は、結合特異性のために少なくとも1つ

50

の抗体またはその抗体フラグメント、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v または一本鎖 F v を含む。抗体は、また、軽鎖または重鎖ダイマーまたはそれらのいずれかの最小フラグメント、例えば、F v または Ladner et al. US4,946,778 (この内容を明白に出典明示により包含させる) に記載されている一本鎖構築物であり得る。

【0218】

本発明の二重特異性分子において使用することができる他の抗体は、マウス、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体である。

【0219】

本発明の二重特異性分子は、当該分野で知られている方法を使用して成分結合特異性を結合させることによって作製することができる。例えば、二重特異性分子のそれぞれの結合特異性は、別々に作製され、次に互いに複合体化させることができる。結合特異性がタンパク質またはペプチドであるとき、種々のカップリング剤または架橋剤を共有結合複合体のために使用することができる。架橋剤の例は、タンパク質 A、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-L-チオアセテート (S A T A)、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (D T N B)、o-フェニレンジマレイミド (o P D M)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P) およびスルホスクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-S M C C) を含む (例えば、Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648 参照)。他の方法は、Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83) および Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375) に記載されているものを含む。結合剤は、S A T A および スルホ-S M C C であり、両方とも Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手できる。

【0220】

結合特異性が抗体であるとき、それらは 2 つの重鎖の C 末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合により接合させることができる。特定の態様において、ヒンジ領域は、複合体化の前に、奇数、例えば、1 つのスルフヒドリル残基を含むように修飾される。

【0221】

あるいは、両方の結合特異性は、同じベクターにおいてコードされ、同じ宿主細胞において発現およびアセンブルされ得る。この方法は、特に、二重特異性分子が m A b × m A b、m A b × F a b、F a b × F (a b')₂ または リガンド × F a b 融合タンパク質であるとき有用である。本発明の二重特異性分子は、1 つの一本鎖抗体および決定基を含む一本鎖分子または 2 つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は、少なくとも 2 つの一本鎖分子を含み得る。二重特異性分子を作製するための方法は、例えば、米国特許第 5, 260, 203; 5, 455, 030; 4, 881, 175; 5, 132, 405; 5, 091, 513; 5, 476, 786; 5, 013, 653; 5, 258, 498; および 5, 482, 858 号に記載されている。

【0222】

二重特異性分子のこれらの特異性標的への結合は、例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、F A C S 分析、バイオアッセイ (例えば、増殖阻害) または ウェスタンブロットアッセイにより確認することができる。これらのアッセイのそれぞれは、一般的に、興味ある複合体に対して特異的な標識試薬 (例えば、抗体) を使用することにより特定の興味あるタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。

【0223】

多価抗体

別の局面において、本発明は、A c t R I I B に結合する本発明の抗体の少なくとも 2 つの同一のまたは異なる抗原結合部分を含む多価抗体を提供する。1 つの態様において、多価抗体は、抗体の少なくとも 2 つ、3 つまたは 4 つの抗原結合部分を提供する。抗原結合部分は、タンパク質融合または共有もしくは非共有結合を介して互いに連結することが

できる。あるいは、結合の方法は、二重特異性分子について記載されている。四価化合物は、例えば、本発明の抗体の定常領域、例えば、Fcまたはヒンジ領域に結合する抗体と本発明の抗体を架橋することにより得ることができる。

【0224】

医薬組成物

別の局面において、本発明は、薬学的に許容される担体とともに製剤化された、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の1つまたは組合せを含む組成物、例えば、医薬組成物を提供する。このような組成物は、本発明の（例えば、2種以上の異なる）抗体、または免疫抱合体または二重特異性分子の1つまたは組合せを含み得る。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するか、または相補的活性を有する抗体の組合せを含むことができる。

10

【0225】

本発明の医薬組成物は、また、併用療法、すなわち他の薬剤と組み合わせて投与することができる。例えば、併用療法は、本発明の抗AcctRIIB抗体を、少なくとも1つの他の筋肉量／強度増加剤、例えば、IGF-1、IGF-2またはIGF-1もしくはIGF-2の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、AcctRIIBに結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2アゴニスト、Ghrelinアゴニスト、SARM、GHアゴニスト／模擬物またはフォリスタチンと共に含むことができる。併用療法において使用することができる治療剤の例は、以下の本発明の抗体の使用のセクションにおいてより詳細に記載されている。

20

【0226】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合するあらゆる全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。担体は、（例えば、注射または注入による）静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与に適しているべきである。投与経路に依存して、活性化化合物、すなわち抗体、免疫抱合体または二重特異性分子を、化合物を不活性にし得る酸および他の天然条件の作用から化合物を保護するために物質でコーティングし得る。

【0227】

本発明の医薬化合物は、1つ以上の薬学的に許容される塩を含み得る。「薬学的に許容される塩」は、所望の親化合物の生物学的活性を保持するが、望ましくない毒性作用を付与しない塩を意味する（例えば、Berge, S.M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19、参照）。このような塩の例は、酸付加塩および塩基付加塩を含む。酸付加塩は、無毒性の無機酸、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸など、ならびに無毒性の有機酸、例えば、脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などに由来するものを含む。塩基付加塩は、アルカリ土類金属、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど、ならびに無毒性の有機アミン、例えば、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどに由来するものを含む。

30

【0228】

本発明の医薬組成物は、また、薬学的に許容される抗酸化剤を含み得る。薬学的に許容される抗酸化剤の例は、水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、プロピルガレート、アルファートコフェロールなど；および金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含む。

40

【0229】

本発明の医薬組成物において使用され得る適当な水性および非水性担体の例は、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

50

リコールなど) およびそれらの適当な混合物、植物油、例えば、オリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルを含む。適当な流動性は、例えば、コーティング剤、例えば、レシチンの使用、分散物の場合、必要な粒径の維持および界面活性剤の使用により維持することができる。

【0230】

これらの組成物は、また、アジュバント、例えば、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤を含み得る。微生物の存在の防止は、上記殺菌手順ならびに種々の抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの包含の両方により確保され得る。また、等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを組成物に包含させることが望ましいこともある。加えて、注射可能な医薬形態の吸収の延長は、吸収を遅らせる薬物、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの包含により実現され得る。

10

【0231】

薬学的に許容される担体は、無菌注射可能溶液または分散液の即時製造調製のための無菌水溶液または分散液および無菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬物の使用は、当該分野で知られている。慣用の媒体または薬物が活性な化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用が考慮される。補助的な活性化合物も組成物に包含することができる。

【0232】

一般的に、治療用組成物は、製造および保存の条件下で無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたはその他の高濃度の薬物に適した調整構造物として製剤化することができる。担体は、例えば、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および液体ポリエチレングリコールなど）および適当なそれらの混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。適当な流動性は、例えば、コーティング剤、例えば、レシチンの使用、分散物の場合、必要な粒径の維持および界面活性剤の使用により維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを組成物中に含むことができる。注射可能な組成物の吸収の延長は、組成物中に吸収を遅らせる薬物、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含むことにより実現することができる。

20

30

【0233】

無菌注射可能溶液は、適当な溶媒中で必要な量の活性な化合物を上記に挙げられた薬剤の1つまたは組合せと混合し、必要なとき、次に無菌的精密濾過をすることにより製造することができる。一般的に、分散液は、基本的分散媒および上記に挙げられたものから必要な他の成分を含む無菌ビヒクル中に活性な化合物を配合することにより製造される。無菌注射可能溶液の製造のための無菌粉末の場合、製造方法は、事前に無菌濾過した溶液から活性剤プラス何らかのさらなる所望の薬剤の粉末が得られる、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【0234】

単位投与形態を生産するために担体物質と組み合わせることができる活性剤の量は、処置される対象および特定の投与経路に依存して変化する。単位投与形態を生産するために担体物質と組み合わせることができる活性剤の量は、一般的に治療効果を引き起こす組成物の量である。一般的に、100%のうち、この量は、薬学的に許容される担体との組み合わせで活性剤が約0.01%から約99%、約0.1%から約70%または約1%から約30%の範囲である。

40

【0235】

投与レジメンは、所望の最適応答（例えば、治療応答）を提供するために調節される。例えば、単回ボラスで投与してもよく、経時的に数回の分割投与で投与してもよく、または治療状況の緊急性により指示されるとき、比例的に用量を減少または増加してもよい。とりわけ投与の容易性および用量の均一性のため、非経口組成物を投与単位形態で製剤

50

化することが有利である。本明細書において使用される投与単位形態は、処置される対象に対する単位用量として適した物理的に分離した単位を意味し；それぞれの単位は、必要な医薬担体と一緒に所望の治療効果を引き起こすように計算されたあらかじめ決められた量の活性な化合物を含む。本発明の投与単位形態の仕様は、活性な化合物の独自の特徴と達成すべき特定の治療効果、および各個体における治療感受性に関して、このような活性化合物を製剤化する技術に固有の限界により規定され、かつ直接的に依存する。

【0236】

抗体の投与について、用量は、約0.0001から100mg/kg、さらに通常0.01から5mg/kg宿主体重の範囲である。例えば、用量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重もしくは10mg/kg体重または1-10mg/kgもしくは3-7mg/kgの範囲内であり得る。典型的な処置レジメンは、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1月に1回、3月に1回または6月に1回の投与を必要とする。あるいは、抗体は1年に約1回または1回だけ投与され得る。このような投与は、静脈内または皮下に実施され得る。本発明の抗A c t R I I B抗体のための投与レジメンは、静脈内投与による1mg/kg体重または3mg/kg体重を含み、抗体を下記投与スケジュール：4週間毎に6回、次に3月毎；3週間毎；3mg/kg体重を1回、次に3週間毎に1mg/kg体重の1つを使用して与える。

10

【0237】

用量は、筋肉量および／または強度の上方調節を引き起こす量であるべきである。好ましくは、該効果は骨格筋である。好ましくは、用量は、内臓（例えば、心臓、肺、肝臓、腎臓）のサイズにおいてわずかに比例的増加で筋肉肥大を引き起こす。このような比例的増加は、体積または質量のいずれかを測定することにより比較され得る。

20

【0238】

いくつかの方法において、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合、投与されるそれぞれの抗体の用量は示される範囲内である。抗体を通常、複数回投与する。各投与間の間隔は、例えば、毎週、毎月、3月毎、6月毎または1年毎であり得る。間隔は、また、患者の標的抗原に対する抗体の血中レベルを測定することにより示されるように不定期であり得る。いくつかの方法において、用量は、約1-1000μg/ml、いくつかの方法において、約25-300μg/mlの血漿抗体濃度を達成するように調節される。例えば、A c t R I I B本発明の抗体は、抗ミオスタチン抗体と共投与され得る。

30

【0239】

あるいは、抗体を持続放出製剤として投与することができ、この場合、投与頻度は少なくてもよい。用量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変化する。一般的に、ヒト抗体が最も長い半減期を示し、次に、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体が続く。投与用量および頻度は、処置が予防的または治療的であるかどうかによって変化する。予防的適用において、比較的低用量を比較的低頻度で長期間投与する。ある患者は、残りの生涯、処置を受け続ける。治療的適用において、ときどき、比較的高用量を比較的低頻度で、疾患の進行を遅らせるかもしくは停止させるまで、または患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで必要である。その後、患者は予防レジメンで投与され得る。

40

【0240】

本発明の医薬組成物中の活性剤の実際の用量レベルは、特定の患者、組成物および投与経路に対して所望の治療応答を達成するために有効であり、患者に毒性がない、活性剤の量を得るために変化させることができる。選択された用量レベルは、使用される本発明の特定の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与の経路、投与の時間、使用される特定の化合物の排泄速度、処置の期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物および／または物質、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、健康状態および病歴ならびに医薬分野で既知の因子を含む種々の薬物動態因子に

50

依存する。

【0241】

本発明の抗A c t R I I B抗体の「治療有効量」は、疾患症状の重症度の減少、疾患無症状の頻度および期間の増加、または疾患の苦痛による機能障害または不都合な点の改善、すなわち、筋肉量および／または強度の増加をもたらすことができる。

【0242】

本発明の組成物は、1つ以上の当分野で既知の種々の方法を使用して、1つ以上の投与経路により投与することができる。当業者、投与様式および／または投与経路は、所望の結果に依存して変化することが当業者に理解される。本発明の抗体の投与経路は、例えば、注射または注入による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口経路の投与を含む。本明細書において使用される句「非経口投与」は、通常、注入による、経腸および局所投与以外の投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、被膜内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管的、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内注射および注入が含まれるが、これらに限定されない。1つの態様において、抗体は静脈内に投与される。別の態様において、抗体は皮下に投与される。

【0243】

あるいは、本発明の抗体は、非経口経路、例えば、局所、上皮または粘膜経路の投与、例えば、鼻腔内、経口的、経膈的、経直腸的、舌下的または局所的により投与することができる。

【0244】

活性化化合物は、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤のように、化合物を迅速な放出に対して保護する担体とともに製造することができる。生分解性、生体適合性ポリマー、例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸を使用することができる。このような製剤の製造のための多数の方法は、特許されているか、一般的に当業者に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978、参照。

【0245】

治療用組成物は、当該分野で知られている医療デバイスで投与することができる。例えば、1つの態様において、本発明の治療用組成物は、無針皮下注射デバイス、例えば、米国特許第5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824または4,596,556号に示されているデバイスで投与することができる。本発明において有用な既知のインプラントおよびモジュールの例は、コントロールされた速度で薬物を分配するためのインプラント可能な微小注入ポンプを示す米国特許第4,487,603号;皮膚を介する薬物を投与するための治療デバイスを示す米国特許第4,486,194号;正確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを示す米国特許第4,447,233号;連続的薬物送達のための流量可変のインプラント可能な注入装置を示す米国特許第4,447,224号;複数チャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を示す米国特許第4,439,196号;および浸透圧薬物送達系を示す米国特許第4,475,196号を含む。他のこのような多数のインプラント、送達系およびモジュールは当業者に知られており、M i c r o C H I P S ^{T M} (Bedford, MA) により製造されるものを含む。

【0246】

1つの態様において、本発明のヒトモノクローナル抗体をインビボで適切な分布を確実にするため製剤化することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は、多数の高親水性化合物を排除する。本発明の治療用化合物がBBBを(所望により)通過することを確実にするために、それらは、例えば、リボソーム中で製剤化することができる。リボソームを製造する方法に関して、例えば、米国特許4,522,811;5,374,548;および5,399,331参照。リボソームは、特定の細胞または臓器に選択的に輸送さ

れる1以上の部分を含み得、したがって標的薬物送達を強化する（例えば、V.V. Ranade, 1989 J. Clin Pharmacol. 29:685、参照）。典型的な標的とする部分は、葉酸またはピオチン（例えば、米国特許5,416,016参照）；マンノシド（Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；界面活性剤タンパク質A受容体（Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233:134）；p120（Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090）を含む；K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273も参照。

【0247】

10

本発明の使用および方法

本発明の抗体は、インビトロおよびインビボでの診断および治療有用性を有する。例えば、これらの分子は、種々の障害を処置、予防または診断するために、例えば、インビトロまたはエキソビボで、培養中の、または、例えば、インビボで、対象における細胞に投与することができる。したがって、該抗体は、疾患の処置、ならびに疾患症状の予防および発症の遅延の両方において使用され得る。本明細書において使用される「対象」なる用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。非ヒト動物は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、鳥類、両生類およびは虫類を含む。

【0248】

20

本発明は、治療有効量の抗A c t R I I B抗体を投与することを含む病理学的障害（例えば、筋肉消耗性疾患または障害）に罹患している患者を処置する方法を提供する。

本発明は、また、治療における使用のための抗A c t R I I B抗体を提供する。

本発明は、また、病理学的障害の処置のための医薬の製造における抗A c t R I I B抗体の使用を提供する。

該方法は、病理学的障害を処置、予防、改善または診断するために特に適当である。

【0249】

本明細書において使用される「病理学的障害」は、限定はしないが、筋骨格疾患または障害、例えば、筋萎縮であり得る。グルココルチコイド、例えば、コルチゾール、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、またはプレドニゾロンでの処置の結果として含む、筋萎縮の多数の原因が存在する。筋萎縮は、また、神経外傷による脱神経の結果または、変性、代謝性または炎症性神経障害（例えば、Guillain-Barré症候群、末梢性神経障害、または環境毒素または薬物への暴露）の結果であり得る。

30

【0250】

加えて、筋萎縮は、筋障害、例えば、筋緊張症；先天性筋障害、例えば、ネマリン筋障害、マルチミニコア筋障害および筋細管（中心核）筋障害；ミトコンドリア性筋障害；家族性周期性四肢まひ；炎症性筋炎；例えば、グリコーゲンまたは脂質蓄積症により引き起こされる代謝性筋障害；皮膚筋炎；多発性筋炎；封入体筋炎；骨化性筋炎；横紋筋融解症およびミオグロビン尿症の結果であり得る。

40

【0251】

筋障害は、筋ジストロフィー症候群、例えば、デュシェンヌ、ベッカー、筋緊張、顔面肩甲上腕、エメリー・ドレフュス、眼咽頭筋、肩甲上腕、肢帯、福山、先天型筋ジストロフィー、または遺伝的末梢性ミオパシーにより引き起こされ得る。筋骨格疾患は、また、骨粗鬆症、骨折、低身長症、または小人症であり得る。

【0252】

加えて、筋萎縮は、成人運動ニューロン疾患、小児脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、若年性脊髄性筋萎縮症、多巣性伝導ブロックでの自己免疫性運動神経障害、卒中または脊髄損傷による麻痺、外傷による骨格固定化、長期のベッド休養、自発的不活化、不随意不活化、代謝ストレスまたは栄養不足、癌、AIDS、空腹時、甲状腺障害、糖尿病、

50

良性先天性低血圧、セントラルコア病、やけど、慢性閉塞性肺疾患、肝臓疾患（例えば、線維症、肝硬変症）、敗血症、腎不全、鬱血性心不全、加齢、宇宙旅行または無重力状態で過ごすことの結果であり得る。

【0253】

処置され得る加齢関連状態の例は、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、平均寿命の減少、衰弱、記憶障害、しわ、腎機能障害、および加齢性難聴；代謝障害、例えば、I I型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖、および肥満を含む。もちろん、患者は、同時に1つ以上のこれらの状態、例えば、サルコペニアおよび肺気腫、またはサルコペニアおよび腎機能障害に罹患していてもよい。

10

【0254】

本明細書に記載されている「病理学的障害」であると考慮される他の状態は、急性および／または慢性腎疾患または不全、肝線維症または肝硬変症、癌、例えば、乳癌、パーキンソン病；神経細胞死と関連する状態、例えば、ALS、脳萎縮または認知症および貧血を含む。

さらなる状態は、悪液質、リウマチ性関節炎に伴う悪液質および癌に伴う悪液質を含む。

【0255】

今日までに、これらの障害を処置するための信頼できる、または有効な治療は、ほとんど開発されていない。

20

【0256】

肝、腎および肺線維症に寄与する他の受容体中のActRIIBへのアクチビン結合の役割（Werner and Alzheimer, Cytokine Growth Factors Rev 2006, 17(3):157-171）、ならびに癌におけるミオスタチン、アクチビンまたはActRIIBに対する役割（Tsuhida et al, Endo J, 2008）の報告されている証拠に基づいて、本明細書に記載されている「病理学的障害」は、肝、腎および肺線維症、および限定はしないが、横紋筋肉腫、骨量減少を誘導する癌、肝細胞腺腫、消化器癌により例示される癌を含む。

【0257】

防止は、加齢関連状態または代謝障害の完全、例えば、全非存在であり得る。防止は、また、対象における加齢関連状態または代謝障害の発生する可能性が、本発明の抗体を受けていない対象よりも起こる可能性が低いという部分的であり得る。

30

【0258】

本明細書において称されている加齢関連状態は、50歳以上の年齢で始まり得る（すなわち、60、70、80またはそれ以上）。

【0259】

1つの態様において、患者は、強制的な休止／不応の予期された期間前に抗ActRIIB抗体で前処置され得る。このような期間は、患者が、例えば股または脚に対する手術のために通院するときに起こり得る。不応は、例えば、骨折した肢もしくは関節の鑄造、または麻痺薬の投与により限定され得る。

40

【0260】

1つの態様において、処置される患者は、肢（すなわち脚または腕）または関節（すなわち膝関節または股関節）に対する骨折を有する。したがって、1つの態様において、処置される患者は、1つ以上の上腕骨、橈骨、尺骨、手根骨、中手骨、鎖骨、肩甲、大腿骨、寛骨、膝蓋骨、脛骨、腓骨、距骨、踵骨、足根骨、中足骨、坐骨または腸骨に対する骨折を有する。別の態様において、処置される患者は、1つ以上の以下の関節：膝関節、股関節、足関節、肩関節、肘関節における手術を経験しているか、または経験しようとしている。このような手術は、股関節置換および膝関節置換を含む。

【0261】

固定化による萎縮は、迅速に起こり得るが、通常ゆっくりと起こる。したがって、1つ

50

の態様において、患者、関節または肢は、2週間またはそれ以上（すなわち、3週間、4週間、6週間、8週間またはそれ以上）、固定されているか、または固定される。1つの態様において、患者、関節または肢は、1－8週間、2－6週間または3－5週間、固定されているか、または固定される。

【0262】

さらなる態様において、患者は、以前の骨同化作用処置に応答しないものであり得る。例えば、該患者は、IGF-1、IGF-2またはIGF-1もしくはIGF-2の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIBに結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2アゴニスト、Ghrelinアゴニスト、SARM、GHアゴニスト／模擬物またはフォリスタチンでの処置に応答しない。処置に対する患者の応答を測定する簡単な方法は、患者が段の既知の高さに達するまでの時間を計り、処置前および後の両方の結果を比較することであり得る。

10

【0263】

本発明の抗体は、単独の活性剤として、または以下のものと組み合わせて、例えば、アジュバントとして、または以下のものと組み合わせて投与され得る。他の薬物、例えば、IGF-1、IGF-2またはIGF-1もしくはIGF-2の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIBに結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2アゴニスト、Ghrelinアゴニスト、SARM、GHアゴニスト／模擬物またはフォリスタチン。例えば、本発明の抗体は、WO2007/146689に記載されているIGF-1模擬物と組み合わせて使用され得る。

20

【0264】

前記にしたがって、本発明は、さらにさらなる局面を提供する：

上記定義の方法は、治療有効量のActRIIBアンタゴニスト、例えば本発明の抗体、および少なくとも1つの第2の薬物の、例えば、同時または連続の共投与を含み、ここで、該第2の薬物は、IGF-1、IGF-2またはIGF-1もしくはIGF-2の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIBに結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2アゴニスト、Ghrelinアゴニスト、SARM、GHアゴニスト／模擬物またはフォリスタチンである。

【0265】

本発明は、さらに、治療有効量のa) ActRIIBアンタゴニスト、例えば、本発明の抗体、およびb) 例えば上記されている、IGF-1、IGF-2またはIGF-1もしくはIGF-2の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、ActRIIBに結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ2アゴニスト、Ghrelinアゴニスト、SARM、GHアゴニスト／模擬物またはフォリスタチンから選択される少なくとも1つの第2の物質を含む治療的組合せ、例えば、キットを提供する。キットは、さらに、投与のための指示書を含み得る。

30

【0266】

本発明の抗体が別の活性剤と組み合わせて投与されるとき、共投与される組合せ化合物の用量は、もちろん、使用される共薬物の型、使用される特定の薬物、処置される状態などに依存して変化する。

40

【0267】

別の態様において、本発明の抗体は、筋萎縮に罹患している患者中で選択される患者集団にのみ投与される。別の態様において、本発明の抗体は、骨格筋萎縮に罹患している患者集団に投与される。別の態様において、本発明の抗体は、抗ActRIIB処置に応答する患者のグループ中で選択される患者集団にのみ投与される。抗ActRIIB処置に応答する高い可能性を有する患者を同定するバイオマーカーは、以下のいずれかでもよく、これらに限られない：コントロール患者と比較して血清ミオスタチン、GDF-11またはアクチビンの高いレベル。

【0268】

1つの態様において、本発明の抗体は、ActRIIBのレベルまたはActRIIB

50

を含む細胞のレベルを検出するために使用することができる。これは、抗体とA c t R I I B間の複合体の形成を可能にする条件下で、例えば、サンプル（例えば、インビトロでのサンプル）およびコントロールサンプルを抗A c t R I I B抗体と接触させることにより、成し遂げることができる。該抗体とA c t R I I B間で形成される任意の複合体を検出し、サンプルおよびコントロールと比較する。例えば、当該分野でよく知られている標準検出方法、例えば、E L I S Aおよびフローサイトメトリーアッセイは、本発明の組成物を使用して実施することができる。

【0269】

したがって、1つの局面において、本発明は、さらに、抗体またはその一部とA c t R I I B間の複合体の形成を可能にする条件下で、A c t R I I Bに特異的に結合する本発明の抗体またはそれらの抗原結合領域をサンプルおよびコントロールサンプルと接触させることを含む、サンプル中のA c t R I I B（例えば、ヒトA c t R I I B）の存在を検出するか、またはA c t R I I Bの量を測定するための方法を提供する。複合体の形成は検出され、コントロールサンプルと比較してサンプル間の複合体形成における違いは、サンプルにおけるA c t R I I Bの存在を示す。

【0270】

本発明の組成物（例えば、抗体、ヒト抗体および二重特異性分子）および使用のための指示書からなるキットも、本発明の範囲内である。キットは、さらに、少なくとも1つのさらなる試薬または1つ以上のさらなる本発明の抗体（例えば、第1の抗体と異なる標的抗原上のエピトープに結合する相補的活性を有する抗体）を含むことができる。キットは、一般的に、キットの内容の意図される使用を示すラベルを含む。ラベルなる用語は、キット上またはキットと共に提供されるあらゆる文章または記録物、またはキットとの添付物を含む。キットは、さらに、上記定義のとおり患者は抗A c t R I I B抗体処置に回答するグループに属するか否かを診断するためのツールを含み得る。このようなキットは、凍結乾燥された形態の本発明の抗体、希釈剤および使用のための指示書を含み得る。

【0271】

本発明は十分に記載されており、さらに以下の実施例および特許請求の範囲で説明されているが、説明のためであり、さらなる限定を意図しない。

【0272】

全般的

「含む」なる用語は、「包含する」を意味し、例えば、Xを「含む」組成物は、Xのみを含むか、またはさらなるもの、例えば、X + Yを含み得る。

数値xに関連する「約」なる用語は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0273】

【図1】図1は、親およびA c t R I I BをトランスフェクトされたH E K 2 9 3 T / 1 7細胞系におけるF A C S滴定によるM O R 0 7 0 7 9のE C 5 0決定を示す。

【図2】図2は、2、10および50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での抗A c t R I I B F a b sの倍数によるレポーター遺伝子アッセイにおけるミオスタチン誘導ルシフェラーゼ発現の阻害を示す。

【図3】図3は、ミオスタチン誘導ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおけるF a b sのI C 5 0決定を示す。

【図4】図4は、初代ヒト骨格筋細胞への抗体結合を示す。

【図5】図5は、骨格筋分化アッセイのミオスタチン誘導阻害におけるI g GのI C 5 0決定を示す。

【図6】図6は、マウス試験を示す：天然動物-10 mg/kg でのM O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3の6週間処置におけるインビボでの有効性試験は、体および筋肉重量を増加させた。変化は、(A)体重、(B)脛骨筋、(C)足底を有する腓腹筋、(D)大腿四頭筋および(E)胸筋について示されている。

【図7】図7は、マウス試験を示す：天然動物-25、5、1 mg/kg でのM O R 0 8

213の6週間処置におけるインビボでの用量応答有効性試験は、体および筋肉重量を用量依存的に増加させた。変化は、(A)体重、(B)脛骨筋、(C)足底を有する腓腹筋、(D)大腿四頭筋および(E)胸筋について示されている。

【図8】図8は、アイソタイプコントロールのみ(黒線)またはMOR08213の存在下でのアイソタイプコントロール(点線)と比較して、MOR08213の存在下でのMOR08159(太い点線)とMOR08159のみ(太い黒線)間の交差阻止を証明するFACS出力を示す。

【図9】図9は、種々のエピトープ決定技術を使用して、MOR08159が結合するActRIIB残基(配列番号:181)の概観を示す。

【発明を実施するための形態】

【0274】

発明を実施するための形態

機能性アッセイ

レポーター遺伝子アッセイ(RGA)

HEK293T/17細胞系の培養

親HEK293T/17細胞を10%のFBS、2mMのL-グルタミン、ペニシリン(50IE/ml)、およびストレプトマイシン(50μg/ml)を含むDMEMに維持した。細胞を、37℃で5%のCO₂でインキュベーター中で増殖させ、3-4日毎に二次培養した。AccutaseTMを使用して細胞を引き離し、次に新鮮培地を含む新しいフラスコに移した。

【0275】

CAGA-12 lucで安定にトランスフェクトされたHEK293T/17細胞を、親HEK293T/17細胞について上記されているとおりに培養したが、細胞増殖培地にFBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンに加えて4mMのL-グルタミンおよび3μg/mlのブラストサイジンに補った。

【0276】

ミオスタチン誘導ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

抗ActRIIB抗体のミオスタチン誘導シグナル伝達を阻害する能力を測定するために、安定なレポーター細胞系HEK293T/17 CAGA-12 lucを使用するレポーター遺伝子アッセイを行った。CAGA-12ルシフェラーゼ応答構築物は、最小のプロモーターおよびリン酸化Smad-2およびSmad-3に特異的である複数のCAGAボックスの下流にルシフェラーゼ遺伝子を有する。精製されたミオスタチン(GDF-11、アクチビンまたはTGFβも)の添加は、Smadリン酸化、したがってCAGA-12レポーターへの結合を誘導し、ルシフェラーゼ遺伝子発現を引き起こす。

【0277】

HEK293T/17 CAGA-12 luc細胞の90%密集度で、細胞を記載されているとおりに引き離し、 2.5×10^5 細胞/mlの濃度に培養培地を希釈した。次に、ウェルあたり100μlの細胞を平底96-ウェルプレートに播種し、37℃で5%のCO₂で一晩インキュベートした。

【0278】

次の日、陽性コントロールとして使用される抗体(FabまたはIgG)および組換えヒトActRIIB/Fcを、所望の濃度にPBSで希釈した。20μlの抗体溶液を、前日の播種されたウェルに加え、抗体と結合させるために細胞を1時間培養した。最後に、50ng/mlのミオスタチンをウェルに加え、細胞をさらに一晩培養した。

【0279】

次の朝、120μlのBright-Gloルシフェラーゼ試薬(Promega)をそれぞれのウェルに加えた。2分間インキュベーション後、発光を照度計で読んだ。最大の半分の阻害濃度(IC50値)を、それぞれの抗体の全滴定後に計算した。

【0280】

特異性ELISA

10

20

30

40

50

ヒトA c t R I I Bに対する抗A c t R I I B F a b抗体の特異性およびヒトA c t R I I AおよびマウスA c t R I I Bへの交差反応性を、E L I S A設定で評価した。さらに、関連受容体（カウンター標的：ヒトT G F - β R I I / F c (R & D s y s t e m s)、マウスT G F - β R I (A L K - 5) / F c (R & D s y s t e m s)、ヒトアクチビンR I B (A L K - 4) / F c (R & D s y s t e m s))への結合を測定した。このために、P B Sに希釈された5 μ g / m l（他に記載のない限り）の組換えタンパク質を黒色96-ウェル平底M a x i s o r p ^{T M} プレートに加え、コーティングのために一晩4℃でインキュベートした。

【0281】

次の朝、プレートをT B S Tで洗浄し、M T B S Tでブロックした。プレートを数回洗浄後、5 μ g / m lの抗A c t R I I B F a bを加え、2.5時間インキュベートした。次に、抗原結合F a bをアルカリホスファターゼ接合ヤギー抗-ヒトI g G F a b - 特異的でのインキュベーションにより検出し、次にA t t o P h o s 蛍光基質を加えた。535nmでの蛍光放射を、T E C A N S p e c t r a f l u o r プレートリーダーで430nmでの励起で記録した。

【0282】

A c t R I I B / F c - ミオスタチン結合相互作用E L I S A

ヒトA c t R I I Bのミオスタチン結合部位をブロックすることを介して阻害F a bが作用するか否かを評価するために、h A c t R I I B / F c - ミオスタチン相互作用E L I S Aを行った。このため、組換えミオスタチンを5 μ g / m lにP B Sで希釈し、黒色96-ウェル平底M a x i s o r p プレート上にコーティングした。次の朝、ウェルをM T B S Tでブロックした。その間に、50 μ g / m lの抗A c t R I I B F a bを10 μ g / m lのA c t R I I B / F cとT B S T中で室温で1.5時間プレインキュベートし、最後にコーティングされブロックされたウェルに加えた（室温で1.5時間）。T B S Tバッファーで洗浄後、結合したA c t R I I B / F cの検出を、非標識マウス抗-ヒトI g F c - 特異的抗体およびP O D - 標識ヒツジ抗-マウスI g G検出抗体を使用して行った。ウェルをT B S Tバッファーで数回洗浄後、Q u a n t a B l u ^{T M} 蛍光発生ペルオキシダーゼ基質を加えた。蛍光をG E N i o s P r o ^{T M} リーダーにおいて読んだ（励起320nm、放射430nm）。

【0283】

細胞への結合

細胞

F u G E N E 6 (R o c h e) を使用して直線状p E G F P (C l o n t e c h) - A c t R I I B (E C D) もしくはA c t R I I A (E C D) およびp P G K - p u r o (A d d G e n e) でトランスフェクトされたH E K 2 9 3 T / 1 7 細胞 (A T C C) を使用して産生された、安定なヒトA c t R I I A - およびヒトA c t R I I B をトランスフェクトされたH E K 2 9 3 T / 1 7 細胞を、10%のF B S、2mMのL-グルタミン、ペニシリン (50 I U / m l)、ストレプトマイシン (50 μ g / m l) およびピューロマイシン (2 μ g / m l) を含むD M E M に維持した。細胞をインキュベーター中で37℃で5%のC O ₂ で増殖させ、3-4日毎に二次培養した。細胞をA c c u t a s e ^{T M} を使用して引き離し、次に新鮮培地を含む新しいフラスコに移した。

【0284】

ヒト骨格筋細胞 (h u S k M C) (C a m b r e x) を、約70-90%の密集度で培養した。これらの細胞に対して、20%のF C S (A m i m e d) を補った骨格筋基礎培地 (s k B M ; L o n z a) からなる増殖培地 (G M) を吸引し、細胞をH E P E S - B S S で洗浄し、トリプシン / E D T A とインキュベートした。該細胞を引き離した後、トリプシンをトリプシン中和溶液で中和した。細胞を5分間220×gで遠心し、ペレットを骨格筋増殖培地で再懸濁した。次に、細胞を実験のために使用するか、または~3500細胞 / c m ² の細胞密度で二次培養するために播種した。細胞をインキュベーター中で37℃で5%のC O ₂ で増殖させ、5-6日毎に二次培養した。

【0285】

hA c t R I I BおよびhA c t R I I Aを発現する細胞におけるF A C S 滴定

抗A c t R I I B抗体の半数効果濃度（E C 5 0）を、F A C Sにより細胞hA c t R I I AおよびhA c t R I I Bへの結合を介して決定した。

【0286】

このために、抗A c t R I I B F a bまたはI g Gの連続希釈物を、ウェル当たり 1×10^4 個のhA c t R I I A—トランスフェクトされた、hA c t R I I B—トランスフェクトされた、または親H E K 2 9 3 T / 1 7細胞と1時間4℃とインキュベートした。数回洗浄工程後、細胞結合F a bまたはI g Gをフィコエリトリン—接合ヤギ抗—ヒトI g G（H + L）二次抗体で検出した。4℃で1時間インキュベーション後、該細胞を再び洗浄し、F A C Sバッファーで再懸濁し、該細胞の蛍光強度をF A C S A r r a y ^{T M}装置で決定した。

10

【0287】

初代ヒト骨格筋細胞への結合

抗A c t R I I B F a bまたはI g Gならびにアイソタイプ コントロールF a bまたはI g G（10 μ g）を、チューブ当たりF A C Sバッファー（P B S、2 %のF C S、1 m MのE D T A）中の 10^5 個のh u S k M Cと1時間4℃でインキュベートした。洗浄工程後、細胞結合F a bまたはI g Gを、F A C Sバッファーで1 : 2 0 0で希釈されたフィコエリトリン—接合ヤギ抗—ヒトI g G（H + L）二次抗体で検出した。震盪器上で4℃で1時間インキュベーション後、該細胞を再び洗浄し、F A C Sバッファーで再懸濁し、該細胞の蛍光強度をF A C S C a l i b e r ^{T M}装置で決定した。

20

【0288】

親和性測定表面プラズモン共鳴（B i a c o r e）を使用する選択された抗—ヒトA c t R I I B F a bの親和性測定

直接的抗原固定化標準E D C — N H Sのために、アミンカップリング化学を使用した。C M 5チップ（B i a c o r e、S w e d e n）を、10 m Mの酢酸バッファー、p H 4 . 5中の約6 0 0 0 R Uのヒト—もしくはマウス—A c t R I I B / F c、または約1 5 0 0 R Uのヒト—A c t R I I A / F c（抗原の活性にしたがって）でコーティングした。参照フロー細胞のために、それぞれの量のH S Aを使用した。再生を5 μ lの10 m Mのグリシン / H C l バッファー p H 1 . 5で行った。

30

【0289】

あるいは、抗原を直接固定せず、C M 5チップ上に捕獲し、抗—ヒト—F c抗体（F c捕獲キット、G E H e a l t h c a r e / B i a c o r e）で修飾した。参照フロー細胞について、捕獲抗体を固定したが、抗原を捕獲しなかった。再生を、5 μ Lの3 MのM g C l ₂の2回の注射を使用して成し遂げた。

【0290】

速度論的定量をF a bサンプルの連続希釈列を使用して20 μ l / 分の流速でD u l b e c c oのP B S中で行った。F a b濃度は、1 5 . 6から5 0 0 n Mの範囲であった。それぞれの濃度に対する注射時間は1分であった。解離時間を少なくとも2分（またはそれ以上、測定される親和性にしたがって）に合わせた。直線的バッファーのブランク注射を二重参照のために使用した。全てのセンサーグラムを、B I A評価ソフトウェア3 . 2（B i a c o r e、S w e d e n）を使用して包括的に合わせた。

40

【0291】

C Kアッセイ

細胞をG Mから骨格筋基礎培地（s k B M）からなる無血清分化培地へ変化させることにより、播種24時間後に分化を開始した。細胞をミオスタチン（R & D s y s t e m s）または他のT G F — bタンパク質の存在および非存在下で3日間で分化させ、所定の濃度で抗体を試験した。細胞をP B Sで洗浄し、次に、レポーター溶解バッファー（P r o m e g a）で溶解し、測定まで—80℃で保存した。C K活性をC K（I F C C）試薬

50

(Thermo Electron) を使用して測定した。CK 試薬を製造業者の指示にしたがって調製した。細胞溶解物を室温に調節し、CK 試薬を加え、吸光度を即座に 340 nm で 20 分間、1 分間隔で読んだ。CK 標準曲線を、ウサギ筋肉由来の CK (Roche Diagnostics) を使用して新たに作成した。タンパク質含有量を BCA キットを使用して決定した。

【0292】

動物モデル

9 週齢のメス C B 1 7 / I C R - P r k d c s c i d / C r l マウス (グループ当たり $n = 10$ 、Charles River, Germany) を体重でランダム化し、次に 10 mg / kg の用量で抗-ヒト ActRIIB 抗体 (MOR 8159、MOR 8213) または IgG コントロール抗体を (試験 1 ; 比較試験)、または 25、5 または 1 mg / kg の用量で MOR 8213 を (試験 2 ; 用量応答試験)、0、3、7、14、21、28 および 35 日目に (1 週間に 1 回と 3 日目) 腹腔内に処置した。体重を 1 週間当たり 2 回測定した。投与 6 週間 (42 日間) 後、マウスを CO₂ で安楽死させた。脛骨筋、足底を有する腓腹筋、大腿四頭筋および胸筋を回収し、計量した。

【0293】

処置プロトコール

コントロール抗体 : 抗-ニワトリ リゾチーム-h IgG

濃度 : 2 mg / mL (試験 1)、5 mg / mL (試験 2)、適用量 : 5 mL / kg

ビヒクル : 50 mM のクエン酸、140 mM の NaCl または PBS

抗-ヒト ActRIIB 抗体 : 抗 ActRIIB-MOR 8159 および MOR 8213、h IgG、

濃度 : 2 mg / mL (試験 1)、5 mg / mL (試験 2)、1 mg / mL (試験 2)、0.2 mg / mL (試験 2)、適用量 : 5 mL / kg

ビヒクル : 50 mM のクエン酸、140 mM の NaCl

【0294】

処置グループ :

試験 1 ; MOR 8159 と MOR 8213 の比較

1 IgG コントロール、i. p. (抗-ニワトリ リゾチーム-IgG)、10 mg / kg

2 抗 ActRIIB-MOR 8159、i. p.、10 mg / kg

3 抗 ActRIIB-MOR 8213、i. p.、10 mg / kg

試験 2 ; MOR 8213 の用量応答

1 IgG コントロール、i. p. (抗-ニワトリ リゾチーム-IgG)、25 mg / kg

2 抗 ActRIIB-MOR 8213、i. p.、25 mg / kg

3 抗 ActRIIB-MOR 8213、i. p.、5 mg / kg

4 抗 ActRIIB-MOR 8213、i. p.、1 mg / kg

【0295】

メンテナンス条件

動物を、25 °C で 12 : 12 時間の明暗サイクルで 4 から 5 匹の動物のグループにおいて飼った。それらに 15.8 MJ / kg のエネルギーを有する 18.2 % のタンパク質および 3.0 % の脂肪を含む標準実験食 (NAFAG 3890、Kliba) を与えた。食料および水は自由に与えた。動物実験を、Canton of Basel-City、Switzerland において有効な規則にしたがって行った。

【0296】

方法

統計分析

結果を平均 + / - SEM として示す。統計分析を、Dunnett の複合比較試験、次に一元配置分散分析を使用して実施した。処置 (抗 ActRIIB 抗体 MOR 8159 お

10

20

30

40

50

よびMOR8213をコントロール（コントロール抗体）との差について試験し、差が確率値が <0.05 であるとき有意であると考えた： $*$ ： $P<0.05$ 、 $**$ ： $P<0.01$ 、NS：IgGコントロールに対して有意でない。統計分析は、GraphPad Prismバージョン5.0（GraphPad Software, Inc）により行った。体重は0日目の体重を引くことにより計算し、筋肉重量は0日目の体重（最初の体重）により標準化した。

【0297】

パニング、抗体同定および特性化

ヒトActRIIBタンパク質に対する治療用抗体を、抗体変異体タンパク質の供給源として、市販のファージディスプレイライブラリー、MorphoSys HuCAL GOLD（登録商標）ライブラリーを使用して、高い結合親和性を有するクローンの選択により調製した。

10

【0298】

HuCAL GOLD（登録商標）ライブラリーは、全6つのCDRが適当な方法により多様化されるFabライブラリー（Knappik et al., 2000）であり、ファージ表面へのFabの連結のためのCys DisplayTM技術を使用する（WO01/05950）。

【0299】

HuCAL GOLD（登録商標）ファージミドライブラリー（Rothe et al., 2008）を、特異的Fab抗体フラグメントを選択するために使用した。

20

【0300】

ライブラリーからActRIIB—特異的抗体のパニングによる選択

ヒトActRIIBを認識する抗体の選択のために、いくつかのパニング戦略を利用した。

【0301】

要約すると、HuCAL GOLD（登録商標）抗体—ファージを、異なるVHマスター遺伝子を含むいくつかのプールに分けた。

【0302】

これらのプールを個々に示差的細胞パニングに付し、それによって、ヒトActRIIBで一過性にトランスフェクトされた細胞における選択ラウンドを、組換えヒトActRIIB/Fcタンパク質における選択ラウンドと交替させた。

30

【0303】

i. 全細胞パニング

パニングにおいて、PBSに希釈されたファージ粒子を等容量のPBS/BSAと混合し、ブロックした。並行して、あらかじめブロックされたチューブ中においても、ファージプール当たり 1×10^7 個のそれぞれのhActRIIBを発現する細胞を、PBS/3%のFCS/0.04%のNaN₃で再懸濁し、震盪器で4℃で1時間ブロックした。ブロックされた細胞を遠沈し、あらかじめブロックされたファージ粒子で再懸濁し、3時間インキュベートした。その間に、ファージプール当たり 1×10^7 個のhActRIIBノックダウン細胞を調製した。

40

【0304】

ファージ—細胞複合体をPBS/BSAで洗浄し、次にPBSで洗浄した。hActRIIBを発現する細胞からファージ粒子の溶離を、グリシンバッファー、pH2.2で酸性溶離により行った。遠心分離後、溶離物を非緩衝Trisを加えることにより中和した。

【0305】

感染および次の遠心分離後に、細菌ペレットを2×YT培地で再懸濁し、LB/CAM/Glc寒天プレート上に置き、37℃で一晩インキュベートした。次の朝、コロニーをプレートから掻き取り、ファージをレスキューし、増幅した。

【0306】

50

i i . 固相パニング

固相パニングのために、組換えヒトA c t R I I B / F cをM a x i S o r p^{T M}プレート上に4℃で一晩コーティングした。PBSで洗浄後、コーティングされたウェルを5%のMPBSTでブロックした。

【0307】

選択前に、H u C A L G O L D（登録商標）ファージをブロッキングバッファーにあらかじめ吸着させた。ブロックされたファージをコーティングされた抗原に加え、室温で2時間インキュベートした。非特異的ファージをPBSTおよびPBSで洗い落とした。結合したファージを20mMのDTTの添加により溶離した。溶離物を大腸菌T G - 1培養物の感染のために使用した。感染後、細菌をL B / C A M / G l c寒天プレート上に置き、37℃で一晩インキュベートした。次の朝、コロニーをプレートから掻き取り、ファージをレスキューし、増幅した。

【0308】

最も成功したパニングアプローチは、A c t R I I BをトランスフェクトされたH E K 2 9 3 T / 1 7細胞における第1のパニングラウンド、次に組換えヒトA c t R I I B / F cにおける選択ラウンド、再びトランスフェクトされた細胞でのものを有する示差的細胞／タンパク質パニングであることを証明した。

選択されたF a bを、親またはr h A c t R I I BをトランスフェクトされたH E K 2 9 3細胞への結合について分析した。

【0309】

M O R 0 7 0 7 9 F a bは、20nMのE C 5 0でA c t R I I Bートランスフェクトされた細胞に優先的に結合した（図1）。ミオスタチン結合阻害E L I S Aにおいて、M O R 0 7 0 7 9 F a bは、阻害活性を示し、ミオスタチンへのr h A c t R I I B / F c結合をブロックした。E L I S Aにおける強いミオスタチン結合阻害は、M O R 0 7 0 7 9に対してH E K 2 9 3 - C A G A 1 2を使用するレポーター遺伝子アッセイにおいてミオスタチン阻害により反映した。特異性E L I S Aを使用して、M O R 0 7 0 7 9は、ヒトおよびマウスA c t R I I Bに特異的に結合するが、非制御T G F β R I I、A L K 4およびA L K 5受容体に結合しないことを示した。M O R 7 0 7 9は、また、A c t R I I Aと比較してA c t R I I Bに優先的に結合することを示した。

【0310】

H u C A L（登録商標）免疫グロブリンの生産

i . I g G型へのF a bの変換

全長免疫グロブリン（I g）を発現するために、重鎖（V H）および軽鎖（V L）の可変ドメインフラグメントを、ヒトI g G 2に対してp M O R P H（登録商標）X 9 __ F H F a b発現ベクターからp M O R P H（登録商標）2 __ h __ I gベクターシリーズへサブクロニングした。選択されたクローンも、また、位置2 3 4および2 3 5でのロイシンをアラニンに変異されているサイレントI g G 1 L A L A型に変換し、F c R γ結合を破壊し、エフェクター機能を軽減させる。

【0311】

適当な制限酵素（Knappik et al., 2000）を、p M O R P H（登録商標）2 __ h __ I g G 2、p M O R P H（登録商標）2 __ h __ I g G 1 L A L A、p M O R P H（登録商標）2 __ h __ I g κ、およびp M O R P H（登録商標）2 __ h __ I g λ 2へのV HおよびV Lドメインフラグメントのサブクロニングのために使用した。

全てのDNA調製物を、H K B 1 1細胞へのトランスフェクション前に配列分析に付した。

【0312】

i i . ヒトI g Gの一過性発現および精製

真核H K B 1 1細胞をI g Gの重鎖および軽鎖発現ベクターDNAでトランスフェクトした。細胞培養物上清をトランスフェクション後3または7日目に回収し、標準p r o t e i n A親和性クロマトグラフィーに付した。他に記載のない限り、バッファー交換を

10

20

30

40

50

1 × D u l b e c c o の P B S (p H 7 . 2) に行い、サンプルを滅菌濾過した (0 . 2 μ m) 。

【0313】

C D R - L 3 および C D R - H 2 成熟ライブラリー

選択された抗体フラグメントの親和性および生物学的活性を増加させるために、C D R - L 3 および C D R - H 2 領域を、並行して、トリヌクレオチド指向変異誘発 (Virnekas et al., 1994, Nucleic Res. 22:5600-5607) を使用するカセット変異誘発により最適化し、それによりフレームワーク領域は定常を維持する (Nagy et al., 2002, Nature Medicine, 8:801-807) 。成熟ライブラリーのクローニングの前に、全ての親 F a b フラグメントを、発現ベクター p M O R P H (登録商標) X 9 から C y s D i s p l a y ^{T M} 成熟ベクター p M O R P H (登録商標) 2 5 へ X b a I / E c o R I 制限酵素認識部位を介して移動させた。このベクターは、N - 末端でシステイン残基に融合しているファージタンパク質 p I I I ならびに F d 抗体鎖に融合した C - 末端システインを提供し、したがって、ファージ表面上のそれぞれの F a b フラグメントのジスルフィド連結ディスプレイを可能にする。

【0314】

C D R - H 2 ライブラリーの産生のために、それぞれの親 F a b の C D R - H 2 領域を切除し、高度に多様化された C D R - H 2 成熟カセットに置き換えた。

並行して、親クロンの C D R - L 3 領域を多様化された C D R - L 3 成熟カセットに置き換えた。

【0315】

成熟ライブラリーのサイズは、 4×10^5 から 1×10^8 個のクロンの範囲であった。ベクターバックグラウンドは、全ての場合において 1 % 未満であった。単一クロンの配列決定による品質管理は、高質のそれぞれのライブラリーを示した。

それぞれの C D R - L 3 および C D R - H 2 成熟ライブラリーについて、抗体ディスプレイファージを調製し、ファージ力価をスポット滴定により決定した。

【0316】

親和性成熟に関するパニング戦略

以下の成熟ライブラリーからの抗体ディスプレイファージを、別々のパニングおよびスクリーニングに付した：

リード 1 : M O R 0 7 0 7 9 (L - C D R 3 成熟)

リード 1 : M O R 0 7 0 7 9 (H - C D R 2 成熟)

それぞれの抗体を使用する成熟パニングを、ビオチン化 h A c t R I I B / F c および h u S k M C について行った。

【0317】

新たに産生された成熟ライブラリーからレスキューされたサブコード当たり 2×10^{10} または 1×10^{11} 個のいずれかのファージを、第 1 の選択ラウンドに対して使用した。

いくつかの示差パニングを行い、それにより、組換えビオチン化 h A c t R I I B / F c における選択ラウンドを h u S k M C における選択ラウンドと交替させた。

【0318】

溶液パニングの第 1 および第 3 ラウンドにおいて、ビオチン化組換え h A c t R I I B / F c を、ストレプトアビジン-コーティング D y n a b e a d 上に捕獲した。以下のプロトコルを適用する：それぞれのファージプールについて、ストレプトアビジンビーズを P B S で洗浄し、ブロッキングバッファーで再懸濁した。P B S に希釈したファージ粒子を 0 . 1 % の T w e e n 2 0 を含むブロッキングバッファーと混合し、回転ホイール (rotating wheel) 上に維持した。ストレプトアビジン-もしくはビーズ-結合ファージの除去のためにファージ粒子のプレクリーニングを 2 回行った：ファージプール毎に、ブロックされたストレプトアビジンビーズをブロックされたファージ粒子に加え、回転ホイール上でインキュベートした。磁気装置を介してビーズの分離後、ファージ上清を新鮮なあ

あらかじめブロックされた反応チューブに移し、前吸着を繰り返した。

【0319】

ブロッキング処理後、ビオチン化 h A c t R I I B / F c 抗原をプレクリーニングされ、ブロックされたファージ粒子に加え、回転ホイール上でインキュベートした。ファージ-抗原複合体をブロックされたストレプトアビジンビーズを使用して捕獲し、ファージパニングプールに加え、さらにインキュベートした。ストレプトアビジンビーズに結合したファージ粒子を回収した。次に、ビーズを P B S T および P B S で洗浄した。ストレプトアビジンビーズからファージ粒子の溶離を 20 mM の D T T の添加により行った。溶離物を回収し、0.6-0.8 の O D_{600nm} にまで増殖させる大腸菌 T G - 1 培養の感染のために使用した。

10

【0320】

感染および次の遠心分離後、細菌ペレットを 2 × Y T 培地で再懸濁し、L B / C A M / G l c 寒天プレート上に置き、37℃で一晩インキュベートした。次の朝、コロニーをプレートから掻き取り、ファージをレスキューし、ヘルパーファージ感染細胞を 0.25 mM の I P T G を含む培地中で 22℃で一晩培養することを出いて、主に (Krebs et al., 2001) に記載されているとおりに増幅した。ビオチン化 h A c t R I I B / F c における溶液パニングの第 3 のラウンドを、使用される抗原の量を減少させ、洗浄条件のストリンジエンシーを増加させることを除いて、第 1 のラウンドのプロトコールにしたがって行った。

【0321】

パニングの第 2 のラウンド (内因性 h A c t R I I B を発現する h u S k M C における) のために、P B S に希釈したファージ粒子を等量の P B S / B S A と混合し、ブロックした。並行して、それぞれのサブコードに対して、 9×10^5 個の h u S k M C を 4℃で P B S / F C S / 0.02% の N a N₃ でブロックした。ブロックされた細胞を遠沈し、あらかじめブロックされたファージ粒子と共に再懸濁し、さらにインキュベートした。

20

【0322】

ファージ-細胞複合体を P B S / B S A で洗浄し、次に P B S で洗浄した。細胞を 410 × g で 4℃で 2 分遠心した。h A c t R I I B を発現する h u S k M C からファージ粒子の酸性溶離を、グリシンバッファー p H 2.2 で 10 分間インキュベーション工程により行った。遠心分離後、溶離物を非緩衝 T r i s を加えることにより中和した。上清を含むファージを 0.6-0.8 の O D_{600nm} にまで増殖させる大腸菌 T G - 1 培養の感染のために使用した。

30

【0323】

感染および次の遠心分離後、細菌ペレットを 2 × Y T 培地で再懸濁し、L B / C A M / G l c 寒天プレート上に置き、37℃で一晩インキュベートした。次の朝、コロニーをプレートから掻き取り、ファージをレスキューし、ヘルパーファージ感染細胞を 0.25 mM の I P T G を含む培地中で 22℃で一晩培養することを出いて、主に (Krebs et al., 2001) に記載されているとおりに増幅した。

【0324】

非常に強力な結合剤において得られる最も成功したパニングアプローチは、ビオチン化 A c t R I I B / F c において行われた第 1 および第 3 ラウンドならびに h u S k M C において行われた第 2 のラウンドを有する示差的パニングであることを証明した。

40

配列決定後、F a b を発現および精製のために選択し、最も有望なさらなる特徴付けを行った。

【0325】

多数の抗 A c t R I I B 抗体は、単一において低い二桁のナノモル範囲までの E C 50 値で h A c t R I I B - トランスフェクトされた H E K 2 9 3 T / 1 7 細胞に結合することを示した。いくつかの F a b は、ミオスタチン結合阻害 E L I S A において A c t R I I B / F c からミオスタチンに移動するが、それらのうちの M O R 0 8 0 6 7 のみが、レポーター遺伝子アッセイにおいてミオスタチン誘導活性の完全阻害を示した (図 2)。

50

【0326】

ヒトおよびマウスA c t R I I B / F cに対する多数の有望なF a bの要約された親和性を以下の表に記載する（表1）。

【表1】

F a b	K D 決定 (B i a c o r e)	
	ヒトA c t R I I B - F c K D [nM]	マウスA c t R I I B - F c K D [nM]
M O R 0 7 0 7 9	5 1	6 2
M O R 0 8 0 4 7	2 3	2 2
M O R 0 8 0 6 2	1 5	1 7
M O R 0 8 0 6 7	< 0 . 1	< 0 . 1
M O R 0 8 0 7 7	1 1	1 3
M O R 0 8 0 7 8	9	1 0

表1：A c t R I I B抗原に対する抗A c t R I I B F a b - F Hの親和性データ

【0327】

F a bクローンM O R 0 8 0 6 7は、ミオスタチン誘導R G Aならびにr h A c t R I I BをトランスフェクトされたH E K 2 9 3細胞への結合における良い阻害を示した。B i a c o r eによる親和性測定は、100 pM未満のヒトおよびマウスA c t R I I B / F cに対するK D値を示した。M O R 0 8 0 6 7および他の候補物をクロスクローニングアプローチによりさらなる最適化のために選択し、可能性のあるN-連結グリコシル化部位を含むM O R 0 8 0 6 7を、また、脱グリコシル化アプローチに付した。

【0328】

第1の親和性成熟由来の抗体の最適化

a) M O R 0 8 0 6 7の脱グリコシル化

配列分析にしたがって、この抗体は、重鎖のC D R - H 2内に可能性のあるN-連結グリコシル化部位を含んだ。この部位を除去し、M O R 0 8 1 5 6およびM O R 0 8 1 5 9を得た。これらのM O R 0 8 0 6 7-誘導体の特性化は以下に記載されている。

【0329】

b) 最適化されたF a bのクロスクローニング

さらなる機能性改善およびC D R - H 2および／またはC D R - L 3における可能性のあるN-連結グリコシル化部位の除去のために、第1の親和性成熟による単一の親和性成熟F a b由来の独立して最適化されたC D R - H 2およびC D R - L 3領域を組み合わせた。それぞれのファミリーは独立し続けている。M O R 0 7 0 7 9の子孫をクロスクローニングに入れた。約200の細菌溶解物をH E K 2 9 3 T / 1 7 / A c t R I I BにおけるF A C S親和性ランキングにおいて試験し、最も有望なF a bクローンのM O R 0 8 1 4 4およびM O R 0 8 2 1 3を発現し、精製した。

【0330】

c) 最適化された抗体の特性化

以下のセクションにおいて、M O R 0 8 0 6 7の脱グリコシル化子孫（M O R 0 8 1 5 6、M O R 0 8 1 5 9）およびM O R 0 8 0 6 7由来の2つのクロスクローン（M O R 0 8 1 4 4およびM O R 0 8 2 1 3）を、詳細に記載する。

【0331】

レポーター遺伝子アッセイにおけるミオスタチンシグナル伝達を阻害する最適化されたF a bの能力を、最も高い濃度で> 95%阻害を誘導することができる全ての結合剤で測定した（図3）。

【0332】

B i a c o r eを使用する親和性測定実験において、M O R 0 8 1 5 9およびM O R 0

8213を、ヒトおよびマウスA c t R I I Bの両方への非常に強力な結合剤として同定した（表2）。成熟され最適化されたF a bの親和性の増加が、ミオスタチン誘導レポーター遺伝子アッセイにおける有効性の増加を反映することは明らかになった。

【表2】

F a b	K D 決定 (B i a c o r e)	
	ヒトA c t R I I B－F c K D [pM]	マウスA c t R I I B－F c K D [pM]
M O R 0 8 1 5 9	3. 8	3. 1
M O R 0 8 2 1 3	13. 2	13. 5

10

表2：A c t R I I B抗原に対する抗A c t R I I B F a bの親和性データ

【0333】

親和性成熟F a b（第1の成熟）のI g G 2変換

第1の親和性成熟由来の多数の有望なF a bをI g G 2変換について選択した。

I g G 2発現をH K B 1 1細胞の一過性トランスフェクションにより行い、全長免疫グロブリンを細胞培養物上清から精製した。

【0334】

I g Gへ変換されたとき、全ての候補物は、レポーター遺伝子アッセイにおいてミオスタチン誘導活性を用量依存的に阻害する能力を維持していた（表3）。

20

【表3】

I g G	I C 5 0 [nM]	阻害%
M O R 0 8 0 6 7	2. 57	86. 5
M O R 0 8 1 4 4	0. 5	94. 9
M O R 0 8 1 5 6	0. 19	97. 4
M O R 0 8 1 5 9	0. 32	99
M O R 0 8 2 1 3	0. 32	98. 6

表3：ミオスタチン誘導ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおける抗A c t R I I B I g GのI C 5 0決定

30

【0335】

M O R 0 8 1 5 9およびM O R 0 8 2 1 3がヒト初代筋芽細胞へ結合する能力をF A C Sにより試験し、それらの細胞への特異的結合を、これらの細胞上のA c t R I I Bの低い発現に沿って報告した（図4）。

【0336】

M O R 0 8 1 5 9およびM O R 0 8 2 1 3は、初代骨格筋芽細胞分化のミオスタチン誘導阻害を完全に逆転する能力を示した（図5）。これらの抗体は、また、内因的に生産されたA c t R I I Bリガンドを中和する能力によって、外因性ミオスタチンの非存在下で分化の上記基底レベルを増加させた。

40

【0337】

第2の親和性成熟

有効性をさらに改善する第2の親和性成熟のための候補物の選択

i. C D R－L 3およびC D R－H 2成熟ライブラリーの構築

選択された抗体フラグメント（例えば、M O R 0 8 0 6 7）の親和性および生物学的活性の両方を増加させるために、C D R－L 1およびC D R－H 2領域をトリヌクレオチド指向変異誘発（Virnekas et al. [上記]）を使用するカセット変異誘発により最適化し、それにより、フレームワーク領域は定常を維持した（Nagy et al. [上記]）。成熟ライブラリーのクローニングの前に、全ての親F a bフラグメントを、X b a I／E c o R I制限酵素認識部位を介して、発現ベクターp M O R P H（登録商標）X 9からC y s D

50

i s p l a y ^{T M} 成熟ベクター p M O R P H (登 録 商 標) 2 5 に移した。

【0338】

全ての成熟ライブラリーのサイズは、いつも、最低限の 1×10^7 個の独立クローンを産生した。ベクター背景は、全ての場合において1%未満であった。単一のクローンの配列決定による品質管理は、高品質のそれぞれのライブラリーを示した。

【0339】

C D R - L 1 および C D R - H 2 成熟ライブラリーのそれぞれについて、抗体提示ファージを作製し、ファージ力価をスポット滴定により決定した。

【0340】

i i . 改善された抗体に対するパニング戦略、親和性の順位付けおよびスクリーニング

親和性成熟の第2のラウンドのための示差のパニングは、親 H E K 2 9 3 T / 1 7 細胞および低レベルで内因的にヒト A c t R I I B を発現する h u S k M C を含んだ。さらに、組換えビオチン化 h A c t R I I B / F c 抗原は、全てのパニング戦略において含まれた。

【0341】

抗 A c t R I I B F a b の順位付けのために、約 2 7 0 0 個の細菌溶解物（それぞれのパニングサブコードに対して～88クローン）を、M S D ベース方法において、組換えビオチン化 h A c t R I I B / F c 抗原および h A c t R I I B をトランスフェクトされた H E K 2 9 3 T / 1 7 細胞の膜小胞調製物における親和性を順位付けした。高親和性順位付け因子でのヒットを並べた。

【0342】

加えて、ヒットとして表れなかったランダムに選択されたクローンを、F A C S 親和性順位付けにおいて評価した。このために、細菌溶解物を、親 H E K 2 9 3 T / 1 7 および／または h A c t R I I B をトランスフェクトされた H E K 2 9 3 T / 1 7 細胞を使用してスクリーニングした。細胞結合 F a b をフィコエリトリン-接合ヤギ抗-ヒト I g G (H + L) 二次抗体で検出した。溶解物における F a b 発現の定量化を並行して行った。

【0343】

全てのパニング戦略は、抗 A c t R I I B 特異的抗体を生じた。M O R 0 8 0 6 7 子孫は、配列分析後に同定することができた。全ての結合剤は、C D R - H 2 において変異させた。

【0344】

I g G 2 変換および I g G 2 の特性化 (第 2 の成熟)

再び、第2の親和性成熟由来の最も有望な F a b を、I g G 2 変換のために選択した。I g G 2 発現を H K B 1 1 細胞の一過性トランスフェクションにより行い、全長免疫グロブリンを細胞培養物上清から精製した。

【0345】

試験された全ての I g G は、初代骨格筋芽細胞分化のミオスタチン誘導阻害を完全に逆転させることができる (表 4) 。

【表4】

I g G	C K アッセイ I C 5 0 [n M]
M O R 0 8 1 5 9	1 . 8 9
M O R 0 8 2 1 3	1 . 7
M O R 0 8 8 0 6	0 . 5 2
M O R 0 8 8 0 7	5 . 0 2
M O R 0 9 0 3 2	1 . 0 2
M O R 0 9 0 5 8	2 . 3

表 4 : 骨格筋分化アッセイのミオスタチン誘導阻害における抗 A c t R I I B I g G の I C 5 0 決定

【0346】

我々は、初代ヒト骨格筋芽細胞におけるA c t R I I B h wのミオスタチンならびに他のT G F β ファミリーリガンドの結合を中和する抗A c t R I I B A bの能力を評価した。筋芽細胞分化アッセイにおいて、我々は、非存在またはM O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3のいずれかの存在下で分化を阻害する可能性のある種々のリガンドを評価した。

【表5】

	Abなし		MOR08159		MOR08213	
TGF β ファミリーリガント	IC ₅₀ (ng/ml)	E _{max} (%コントロール)	IC ₅₀ (ng/ml)	E _{max} (%コントロール)	IC ₅₀ (ng/ml)	E _{max} (%コントロール)
ミオスタチン	8.5 $\pm$ 0.6	25.7 $\pm$ 1.5	42.7 $\pm$ 5.8	28.9 $\pm$ 4.8	35.1 $\pm$ 5.1	35.3 $\pm$ 4.5
GDF-11	7.0 $\pm$ 1.2	23.2 $\pm$ 3.8	13.3 $\pm$ 0.9	22.1 $\pm$ 2.1	12.0 $\pm$ 1.0	27.1 $\pm$ 2.6
アクチビンA	14.7 $\pm$ 2.9	37.1 $\pm$ 3.9	34.7 $\pm$ 9.0	61.9 $\pm$ 5.4	41.9 $\pm$ 3.4	57.2 $\pm$ 1.9
BMP-2	26.9 $\pm$ 2.6	2.6 $\pm$ 4.2	34.0 $\pm$ 2.6	5.1 $\pm$ 3.4	32.3 $\pm$ 1.4	4.8 $\pm$ 1.9

表5：M O R 0 8 1 5 9 / M O R 0 8 2 1 3 (1 0 μ g / m l) の存在または非存在下での骨格筋分化アッセイの種々のリガンド誘導阻害のI C 5 0およびE m a x決定

【0347】

ミオスタチンおよびG D F - 1 1は、同様の有効性で、同様の程度でヒト筋芽細胞分化を阻害することができる。単一の濃度のM O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3の存在下で、ミオスタチンおよびG D F - 1 1用量応答を同じ方法で移動させた。アクチビンAは、また、分化を阻害することができるが、しかしながら、M O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3の存在下で、我々は、E m a xおよび効力における変化を伴う非平行移動を観察した。B M P - 2応答はM O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3の存在により影響せず、それがA c t R I I B結合を介して生じないことを示唆した。

【0348】

インビボでのマウス試験における抗A c t R I I B抗体の特性化

筋肉肥大を誘導する抗A c t R I I B抗体の能力を、週毎に1 0 m g / k g i . pで6週間、M O R 0 8 1 5 9またはM O R 0 8 2 1 3を投与したS C I Dマウスにおいて評価した(図6)。

【0349】

両方の抗体は、試験終了時に全ての試験された筋肉の大規模な肥大を誘導することができた。抗A c t R I I B抗体で処置されたマウスの全体重における有意な増加が、処置の1週間後と早期に検出された。

【0350】

M O R 0 8 2 1 3は、5および2 5 m g / k gで全ての試験された筋肉の用量依存に大規模な肥大を誘導することができたが、有意な変化は1 m g / k g用量で現れなかった(図7)。

【0351】

交差阻止試験

安定なヒトA c t R I I BをトランスフェクトされたH E K 2 9 3 T / 1 7細胞を、1 0 %のF B S、2 m MのL - グルタミン、ペニシリン(5 0 I E / m l)、ストレプトマイシン(5 0 μ g / m l)およびピューロマイシン(2 μ g / m l)を含むD M E Mに維持した。細胞を3 7 $^{\circ}$ Cで5 %のC O ₂でインキュベーター中で増殖させ、3 - 4日毎に二次培養した。細胞をA c c u t a s e ^{T M}を使用して引き離し、次に新鮮な培地を含む新しいフラスコに移した。

【0352】

ヒトA c t R I I Bの同じエピトープに結合する抗A c t R I I B抗体の能力を、h A c t R I I Bを発現する細胞を使用して、F A C Sにより評価した。

【0353】

このために、抗A c t R I I B I g Gを、ウェル当たり 1×10^5 個のh A c t R I I Bートランスフェクトされた細胞と1時間4℃とインキュベートした。洗浄後、異なるビオチン化抗A c t R I I B I g Gまたはコントロールビオチン化I g Gを、1時間4℃で第1の抗A c t R I I B I g Gと等モル濃度でインキュベートした。洗浄後、細胞結合ビオチン化I g Gをストレプトアビジン-A P C (B i o l e g e n d)で検出した。4℃で1時間インキュベーション後、該細胞を再び洗浄し、F A C S バッファーで再懸濁し、該細胞の蛍光強度をF A C S A r r a y ^{T M}装置で決定した。

【0354】

M O R 0 8 1 5 9 およびM O R 0 8 2 1 3を、F A C SによりヒトA c t R I I Bをトランスフェクトされた細胞へ共同で結合する能力について試験し、M O R 0 8 1 5 9のみ(太い黒線)またはM O R 0 8 2 1 3の存在下でのM O R 0 8 1 5 9(太い点線)の特異的な結合を、アイソタイプコントロール(黒線)またはM O R 0 8 2 1 3の存在下でのアイソタイプコントロール(点線)と比較して報告した(図8)。

【0355】

M O R 0 8 2 1 3の存在下で、M O R 0 8 1 5 9の結合は有意に減少し、これら2つの抗体が、同じ部位、または、ある程度の重複を有し得るか、もしくは近くの部位であるが異なっているM O R 0 8 2 1 3の結合がM O R 0 8 1 5 9の結合を立体的に妨げ得る部位のいずれかに結合をすることが示唆された。

【0356】

エピトープマッピング

いくつかの相補的方法を、抗体M O R 0 8 1 5 9が結合するエピトープを決定するために使用した。この実施例において、残基番号付けは、全長A c t R I I Bアミノ酸配列を基準にする(配列番号: 181)。

【0357】

ドットプロット

M O R 0 8 1 5 9エピトープのドットプロット分析を実施した。天然および変性(還元および熱変性)A c t R I I Bでニトロセルロース膜上にスポットし、M O R 0 8 1 5 9でプローブし、標識化抗-ヒト抗体で検出した。天然A c t R I I Bのみが減少しなかったが、熱変性A c t R I I Bは検出された。該結果は、エピトープが立体構造エピトープであることを示した。

【0358】

変異試験

A c t R I I B(a a 2 1-120)の細胞外ドメインのライブラリーを変異性P C Rにより産生し、変異体が大腸菌のペリプラズムにおいて発現した。M O R 0 8 1 5 9への約30'000(理論的なライブラリーサイズのわずか)のこれらの変異体の結合を、コロニーフィルタースクリーニングおよびウェスタン染色により試験した。1週間だけ示すか、またはM O R 0 8 1 5 9への結合示さない変異体を、E L I S Aによりさらに確認した。A c t R I I B変異体の発現レベル(抗-F l a g抗体で検出される)およびM O R 0 8 1 5 9結合を、野生型A c t R I I Bと比較した。発現が野生型の少なくとも75%であり、M O R 0 8 1 5 9への結合が25%未満であったとき、変異がM O R 0 8 1 5 9結合に関連するとみなした。明らかな構造の歪み(例えば、S-S架橋システインの変異であろうような)ではない単一点変異を有する変異体のみを考慮した。

【0359】

M O R 0 8 1 5 9結合を防止する多数の変異体が位置K 7 5からD 8 1の範囲において見出され、この領域が抗体結合に対して重要であることを示した。位置W 7 8、D 8 0およびD 8 1での変異は、M O R 0 8 1 5 9結合を有意に減少させることを見出した。

【0360】

環状ペプチドアレイ

ペプチドマイクロアレイで提示された抗原由来環状ペプチドの回収物を、興味ある抗体

10

20

30

40

50

とインキュベートした。ペプチド抗体結合の決定を、ペプチドマイクロアレイを一次抗体、次に一次抗体のFc部分に対する蛍光的に標識された二次抗体とインキュベートするRep1iTope分析により実施した。数回の洗浄工程後、ペプチドマイクロアレイをマイクロアレイ遠心機を使用して乾燥させ、適当な波長セッティングで高分解能マイクロアレイスキャン系でスキャンした。

【0361】

マイクロアレイは、ActRIIB (Serへ交換されたCys残基を有する) 由来の環状ペプチドをそれぞれ示す3つのサブアレイからなり、これをスキャンした (ペプチドスキャンフォーマット15/12)。コントロール実験として、非関連抗体 (ACE18543、アイソトープコントロール)、次に蛍光的に標識された二次抗体 (Cy5標識抗-ヒトIgG) とのインキュベーションを、偽陽性シグナルを決定するために実施した。さらに、標的抗体、次に蛍光的に標識された二次抗体でのインキュベーションを実施した。

10

【0362】

抗体MOR08159 (ACE19819) は、3つの試験されたペプチド (番号18-20) において見出された1つのエピトープを認識することを示した。

18 IELVKKG SWLDDFNS (配列番号: 183)

19 VKKG SWLDDFNSYDR (配列番号: 184)

20 GSWLDDFNSYDRQES (配列番号: 185)

20

【0363】

MOR08159が結合すると考えられるこれらのペプチドの共通する配列は、76GCWLDDFNC84 (配列番号: 186) である。

【0364】

より弱い結合特性を有する第2の領域も、この方法を使用して同定した。この第2の領域は、配列49CEGEQDKRLHCYASW63 (配列番号: 187) を有する。

【0365】

X線結晶学

ヒトActRIIB aa20-120およびaa24-117を発現した。加えて、MOR08159 FabおよびFv領域を発現し、精製した (全ての発現は大腸菌において行った)。これらのタンパク質を使用して、4つのタンパク質複合体を調製し、精製し、結晶化した (MOR08159 Fab-ActRIIB 20-120、MOR08159 Fab-ActRIIB 24-117、MOR08159 Fv-ActRIIB 20-120、MOR08159 Fv-ActRIIB 24-117)。

30

【0366】

遊離MOR08159 FabのX線構造を1.78 Å分解能で解析した。ActRIIB-LBDとのFv複合体のX線構造を3.35 Å分解能で解析した。接触残基を決定するために標準3.9 Å距離カットオフを使用して、配列76GCWLDDFNC84が78WLDDFN83配列 (配列番号: 188) 由来の主要な結合寄与を有する重要な領域であることを確認した。加えて、相互作用も、ペプチド領域49CEGEQDKRLHCYASW63で見出した。

40

種々のエピトープマッピング実験に対する結果を図9に要約した。

【0367】

SETによる親和性の確認

抗原 (ActRIIBまたはActRIIAの細胞外ドメイン) の連続希釈物を、PBS 0.5% (w/v) BSA/0.02% (w/v) Tween 20中で調製し、抗体 (MOR08159) をそれぞれの抗原濃度に加え、一定の抗体濃度に到達させた。100 μl/ウェルのそれぞれの希釈混合物をデュプリケートで96-ウェルポリプロピレンMTP (Greiner) に分配した。アッセイバッファーをネガティブコントロールとして使用し、抗原を含まないサンプルをポジティブコントロール (Bmax) として使用した。プレートを密閉し、一晩インキュベートした。96-ウェル High Bin

50

d MTP (Meso Scale Discovery) を PBS に希釈した $25\mu\text{l}$ の $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス ActRIIB-Fc でコーティングした。また、このプレートを密閉し、 4°C で一晩インキュベートした。インキュベーション後、抗原でコーティングされた High Bind MTP を PBS / 0.05% (w/v) Tween 20 で洗浄した。次に、プレートを PBS / 5% (w/v) BSA ブロックした。洗浄工程を繰り返し、ポリプロピレン MTP からの $50\mu\text{l}$ / ウェルの抗体抗原調製物を抗原でコーティングされた High Bind MTP に移した。High Bind MTP を室温で 25 分インキュベートした。3 回のさらなる洗浄工程後、アッセイバッファーで希釈された $25\mu\text{l}$ の $1\mu\text{g}/\text{ml}$ Sulfo-Tag-labeled ヤギ抗-ヒト-検出抗体 (Meso Scale Discovery) をそれぞれのウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄後、 $50\mu\text{l}$ の Read バッファー (Meso Scale Discovery) をそれぞれのウェルに移した。電気化学発光 (ECL) シグナルを産生し、Sector Imager 6000 リーダー (Meso Scale Discovery) により検出した。

10

【0368】

ECL 値を対応する抗原濃度に対してプロットした。 K_D を、Piehler J, et al. (J Immunol Methods; 1997, 201(2): 189-206) により記載されているフィットモデルでプロットを合わせることで決定した。

【0369】

報告された K_D 値および標準偏差を、独立実験から得られた個々の K_D 値から決定した。

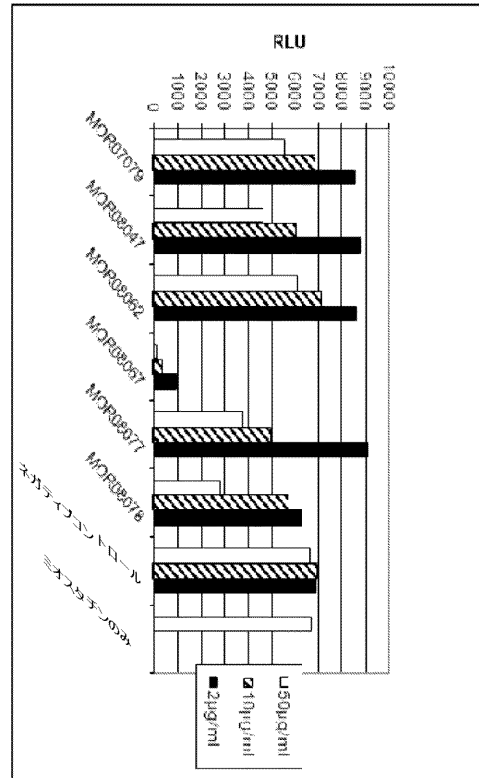
20

これらの実験から、 $1.73 (\pm 0.31) \text{ pM}$ の解離平衡定数 K_D に対する平均値をヒト ActRIIB に対して決定し、 $434 (\pm 25) \text{ pM}$ の解離平衡定数 K_D に対する平均値を ActRIIA に対して決定した。

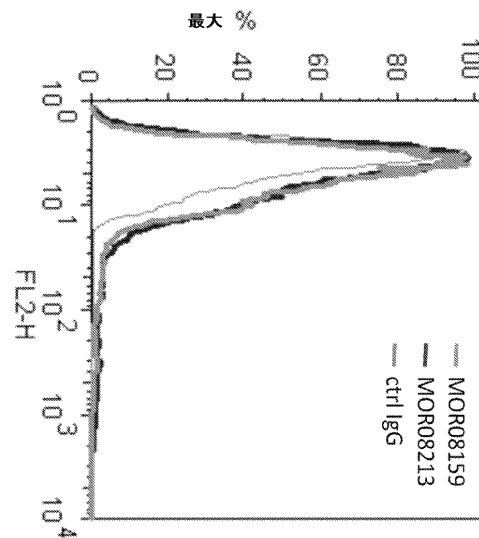
【0370】

本発明は例のみ記載されており、修飾が本発明の範囲および精神内に維持されると理解する。

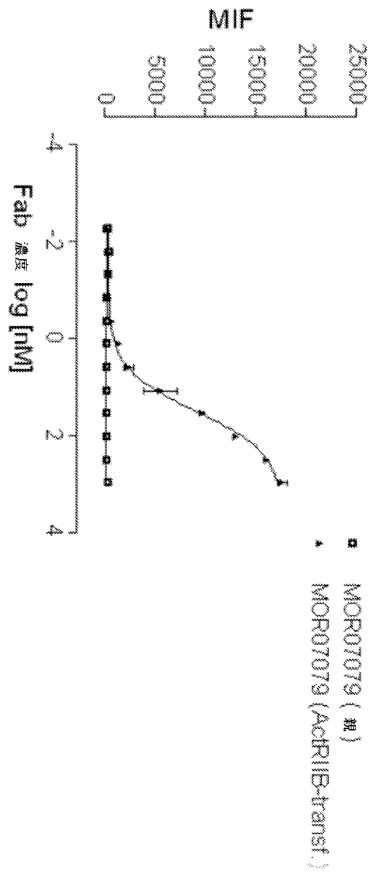
【図 2】



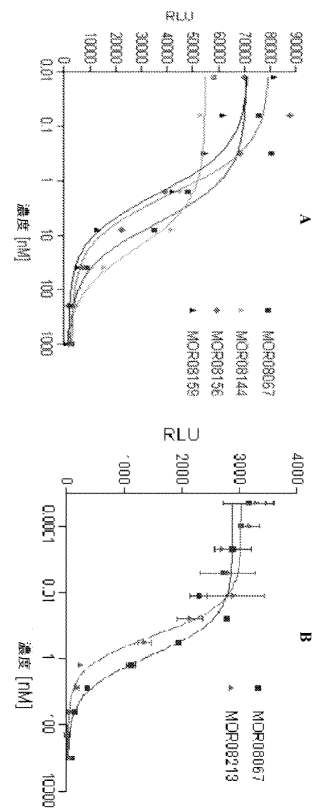
【図 4】



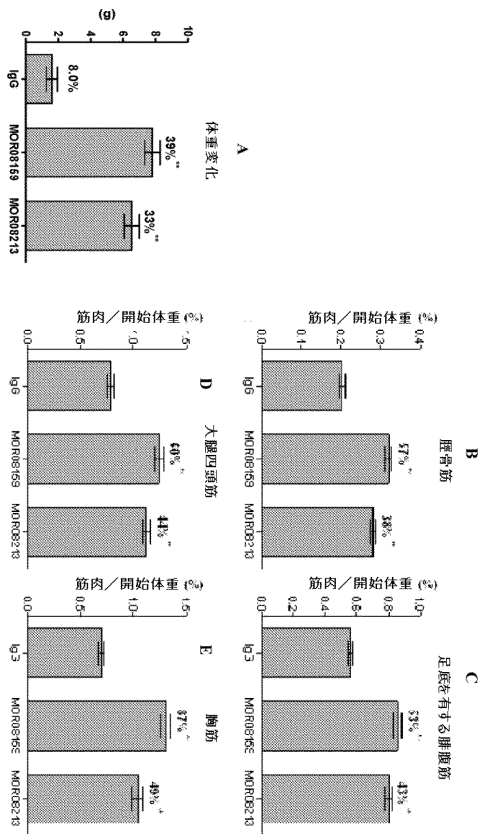
【図 1】



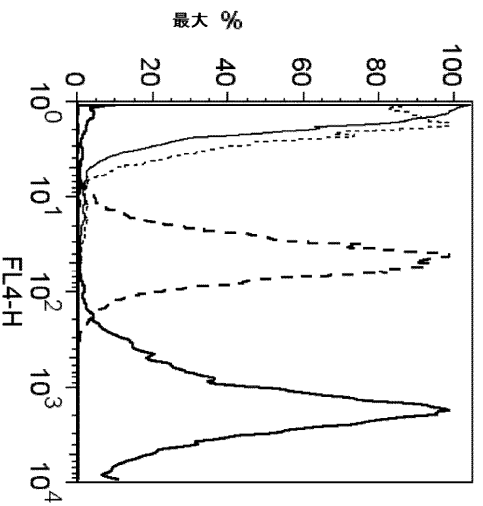
【図 3】



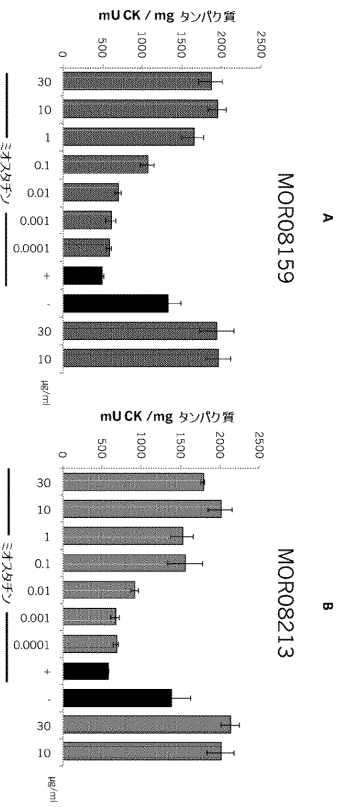
【図 6】



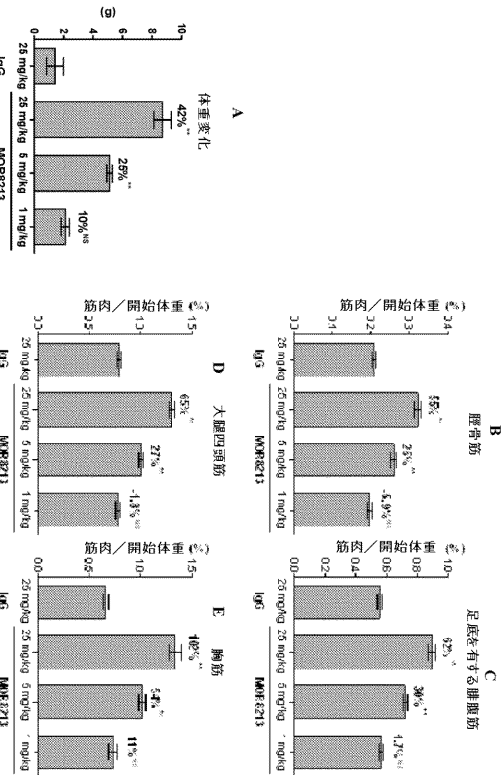
【図 8】



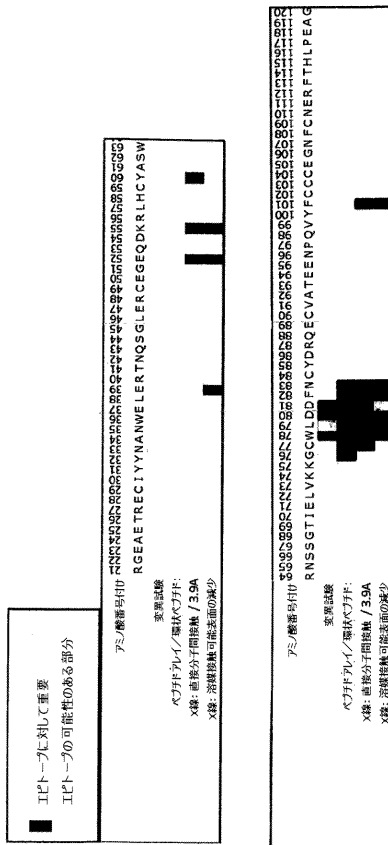
【図 5】



【図 7】



【図 9】



【配列表】

2017014207000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年7月28日(2016.7.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

A c t R I I B のリガンド結合ドメインに結合する抗 A c t R I I B 抗体または機能性タンパク質であって、

A c t R I I B に対するミオスタチン結合を阻害し、

A c t R I I A に結合するよりも10倍以上の親和性で A c t R I I B に結合する、抗 A c t R I I B 抗体または機能性タンパク質。

【請求項2】

(a) 配列番号：181のアミノ酸78-83(WLDDFN-配列番号：188)；
 (b) 配列番号：181のアミノ酸76-84(GCWLDDFN-配列番号：186)；
 (c) 配列番号：181のアミノ酸75-85(KGCWLDDFN-配列番号：190)；
 (d) 配列番号：181のアミノ酸52-56(EQDKR-配列番号：189)；
 (e) 配列番号：181のアミノ酸49-63(CEGEQDKRLHCYASW-配列番号：187)；または(f) 配列番号：181のアミノ酸78-83(WLDDFN) および配列番号：181のアミノ酸52-56(EQDKR)を含むか、またはからなるエピトープに結合する請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

I g G 1 アイソタイプの抗体である、請求項 1 または 2 に記載の抗 A c t R I I B 抗体。

【請求項 4】

F c 領域の変異を介して改変されたエフェクター機能を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の抗 A c t R I I B 抗体。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

1 つまたはそれ以上の請求項 5 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むクローニングまたは発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の 1 つまたはそれ以上のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 1 - 4 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 9】

薬学的に許容される希釈剤または担体をさらに含む、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

1 つまたはそれ以上のさらなる活性剤をさらに含む、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

さらなる活性剤が I G F - 1、I G F - 2 または I G F - 1 もしくは I G F - 2 の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、A c t R I I B に結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ 2 アゴニスト、G h r e l i n アゴニスト、S A R M、G H アゴニスト／模擬物またはフォリスタチンから選択される請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

医薬として使用するための、請求項 1 - 4 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質、または請求項 8 ～ 11 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 13】

筋骨格疾患または障害の処置のための医薬の製造における、請求項 1 - 4 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質、または請求項 8 - 11 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 14】

筋骨格疾患または障害の処置における使用のための、請求項 1 - 4 のいずれかに記載の抗体または機能性タンパク質、または請求項 8 - 11 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 15】

筋骨格疾患または障害が、筋萎縮である、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 16】

処置される患者が、I G F - 1、I G F - 2 または I G F - 1 もしくは I G F - 2 の変異体、抗ミオスタチン抗体、ミオスタチンプロペプチド、A c t R I I B に結合するが、それを活性化しないミオスタチンデコイタンパク質、ベータ 2 アゴニスト、G h r e l i n アゴニスト、S A R M、G H アゴニスト／模擬物またはフォリスタチンで以前に処置されている、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

処置される患者が、高齢者であるか、無重力状態で過ごしているか、または不活化の期間を経験している、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 18】

処置される患者が、肢（すなわち脚または腕）または関節（すなわち膝関節または股関

節) に対する骨折を有する、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 9】

患者が、股関節または膝関節置換術を経験しているか、または経験しようとしている、請求項 1 5 に記載の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02

(72)発明者 ターニャ・ヘルマン
ドイツ 8 1 3 6 9 ミュンヘン、ゲオルク・ハーガー・シュトラッセ 4 番

(72)発明者 クリス・ル
中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 シャンハイ、チャンジアン・ハイテク・パーク・プドン・ニュー・
エリア、ハレイ・ロード・レイン 8 9 8、ビルディング・ナンバー 8、チャイナ・ノバルティス・
インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・カンパニー・リミテッド

(72)発明者 ケリー・アン・シェパード
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド

(72)発明者 エステル・トリフィリーフ
スイス、ツェーハー 4 0 0 2 バーゼル、ポストファッハ、ノバルティス・ファルマ・アクチェン
ゲゼルシャフト

(72)発明者 シュテファニー・ウルリンガー
ドイツ 8 0 6 8 9 ミュンヘン、アステルンシュトラッセ 1 2 番

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA01 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA08 BA18 NA05 NA14 ZA941 ZA942
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB36 BB42 CC02 CC23 DD62 DD63
DD88 EE01 EE03 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017014207000001.pdf