

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506964
(P2005-506964A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 45/00
A61K 31/4164
A61K 31/7088
A61K 35/76
A61K 38/00

F 1

A 61 K 45/00
A 61 K 31/4164
A 61 K 31/7088
A 61 K 35/76
A 61 K 39/395

テーマコード(参考)

4 C 084
4 C 085
4 C 086
4 C 087

D 番査請求 未請求 予備審査請求 有

(全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-511863 (P2003-511863)
(86) (22) 出願日 平成14年7月12日 (2002.7.12)
(85) 翻訳文提出日 平成16年1月13日 (2004.1.13)
(86) 國際出願番号 PCT/AU2002/000945
(87) 國際公開番号 WO2003/006057
(87) 國際公開日 平成15年1月23日 (2003.1.23)
(31) 優先権主張番号 PR 6381
(32) 優先日 平成13年7月13日 (2001.7.13)
(33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)

(71) 出願人 504014897
バイオア ピーティーウイ リミテッド
オーストラリア国 ニュー サウス ウェ
ールズ トーンレイ セントラル アベニ
ュー 2-4 ユニット ビー3
(71) 出願人 503383594
モナシュ ユニバーシティ
オーストラリア国 ビクトリア州 クレイ
トン クレイトン ロード 246
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100108774
弁理士 橋本 一憲
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】疾患を治療するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、脊椎動物における線維症関連疾患の治療および/または予防のための薬学的組成物に関し、この組成物は、少なくとも一つのアクチビン拮抗物質、ならびに選択的に薬学的に許容される担体、アジュバントおよび/または希釗剤を含む。本発明はまた、脊椎動物における線維症関連疾患の治療方法、ならびにそのような状態を診断するための方法、およびそのためのキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組成物が少なくとも1つのアクチビン拮抗物質、ならびに選択的に薬学的に許容される担体、アジュバント、および/または希釈剤を含む、脊椎動物における線維症関連疾患の治療および/または予防のための薬学的組成物。

【請求項 2】

アクチビン拮抗物質がフォリスタチン、またはその断片もしくは類似体である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

フォリスタチンが還元剤の非存在下でSDS-PAGEにより推定される分子量が約30,000ダルトンから60,000ダルトンである、288個から315個のアミノ酸を含む単鎖タンパク質であり、卵胞液由来であり、かつ卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を阻害することができる、請求項2記載の薬学的組成物。 10

【請求項 4】

フォリスタチンが、NCBI(米国生物工学情報センター)タンパク質XP_003891, AAH04107として分類される単鎖タンパク質である、請求項2記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

薬学的組成物に存在するフォリスタチンまたは断片もしくは類似体が、以下からなる群より選択される形で存在する、請求項2記載の薬学的組成物：フォリスタチン/キレート、フォリスタチン/薬剤、フォリスタチン/プロドラッグ、フォリスタチン/毒素、ならびにフォリスタチン/検出器群およびフォリスタチン/画像化マーカー。 20

【請求項 6】

アクチビン拮抗物質がフォリスタチン関連タンパク質またはその断片もしくは類似体である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

フォリスタチン関連タンパク質がGenBankアクセッション番号NP_005851に定義される配列を有する、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

アクチビン拮抗物質がアクチビンに対して産生される抗体である、請求項1記載の薬学的組成物。 30

【請求項 9】

抗体が産生されるアクチビンが、アクチビンA、アクチビンAB、またはアクチビンBである、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

抗体が産生されるアクチビンが、インヒビン鎖を含まない成熟インヒビンAまたはBサブユニット鎖のヘテロ二量体またはホモ二量体である、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

2つのサブユニットが、還元剤の非存在下でSDS-PAGEにより推定される分子量が約12,000ダルトン～13,000ダルトンである、110個から120個のアミノ酸を含む、請求項10記載の薬学的組成物。 40

【請求項 12】

アクチビンが、GenBankアクセッション番号M13436に定義される配列を有するAサブユニット、および/またはGenBankアクセッション番号M13437に定義される配列を有するBサブユニットを含む、請求項10記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

アクチビン拮抗物質が、それぞれの受容体へのアクチビンの結合を妨げる化合物である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

化合物がアクチビン受容体に対して産生される抗体である、請求項13記載の薬学的組成物。 50

【請求項 15】

抗体が産生されるアクチビン受容体が、ActRIIAまたはActRIIBまたはActRIAまたはActRIBまたはALK2またはALK4である、請求項14記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

化合物が、アクチビンA、アクチビンAB、およびアクチビンBからなる群より選択されるタンパク質に関する受容体に対して産生される抗体である、請求項13記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

化合物が、Smad6およびSmad7またはその断片もしくは類似体から選択されるSmadシグナル伝達分子である、請求項13記載の薬学的組成物。

【請求項 18】

化合物が、TGF /アクチビンI型受容体を特異的に阻害する分子である、請求項13記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

化合物がトリアリルイミダゾール類似体から選択される、請求項18記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

化合物がSB-431542である、請求項19記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

線維症関連疾患が以下の一つである、請求項1から20のいずれか一項記載の薬学的組成物：過剰増殖性または炎症性線維性疾患；肺線維症；炎症性腸疾患または潰瘍性大腸炎もしくはクローン病のような関連症状；または肝線維症もしくは肝硬変。

【請求項 22】

線維症関連疾患が肝線維症または肝硬変である、請求項1から20のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 23】

少なくとも1つのアクチビン拮抗物質を、薬学的に許容される担体、アジュバント、および/または希釈剤と均質に混合する段階を含む、請求項1から22のいずれか一項記載の薬学的組成物を調製するための工程。

【請求項 24】

少なくとも1つのアクチビン拮抗物質の治療的有効量を脊椎動物に投与する段階を含む、治療を必要とする脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための方法。

【請求項 25】

請求項1から22のいずれか一項記載の薬学的組成物の治療的有効量を脊椎動物に投与する段階を含む、治療を必要とする脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための方法。

【請求項 26】

脊椎動物がヒト、非ヒト靈長類、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ、トリ、ネコ、およびイヌからなる群より選択される、請求項24または請求項25記載の方法。

【請求項 27】

脊椎動物がヒトである、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

線維症関連疾患が以下の一つである、請求項24から27のいずれか一項記載の方法：過剰増殖性または炎症性線維性疾患；肺線維症；炎症性腸疾患または潰瘍性大腸炎もしくはクローン病のような関連症状；または肝線維症もしくは肝硬変。

【請求項 29】

線維症関連疾患が肝線維症または肝硬変である、請求項24から27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

以下の段階を含む、脊椎動物において線維症関連疾患についてスクリーニングするための方法：

(a) 脊椎動物からの試料を、アクチビンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）と接触させる段階；

10

20

30

40

50

(b) アクチビンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；および

(c) 結合した抗体の量を参照試料における結合量と比較し、かつ参照試料と比較した試料における結合した抗体の量の変化が疾患を示している、該脊椎動物において線維症関連疾患を診断する段階。

【請求項 3 1】

以下の段階を含む、脊椎動物において線維症関連疾患についてスクリーニングするための方法：

(a) 脊椎動物からの試料を、フォリスタチンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）と接触させる段階； 10

(b) フォリスタチンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；および

(c) 結合した抗体の量を参照試料における結合量と比較し、かつ参照試料と比較した試料における結合した抗体の量の変化が疾患を示している、該脊椎動物において線維症関連疾患を診断する段階。

【請求項 3 2】

以下の段階を含む、脊椎動物において線維症関連疾患についてスクリーニングするための方法：

(a) 脊椎動物からの試料の第一のアリコートを、アクチビンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）に接触させる段階； 20

(b) アクチビンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；

(c) 脊椎動物からの試料の第二のアリコートを、フォリスタチンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）に接触させる段階；

(d) フォリスタチンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；ならびに

(e) アクチビンに結合した抗体の量をフォリスタチンに結合した抗体の量と比較し、その相対的な差を参照試料に見出される差と比較し、かつ参照試料と比較した試料における、アクチビンおよびフォリスタチンに結合した抗体の相対的比率における変化が疾患を示している、該脊椎動物において線維症関連疾患を診断する段階。 30

【請求項 3 3】

参照試料が線維症関連疾患を患っていない脊椎動物から得られる、請求項30から32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

スクリーニング法を実施する試料が、血漿または組織の試料であり、かつ標準的な組織学的および免疫組織化学的技術を伴う、請求項30から32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 5】

線維症関連疾患が以下の一つである、請求項30から34のいずれか一項記載の方法：過剰増殖性または炎症性線維性疾患；肺線維症；炎症性腸疾患または潰瘍性大腸炎もしくはクローン病のような関連症状；または肝線維症もしくは肝硬変。 40

【請求項 3 6】

線維症関連疾患が肝線維症または肝硬変である、請求項30から34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 7】

少なくともアクチビン（またはその断片）に対して産生される抗体（またはその断片）を診断的に許容される担体および/または希釈剤と共に含む、脊椎動物における線維症関連疾患を検出するための診断キット。

【請求項 3 8】

少なくともフォリスタチン（またはその断片）に対して産生される抗体（またはその断片 50

)を、診断的に許容される担体および/または希釈剤と共に含む、脊椎動物における線維症関連疾患を検出するための診断キット。

【請求項 39】

以下の容器を含む、請求項37または請求項38記載のキット：

- (a)少なくとも抗体(またはその断片)を含む第一の容器、および
- (b)抗体(またはその断片)の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む第二の容器。

【請求項 40】

少なくとも以下を含む、脊椎動物における線維症関連疾患を検出するための診断キット：
診断的に許容される担体および/または希釈剤と合わせた、フォリスタチン(またはその断片)に対して産生される抗体(またはその断片)；ならびに診断的に許容される担体および/または希釈剤と合わせた、アクチビン(またはその断片)に対して産生される抗体(またはその断片)。

10

【請求項 41】

以下の容器を含む、請求項40記載のキット：

- (a)少なくともアクチビン抗体(またはその断片)を含む第一の容器；
- (b)少なくともフォリスタチン抗体(またはその断片)を含む、第二の容器；
- (c)アクチビン抗体(またはその断片)の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む、第三の容器；および
- (d)フォリスタチン抗体(またはその断片)の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む、第四の容器。

20

【請求項 42】

以下の段階を含む、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法：

- (a)アクチビン拮抗物質をコードする核酸分子、またはその断片もしくは類似体、あるいはアクチビン拮抗物質をコードする核酸分子またはその断片もしくは類似体を含むベクターを、宿主細胞へ挿入する段階；

(b)形質転換された細胞において核酸分子を発現させる段階。

30

【請求項 43】

アクチビン拮抗物質がフォリスタチンまたはその断片もしくは類似体である、請求項42記載の方法。

【請求項 44】

(a)アクチビン、アクチビン受容体、もしくは他のアクチビン関連伝達経路分子をコードする核酸分子の断片に対してアンチセンスである核酸分子、またはその断片もしくは類似体、あるいはアクチビンをコードする核酸分子に対してアンチセンスである核酸分子またはその断片もしくは類似体を含むベクターを、宿主細胞へ挿入する段階；

(b)形質転換された細胞において、核酸分子を発現させる段階

を含む方法であって、発現されたアンチセンス核酸分子がアクチビン、アクチビン受容体、または他のアクチビン関連伝達経路分子をコードする相補的核酸分子に結合することにより、その転写または発現を阻害する、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法。

40

【請求項 45】

アンチセンス核酸分子が以下から選択される、請求項44記載の方法：

アクチビンA、アクチビンAB、またはアクチビンBをコードする核酸配列の少なくとも一部に対してアンチセンスである核酸分子；

ActRIIAまたはActRIIBまたはActRIAまたはActRIBまたはALK2またはALK4から選択されるアクチビン受容体をコードする核酸配列の、少なくとも一部に対してアンチセンスである核酸分子；

smad2またはsmad3をコードする核酸配列の少なくとも一部に対してアンチセンスである核酸分子。

【請求項 46】

50

アクチビンをコードする核酸分子またはその断片もしくは類似体の変異型である核酸分子、あるいはアクチビンをコードする核酸分子またはその断片もしくは類似体の変異型である核酸分子を含むベクターを、宿主細胞へ挿入する段階を含み；

変異型アクチビンをコードする核酸分子が、相同組換えにより宿主細胞の天然のアクチビンコード配列へ組み込まれることにより、結果として、アクチビン配列が転写されないか、もしくは不正確に転写されるか、または天然のアクチビン受容体に結合しないか、もしくは正常なアクチビンシグナル伝達を妨げる変異型アクチビンが発現される、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法。

【請求項 4 7】

アクチビンコード配列がGenBank登録、アクセッション番号M13436および/またはM13437に定義されるポリヌクレオチドである、請求項46記載の方法。 10

【請求項 4 8】

アクチビン受容体をコードする核酸分子またはその断片もしくは類似体の変異型である核酸分子、あるいはアクチビン受容体をコードする核酸分子の変異型である核酸分子またはその断片もしくは類似体を含むベクターを、宿主細胞へ挿入する段階を含み；

アクチビン受容体をコードする核酸分子またはその断片もしくは類似体の変異型が、相同組換えにより宿主細胞の天然のアクチビン受容体コード配列へ組み込まれることにより、結果として、アクチビン受容体配列が転写されないか、もしくは不正確に転写されるか、または天然のアクチビンに結合しないか、もしくはアクチビンシグナル伝達を妨げる変異型アクチビン受容体が発現される、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法。 20

【請求項 4 9】

アクチビン受容体コード配列が、以下の受容体のいずれか一つをコードするポリヌクレオチドである、請求項48記載の方法：ActRIIAまたはActRIIBまたはActRIAまたはActRIBまたはALK2またはALK4。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

技術分野

本発明は、アクチビン拮抗物質の治療的有効量の投与による、脊椎動物における線維症に関連した疾患の治療に関する。 30

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景技術

ヒトを含む、哺乳動物の多数の重篤な疾患は、線維症と関連している。そのような疾患は、肝硬変、肺線維症およびクローン病のような炎症性腸疾患を含む。

【0 0 0 3】

肝硬変は、結節性再生、線維症および正常な構造の障害を伴う肝実質細胞への広汎性損傷を特徴とする肝臓の進行性疾患である。それは、肝細胞機能の不全および血流障害に関連し、全肝不全および肝細胞癌（HCC）へ導きうる。特にアルコール、肝炎ウイルス、様々な薬剤および鉄過負荷（ヘモクロマトーシス）を含む肝細胞損傷を引き起こす多数の作用因子がある。これらの作用因子への曝露は、事象のカスケードを促進し、曝露が繰り返されるとすれば、結果として、進行性線維症および硬変を含む慢性疾患の発生を生じうる。 40

【0 0 0 4】

間質性肺疾患（ILD）は、様々な慢性肺疾患を含む用語である。ILDはまた、間質性肺線維症または肺線維症とも呼ばれる。肺は、通常、何かの具合で傷つけられ、結果として、肺胞の壁（肺胞炎）、細気管支の壁（細気管支炎）、または毛細血管（脈管炎）に炎症を生じる。その後、瘢痕（または線維症）が始まり、肺は弾力性を喪失する。線維症は、結果として、酸素を輸送する肺組織の能力の永久的喪失を生じる。

【0 0 0 5】

50

原因不明である特発性肺線維症（IPF）と呼ばれる慢性肺疾患のグループもまたある。

【0006】

炎症性腸疾患（IBD）は、小腸および大腸に炎症または潰瘍を引き起こす慢性疾患のグループである。たいていのIBDは潰瘍性大腸炎またはクローン病として分類されるが、大腸炎、腸炎、回腸炎および直腸炎と呼ばれる場合もある。潰瘍性大腸炎は、結腸および直腸の内層の潰瘍および炎症を引き起こすが、クローン病は、腸壁のより深い層に及ぶ炎症である。腸壁は厚くなっているが、最初は柔軟であるが、線維症が生じると、壁は、管腔の狭小化および時々には狭窄を伴って硬くなる。クローン病はまた、口、食道、胃および小腸を含む消化管の他の部分にも影響を及ぼしうる。

【0007】

上記で同定されたもののような線維症関連症状の発生を防ぐまたは治療するための新規な抗線維症治療は、これらの状態が死および/または生活の質の喪失の主な原因であり、かつ医療系の負担を増加させているために、必要とされている。

【0008】

アクチビン拮抗物質が線維症および関連疾患の治療ならびに/または予防のための薬剤として用いられうることが、ここで本明細書に開示されている。

【0009】

従って、本発明は、線維症関連疾患の治療および/または予防のために有用であると思われるアクチビン拮抗物質についての役割を記載する。

【0010】

それゆえ、本発明は、アクチビン拮抗物質の形をとる、線維症関連疾患の治療において有用な治療用物質を提供する。典型的には、アクチビン拮抗物質は、フォリスタチン（follistatin）、またはその断片もしくは類似体である。

【発明の開示】

【0011】

発明の開示

本発明は、アクチビン拮抗物質、特にタンパク質フォリスタチン、またはその断片もしくは類似体が線維症関連疾患の治療および/または予防のための有用な治療物質であるという発見に関する。典型的には、線維症は、ホルモンアクチビンAの異常に増大した発現を含みうる。本明細書に開示されている結果は、アクチビン拮抗物質、特にフォリスタチンまたはその断片もしくは類似体の投与がホルモンアクチビンに関連する過剰増殖を抑制するという見解を裏付ける。

【0012】

1. 疾患の治療および/または予防のための治療用物質/薬学的組成物

本発明の第一の態様により、組成物が少なくとも1つのアクチビン拮抗物質、ならびに選択的に薬学的に許容される担体、アジュバントおよび/または希釈剤を含む、脊椎動物における線維症関連疾患の治療および/または予防のための薬学的組成物が提供される。

【0013】

本発明の第二の態様により、工程が少なくとも1つのアクチビン拮抗物質を薬学的に許容される担体、アジュバント、および/または希釈剤と均質に混合することを含む、本発明の第一の態様において定義される薬学的組成物を調製するための工程が提供される。

【0014】

典型的には、脊椎動物は、ヒト、非ヒト靈長類、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ、トリ、ネコおよびイヌからなる群より選択される。より典型的には、脊椎動物は、ヒト、非ヒト靈長類またはマウスである。さらにより典型的には、脊椎動物はヒトである。

【0015】

2. フォリスタチンを用いる疾患の治療

本発明の第三の態様により、方法が少なくとも1つのアクチビン拮抗物質の治療的有効量を脊椎動物に投与する段階を含む、治療を必要とする脊椎動物における線維症関連疾患を

10

20

30

40

50

治療するための方法が提供される。

【0016】

本発明の第四の態様により、治療を必要とする脊椎動物において、線維症関連疾患の治療に用いられる場合の少なくとも1つのアクチビン拮抗物質が提供される。

【0017】

本発明の第五の態様により、治療を必要とする脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための薬物を調製するための、少なくとも1つのアクチビン拮抗物質の使用が提供される。

【0018】

典型的には、本発明の第三から第五までの態様のいずれか一つの目的のために、アクチビン拮抗物質は、典型的には本明細書に記載されるように、フォリスタチン、またはその断片もしくは類似体である。 10

【0019】

本発明の第六の態様により、方法が本発明の第一の態様において定義される薬学的組成物の治療的有効量を脊椎動物に投与する段階を含む、治療を必要とする脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための方法が提供される。

【0020】

本発明の第七の態様により、治療を必要とする脊椎動物において線維症関連疾患の治療に用いられる場合の、本発明の第一の態様において定義される薬学的組成物が提供される。 20

【0021】

本発明の第八の態様により、治療を必要とする脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための薬物を調製するための、本発明の第一の態様において定義される薬学的組成物の使用が提供される。

【0022】

一つの好ましい局面により、線維症関連疾患は、過剰増殖性または炎症性線維性疾患である。

【0023】

もう一つの好ましい局面により、線維症関連疾患は、特発性肺線維症または間質性肺疾患のような肺線維症である。 30

【0024】

もう一つの好ましい局面により、線維症関連疾患は、炎症性腸疾患または潰瘍性大腸炎もしくはクローン病のような関連症状である。

【0025】

もう一つの好ましい局面により、線維症関連疾患は、肝線維症および肝硬変である。

【0026】

典型的には、アクチビン拮抗物質の治療的有効量の投与による線維症関連疾患の治療は、疾患の他の治療と共に行われる。例えば、これらの他の治療は、手術、放射線治療、または化学療法を含みうる。例として化学療法は、抗線維症、抗血栓症または抗炎症の薬剤の投与を含みうる。

【0027】

典型的には、本発明の第三から第八までの態様のいずれか一つの目的のために、当業者は日常的実験法により、疾患を治療する目的のためにアクチビン拮抗物質の効力があり、毒性のない量を決定することができるものと思われる。 40

【0028】

典型的には、第一から第八までの態様の目的のために、アクチビン拮抗物質は、フォリスタチンまたはその断片もしくは類似体であり、より典型的にはフォリスタチンは、還元剤の非存在下でのSDS-PAGEにより推定される約30,000ダルトン～60,000ダルトンの分子量をもつ288個～315個のアミノ酸を含む単鎖タンパク質であり、卵胞液由来であり、かつ卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を抑制することができる。より典型的には、フォリスタチンは、NCBI(米国生物工学情報センター)タンパク質XP_003891、AAH04107として分類され 50

る単鎖タンパク質である。さらにより典型的には、フォリスタチンは、オーストラリア特許第610858号に記載されるとおりである。さらにより典型的には、フォリスタチンは、オーストラリア特許第620346号または米国特許第5,470,826号または欧州特許第0 299 050号に記載されるとおりであり、これらの開示は参照として本明細書に組み入れられている。

【0029】

典型的には、薬学的組成物に存在するフォリスタチンまたは断片もしくは類似体はまた、以下からなる群より選択される形で存在しうる：フォリスタチン/キレート、フォリスタチン/薬剤、フォリスタチン/プロドラッグ、フォリスタチン/毒素、ならびにフォリスタチン/検出群 (detector group) およびフォリスタチン/画像化マーカー。

【0030】

アクチビン拮抗物質はまた、フォリスタチン関連タンパク質でもありうる（例えば、GenBankアクセッション番号NP_005851を参照）。

【0031】

または、アクチビン拮抗物質は、アクチビンに対して産生される抗体でありうる。

【0032】

典型的には、抗体が産生されるアクチビンは、アクチビンA、アクチビンABまたはアクチビンBである。より典型的には、抗体が産生されるアクチビンは、インヒビン鎖を含まない成熟インヒビン A鎖または B鎖のヘテロ二量体またはホモ二量体である。その2つのサブユニットは、還元剤非存在下でのSDS-PAGEにより推定される約12,000ダルトン～13,000ダルトンの分子量をもち、110個～120個のアミノ酸を含む。より典型的には、アクチビンは、GenBankアクセッション番号M13436に定義される配列を有する Aサブユニットおよび/またはGenBankアクセッション番号M13437に定義される配列を有する Bサブユニットを含む。さらにより典型的には、アクチビンは、オーストラリア特許第596178号または米国特許第4,973,577号もしくは第4,798,885号または欧州特許第0 222 491号に記載されるとおりであり、これらの開示は参照として本明細書に組み入れられている。

【0033】

もう一つの代替の局面において、アクチビン拮抗物質は、それぞれの受容体へのアクチビンの結合を妨げる化合物でありうる。

【0034】

典型的には、そのような化合物は、アクチビン受容体に対して産生される抗体である。より典型的には、抗体が産生されるアクチビン受容体は、ActRIIAまたはActRIIBまたはActRIAまたはActRIBまたはALK2またはALK4である（DKM：ALK2およびALK4は、それぞれActRIAおよびActRIBについての代替の名称であることを留意されたい）。

【0035】

より典型的には、化合物は、以下の受容体のいずれか一つに対して産生される抗体である：アクチビンA受容体、アクチビンAB受容体、およびアクチビンB受容体。

【0036】

または、アクチビン拮抗物質は、抑制性Smadシグナル伝達分子、Smad6およびSmad7のようなアクチビンシグナル伝達経路の、他の下流の構成要素のいずれかを妨げる分子でありうる。

【0037】

なおもう一つの局面により、アクチビン拮抗物質は、TGF /アクチビンI型の受容体を特異的に阻害する分子でありうる。典型的には、そのような分子は、トリアリルイミダゾール類似体から選択されうる。より典型的には、そのようなトリアリルイミダゾール類似体は、Callahan, J.F.ら、(2002)、「Identification of novel Inhibitors of the Transforming Growth Factor -1 (TGF- 1) Type I Receptor (ALK5)」、J. Med. Chem. 45:999-1001に記載されるとおりである。さらにより典型的には、トリアリルイミダゾール類似体は、Callahan, J.F.ら、(2002)、J. Med. Chem. 45:999-1001に記載される化合物14であり、またInman, G.J.ら、(2002)、「SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor- Superfamily Type I Activin Receptor-L

10

20

30

40

50

ike Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7」、Molecular Pharmacology 62 (1) : 65-74にSB-431542として記載されている。

【0038】

3. 疾患の診断

本発明の第九の態様により、以下の段階を含む、脊椎動物において線維症関連疾患についてスクリーニングするための方法が提供される：

(a) 脊椎動物からの試料をアクチビンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）に接触させる段階；

(b) アクチビンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；および

(c) 結合した抗体の量を参照試料における結合した量と比較し、かつ参照試料と比較した試料における結合した抗体の量の変化が疾患を示している、その脊椎動物において線維症関連疾患を診断する段階。

【0039】

本発明の第十の態様により、以下の段階を含む、脊椎動物において線維症関連疾患についてスクリーニングするための方法が提供される：

(a) 脊椎動物からの試料をフォリスタチンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）に接触させる段階；

(b) フォリスタチンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；および

(c) 結合した抗体の量を参照試料における結合した量と比較し、かつ参照試料と比較した試料における結合した抗体の量における変化が疾患を示している、その脊椎動物において線維症関連疾患を診断する段階。

【0040】

本発明の第十一の態様により、以下の段階を含む、脊椎動物において線維症関連疾患についてスクリーニングするための方法が提供される：

(a) 脊椎動物からの試料の第一のアリコートをアクチビンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）に接触させる段階；

(b) アクチビンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；および

(c) 脊椎動物からの試料の第二のアリコートをフォリスタチンポリペプチド（またはその断片もしくは類似体）に対して産生される抗体（またはその断片）に接触させる段階；

(d) フォリスタチンポリペプチドに結合した抗体（またはその断片）の存在を検出する段階；ならびに

(e) アクチビンに結合した抗体の量をフォリスタチンに結合した抗体の量と比較し、かつその相対的差を参照試料に見出されるそれと比較し、かつ参照試料と比較した試料におけるアクチビンに結合した抗体とフォリスタチンに結合した抗体の相対的比率における変化が疾患を示している、その脊椎動物において線維症関連疾患を診断する段階。

【0041】

典型的には、第九から第十一までの態様の目的のために、参照試料は線維症関連疾患を患っていない脊椎動物から得られる。

【0042】

典型的には、第九から第十一までの態様の目的のために、スクリーニングの方法が行われる試料は血漿または組織の試料であり、標準的な組織学的および免疫組織化学的技術を必要とする。

【0043】

典型的には、第九または第十一の態様の目的のために、抗体が産生されるアクチビンは、本明細書で前に記載されているとおりである。

【0044】

典型的には、第十または第十一の態様の目的のために、抗体が産生されるフォリスタチン

10

20

30

40

50

は、本明細書で前に記載されているとおりである。

【0045】

典型的には、本明細書に記載されているように、アクチビンまたはフォリスタチンの抗体は、抗体全体、または抗体断片、または相補性決定領域のようなその他の免疫学的活性断片でありうる。より典型的には、抗体断片は、機能性抗原結合ドメイン、すなわち重鎖および軽鎖の可変ドメインを有する。さらにより典型的には、抗体断片は以下からなる群より選択される形で存在する：Fv、 F_{ab} 、 $F(ab)_2$ 、scFv（単鎖Fv）、dAb（單一ドメイン抗体）、二特異性抗体（bispecific antibody）、二重特異性抗体（diabody）および三重特異性抗体（triabody）。

【0046】

典型的には、抗体（またはその断片）は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。より典型的には、抗体（またはその断片）は、モノクローナル抗体である。さらにより典型的には、モノクローナル抗体は、分子遺伝学的技術、ハイブリドーマ技術またはEBV（エブスタイン-バーウイルス）形質転換技術を用いて產生される。

【0047】

本発明の第十二の態様により、少なくともアクチビン（またはその断片）に対して產生される抗体（またはその断片）を診断的に許容される担体および/または希釈剤と共に含む、脊椎動物における線維症関連疾患を検出するための診断キットを提供している。

【0048】

本発明の第十三の態様により、少なくともフォリスタチン（またはその断片）に対して產生される抗体（またはその断片）を診断的に許容される担体および/または希釈剤と共に含む、脊椎動物における線維症関連疾患を検出するための診断キットを提供している。

【0049】

典型的には、第十二または第十三の態様によるキットは、以下の容器を含みうる：

- (a) 少なくとも抗体（その断片）を含む第一の容器、および；
- (b) 抗体（またはその断片）の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む第二の容器。

【0050】

本発明の第十四の態様により、少なくとも以下を含む、脊椎動物における線維症関連疾患を検出するための診断キットを提供している：診断的に許容される担体および/または希釈剤と共にフォリスタチン（またはその断片）に対して產生される抗体（またはその断片）；ならびに、診断的に許容される担体および/または希釈剤と共にアクチビン（またはその断片）に対して產生される抗体（またはその断片）。

【0051】

典型的には、第十四の態様によるキットは、以下の容器を含みうる：

- (a) 少なくともアクチビン抗体（またはその断片）を含む第一の容器、および；
- (b) 少なくともフォリスタチン抗体（またはその断片）を含む第二の容器；
- (c) アクチビン抗体（またはその断片）の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む第三の容器、および
- (d) フォリスタチン抗体（またはその断片）の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む第四の容器。

【0052】

より典型的には、第十二から第十四までの態様のいずれか一つの目的のために、キットは、洗浄試薬および結合した抗体の存在を検出することができる他の試薬のような他の成分を含む、一つまたは複数の他の容器をさらに含みうる。さらにより典型的には、検出試薬は、標識（第二）抗体を含みうるか、またはアクチビンおよび/もしくはフォリスタチン（またはその断片）に対して產生される抗体（またはその断片）がそれ自身標識されている場合、その区画に本発明の標識抗体（またはその断片）と反応することができる抗体結合試薬を含みうる。

【0053】

10

20

30

40

50

4. 遺伝子治療

本発明の第十五の態様により、方法が以下の段階を含む、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法が提供される：

(a) アクチビン拮抗物質もしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子、またはアクチビン拮抗物質もしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子を含むベクターを宿主細胞へ挿入する段階；

(b) 核酸分子を形質転換された細胞において発現させる段階。

【0054】

典型的には、アクチビン拮抗物質は、フォリスタチンまたはその断片もしくは類似体である。

10

【0055】

本発明の第十六の態様により、

(a) アクチビン、アクチビン受容体、もしくは他のアクチビン関連伝達経路分子、もしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子の断片に対してアンチセンスである核酸分子、またはアクチビンもしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子に対してアンチセンスの核酸分子を含むベクターを宿主細胞へ挿入する段階；

(b) 形質転換された細胞において核酸分子を発現させる段階

を含み、発現されたアンチセンスの核酸分子が、アクチビン、アクチビン受容体または他のアクチビン関連伝達経路分子をコードする相補的核酸分子に結合し、それにより、それらの転写または発現を阻害する、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法が提供される。

20

【0056】

典型的には、アンチセンスの核酸分子は、以下から選択される：

アクチビンA、アクチビンAB、またはアクチビンBをコードする核酸配列の少なくとも部分に対してアンチセンスである核酸分子；

ActRIIAまたはActRIIBまたはActRIAまたはActRIBまたはALK2またはALK4から選択されるアクチビン受容体をコードする核酸配列の少なくとも部分に対してアンチセンスである核酸分子；

smad2またはsmad3をコードする核酸配列の少なくとも部分に対してアンチセンスである核酸分子。

30

【0057】

本発明の第十七の態様により、アクチビンもしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子の変異型である核酸分子、またはアクチビンもしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子の変異型である核酸分子を含むベクターを宿主細胞へ挿入する段階を含む方法であって；

変異型アクチビンをコードする核酸分子が、相同組換えにより宿主細胞の天然のアクチビンコード配列へ統合され、それにより、結果として、アクチビン配列の転写無しもしくは正しくない転写のいずれか、または天然のアクチビン受容体に結合しないもしくは正常なアクチビンシグナル伝達を妨げる変異型アクチビンの発現を生じる、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法が提供される。

40

【0058】

本発明の第十八の態様により、アクチビン受容体もしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子の変異型である核酸分子、またはアクチビン受容体もしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子の変異型である核酸分子を含むベクターを宿主細胞へ挿入する段階を含む方法であって；

アクチビン受容体もしくはその断片もしくは類似体についてコードする核酸分子の変異型が、相同組換えにより宿主細胞の天然のアクチビン受容体コード配列へ統合され、それにより、結果として、アクチビン受容体配列の転写無しもしくは正しくない転写のいずれか、または天然のアクチビンに結合しないもしくはアクチビンシグナル伝達を妨げる変異型アクチビン受容体の発現を生じる、脊椎動物における線維症関連疾患を治療するための遺

50

伝子治療法が提供される：

【0059】

典型的には、アクチビンコード配列は、GenBank登録、アクセッション番号M13436および/またはM13437に定義されるポリヌクレオチドである。

【0060】

典型的には、アクチビン受容体コード配列は、以下の受容体の一つをコードするポリヌクレオチドである：ActRIIAまたはActRIIBまたはActRIAまたはActRIBまたはALK2またはALK4。

【0061】

典型的には、第十五から第十八までの態様のいずれか一つの目的のために、核酸分子またはベクターは、以下からなる群より選択される方法を用いて挿入される：マイクロインジェクション法、CaPO₄沈殿法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法/リポソーム融合法、微粒子銃法および核酸の化学修飾されたタンパク質へのカップリング法。 10

【0062】

典型的には、核酸分子またはベクターは、宿主細胞の核へ挿入される。

【0063】

典型的には、核酸分子を含む発現ベクターは細胞へ挿入され、細胞はインビトロで増殖し、その後患者へ大量に注入される。より典型的には、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、数種のRNAウイルス、レトロウイルス、またはウシパピローマウイルスのようなウイルス由来の発現ベクターは、標的細胞への核酸の送達のために用いられる。より典型的には、標的細胞は、線維芽細胞系統、例えば肝星細胞、または平滑筋細胞、肺線維芽細胞、筋線維芽細胞、腎細胞を含む。 20

【0064】

定義

用語「アクチビン拮抗物質」は、アクチビン活性を阻害する分子を含む。その用語は、アクチビンに結合する分子、およびアクチビン受容体（I型またはII型）に結合して下流へのシグナル伝達を遮断することによりアクチビンに拮抗する分子を含む。例えば、アクチビンに結合することによりアクチビン活性を阻害する分子は、フォリスタチン、フォリスタチン関連タンパク質（GenBankアクセッション番号NP_005851）、および-2マクログロブリンを含み、アクチビン受容体（I型またはII型）に結合して下流へのシグナル伝達を遮断することによりアクチビンに拮抗する分子は、インヒビンを含む。「アクチビン拮抗物質」はまた以下を含みうる：抑制性Smadシグナル伝達分子、Smad6およびSmad7のようなアクチビンシグナル伝達経路の、他の下流の構成要素のいずれかを妨げる分子；細胞で発現した場合には、細胞のアクチビンシグナル伝達経路を妨ぐアクチビン受容体のドミナントネガティブな変異体（例えば、BAMBI）；Callahan, J.F.ら、（2002）、「Identification of novel Inhibitors of the Transforming Growth Factor -1 (TGF- 1) Type I Receptor (ALK5)」、J. Med. Chem. 45: 999-1001に記載されているように、トリアリルイミダゾール類似体のようなTGF-1/アクチビンI型の受容体を特異的に阻害する分子。 30

【0065】

用語「核酸」は、天然のヌクレオチドのすべての既知の類似体を含む、一本鎖もしくは二本鎖のデオキシリボヌクレオチド（DNA）および/またはリボヌクレオチド（RNA）核酸を含む。 40

【0066】

用語「ポリヌクレオチド」は、天然のヌクレオチドのすべての既知の類似体を含む、一本鎖もしくは二本鎖のデオキシリボヌクレオチド（DNA）および/またはリボヌクレオチド（RNA）核酸を含む。それはまた、明記された関連配列およびそれらに相補的な配列と共にその範囲内に含む。

【0067】

本明細書に用いられる場合、用語「ポリペプチド」とは、ペプチド結合により共に連結された多数のアミノ酸から構成されるポリマーを指す。 50

【0068】

用語「抗体」とは、抗原上の特定のエピトープへ結合することができる免疫グロブリン分子を指し、ポリクローナルの混合物から構成されうるか、または本質的にモノクローナルでありうる。抗体は、天然の供給源または組換えの供給源由来の全免疫グロブリンでありうる。本発明による抗体は、例えば抗体全体、抗体断片、または相補性決定領域のような別の免疫学的活性断片を含む様々な形で存在しうる。同様に、抗体は機能性抗原結合ドメイン、すなわち重鎖および軽鎖可変ドメインを有する抗体断片でありうる。抗体断片は、以下からなる群より選択される形で存在しうる： F_v 、 F_{ab} 、 $F(ab)_2$ 、 $scFv$ （単鎖 F_v ）、 dAb （単一ドメイン抗体）、二特異的抗体、二重特異性抗体および三重特異性抗体。

【0069】

本明細書で言及される場合、核酸分子に関係する用語「アンチセンス」は、標的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に相補的である、人工のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド分子を意味する。アンチセンスの核酸分子は、細胞内で転写することができ、かつ細胞で生成されたポリペプチドをコードするmRNAにハイブリダイズすることができる。相補性アンチセンスヌクレオチド配列がポリペプチドmRNAにハイブリダイズすることを可能にする条件下で反応が起きるということに基づき、翻訳されるポリペプチドの量は、そのように変化する、すなわち低下するまたは除去される。

【0070】

本明細書で言及される場合、「治療的有効量」とは、本発明の化合物または組成物の、望ましい治療効果を提供するのに十分な、しかし毒性のない量を含む。「有効量」とは、例えば投与される特定の薬剤、治療される状態の重症度、治療される種、対象の年齢および一般的な状態、ならびに投与の様式の間の多数の因子のうちの一つまたは複数に依存し、対象によって変動するものである。いずれの与えられた場合についても、適切な「有効量」は、日常的な実験法だけを用いて当業者により決定されうる。典型的には、「治療的有効量」は、以下のうちの一つまたは複数を結果として生じるのに十分な量を指す：疾患の程度における後退/低減、疾患増殖または進行の抑制、疾患増殖の停止、疾患に負わされる不快の軽減、または疾患をもつ脊椎動物の寿命の延長。

【0071】

用語「単離された」とは、問題の物質が本来存在している環境から取り出されており、かつ付随した不純物が低減または除去されていることを示す。本質的に、「単離された」物質は、同じ供給源から抽出された他の物質に関して濃縮されており（すなわち、モル基準において、それは所定の供給源から抽出された個々の種の他のどれよりも豊富である）、好ましくは、実質的に精製された画分は、「単離された」物質が存在するすべての高分子種の少なくとも約30%（モル基準において）を含む組成物である。一般的に、実質的に純粋な物質の組成物は、組成物に存在する全高分子種の約80～90%より多く含む。最も好ましくは、「単離された」物質は、組成物が本質的に対象の高分子種からなる、本質的に均一になるまで（通常の検出方法では組成物に混入物種を検出できない）精製される。

【0072】

「保存的アミノ酸置換」とは、類似した側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンを含む；脂肪族水酸基側鎖を有するアミノ酸群は、セリンおよびスレオニンを含む；アミド含有側鎖を有するアミノ酸群は、アスパラギンおよびグルタミンを含む；芳香族側鎖を有するアミノ酸群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンを含む；塩基性側鎖を有するアミノ酸群は、リシン、アルギニン、およびヒスチジンを含む；および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸群は、システインおよびメチオニンを含む。典型的には、保存的アミノ酸置換群は以下のとおりである：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミン。

【0073】

ポリペプチドに関して、化合物の「断片」という用語は、例えばそれを導き出せる全長ポ

10

20

30

40

50

リペプチドと、性質上共通した生物学的活性を有する化合物である。

【0074】

核酸、ヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドに関して、用語「断片」は、例えば以下を含む化合物を指す：例えば、全長核酸配列から導き出せる全長ポリペプチドと性質上共通した生物学的活性を有する生成物をコードする標的核酸配列の部分；または、標的核酸配列もしくはその機能性産物をコードする部分の検出および/もしくは増幅のための特異的プローブもしくはPCRプライマーとして適する標的核酸配列の断片。

【0075】

核酸配列に関して本明細書に用いられる場合、用語「類似体」とは、誘導体が1つまたは複数の塩基の付加、欠失、または置換（保存的アミノ酸置換を含む）を含み、かつそのコードされるポリペプチドが、標的核酸分子によりコードされるポリペプチドと実質的に同じ機能を保持している、標的核酸配列の誘導体である配列を意味する。同様に、本明細書に用いられる場合、用語「類似体」とは、1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む標的ポリペプチドの誘導体を指すが、その類似体が標的ポリペプチドと実質的に同じ機能を保持している。

【0076】

用語「発現力セット」とは、宿主細胞において特定の核酸の転写を可能にする必須の核酸要素（プロモーター、エンハンサー、転写されるべき核酸など）を含む核酸構築物を指す。発現構築物は、ベクター、宿主染色体などへ組み入れられる。

【0077】

用語「プロモーター」とは、転写の開始を左右するおよび/または促進する核酸配列を指す。

【0078】

用語「機能的に連結された」とは、例えば核酸が別の核酸配列との機能的な関係に置かれている状態を指す。例えば、タンパク質をコードする異種性DNAに機能的に連結されたプロモーターは、異種性DNAに対応する機能性mRNAの生成を促進する。

【0079】

本明細書に用いられる場合、「遺伝子移入」とは、細胞へ外来の遺伝的物質を導入する過程を意味し、一般に、その遺伝子によりコードされる特定の産物の発現を可能にするために行われる。産物は、タンパク質、ポリペプチド、アンチセンスDNAもしくはRNA、または酵素的活性RNAを含みうる。遺伝子移入は、培養された細胞において、または動物への直接的投与により行うことができ、一般的に、標的細胞を非特異的相互作用または受容体媒介性相互作用により所望の核酸と接触させる工程、膜を通してまたはエンドサイトーシスによる細胞への核酸の取り込み、および血漿膜またはエンドソームから細胞質への核酸の放出を含む。発現を成功させるために、対象の核酸が発現構築物の一部である場合、細胞の核への核酸の移動および転写のための適切な核因子への結合もまた必要とされうる。

【0080】

上記で言及されているように、用語「遺伝子治療」は、遺伝子移入およびアンチセンスバイオテクノロジー技術が含まれる。詳細には、「遺伝子治療」とは、インビボもしくはインビトロで細胞から治療的産物を発現させうる遺伝子移入か、または標的ポリペプチドの産生を妨げるために、インビボもしくはインビトロで、標的ポリヌクレオチドコード配列に相補的なオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド配列が細胞へ挿入されかつ発現されるアンチセンス技術のいずれかを指す。遺伝子移入は以下のように行われうる：後で患者へ移植される細胞によるエキソビオ法；核酸もしくは核酸-タンパク質複合体の患者への直接的投与による；または、患者への改変された細胞の移入による。アンチセンス技術は、アンチセンスコード配列を含む発現ベクターを標的細胞へ送達するための適切なトランسفエクションベクターを用いてインビボで行われうる。

【0081】

本明細書に用いられる場合、用語「治療」とは、疾患状態もしくは症状を治療する、または別なふうに、疾患の進行もしくはどのような点であっても他の望ましくない症状を防ぐ

10

20

30

40

50

、妨げる、遅らせる、もしくは後退させるあらゆる使用を指す。

【0082】

本明細書の文脈において、用語「含む（comprising）」とは、「主に含むが、必ずしも唯一含むことではない」ことを意味する。「含む（comprise）」および「含む（comprises）」のような「含む（comprising）」という語の語尾変化は、相応じて様々の意味をもつ。

【0083】

発明を実施する最良の形式

本発明は、共通の性質がこれらの疾患の線維症との関連である多数の異なった疾患を治療するための、フォリスタチンに例示されるような、アクチビン拮抗物質の使用を記載する。フォリスタチンは、受胎能疾患の治療における間接的役割をもつ、卵胞刺激ホルモンの抑制への関与について最もよく知られているが、線維症疾患に関連した細胞の過剰増殖を抑制することができる有効なアクチビン拮抗物質であることを今回見出した。

【0084】

アクチビン拮抗物質はフォリスタチンまたはその断片もしくは類似体のようなタンパク質であるが、それらを作製する方法は分子生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の通常の技術を使用することができ、それらのすべては、当技術分野の技術内であり、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Sambrookら、Cold Spring Harbor Press、1989のような多数の周知の科学的刊行物のいずれか一つに完全に説明されている。例えば、フォリスタチンについての遺伝子は、以下の段階により、フォリスタチンを発現させる細胞または組織から単離されうる：組織または細胞からメッセンジャーRNAを単離する段階、逆転写酵素を用いて対応するDNA配列を作製する段階、および最後に、適切なプライマーでのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて活性フォリスタチニアミノ酸配列をコードするDNA配列を增幅する段階。また、フォリスタチン断片をコードするポリヌクレオチドは、適切な発現ベクターへクローニングされ、その後適した原核生物、ウイルスまたは真核生物の宿主において発現されうる。発現されたフォリスタチンポリペプチドは、以下の確立された方法の一つまたは複数を含む当技術分野において公知の標準的方法により精製されうる：硫酸アンモニウム、エタノールまたはポリエチレンギリコール沈殿法および免疫沈降法を含むタンパク質沈殿法；イオン交換、サイズ排除、逆相、疎水的相互作用、親和性、または免疫親和性技術を用いるクロマトグラフィー技術であり、例えばカラムクロマトグラフィー、HPLC、またはFPLCにより行われる；ゲル電気泳動およびHPECのような電気泳動技術；その他同種類のもの。

【0085】

例えば、本発明における使用のための組換えフォリスタチンまたはその活性断片を作製することについて、関連したDNA配列を適した発現系へ挿入する。好ましくは、フォリスタチンをコードするポリヌクレオチド配列がフォリスタチントンパク質の発現を可能にする異種性発現制御配列に機能的に連結されている、組換え分子またはベクターが構築される。哺乳動物（ヒトを含む）のタンパク質発現について、多数の適切な発現ベクターが当技術分野において知られており、標準的分子生物学的技術を用いて使用される。そのようなベクターは、バキュロウイルス発現のような昆虫、または酵母、真菌、細菌もしくはウイルス発現系を含む通常のベクター型の中から選択されうる。

【0086】

そのような方法におけるトランスフェクションに適した宿主細胞または細胞系は、ヒト293細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、サルCOS-1細胞系またはマウス3T3細胞のような哺乳動物細胞を含む。同様に、大腸菌（E. coli）（例えば、HB101、MC1061）の様々な周知の種、および枯草菌（B. subtilis）、シュードモナス（Pseudomonas）、他の桿菌などの様々な種のような細菌細胞は、本発明のための宿主細胞として有用である。当業者に公知の酵母細胞の多くの種もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。スピドテラ・フルジペデラ（Spodoptera frugiperda）（Sf9）細胞のような昆虫細胞もまた用いられる。

10

20

30

40

50

【0087】

対象となるDNAセグメントを含むベクターは、細胞の宿主の型に依存して、多数の周知の方法のいずれか一つにより、宿主細胞へ移入されうる。例えば、塩化カルシウムトランسفエクション法およびエレクトロポレーション法は、原核細胞について一般に使用される。リン酸カルシウム処理法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、微粒子銃法またはウイルスに基づくトランسفエクション法は、他の細胞宿主について使用されうる。哺乳動物細胞を形質転換するための方法もまた、トランسفエクション法、形質転換法、結合法、ポリブレン法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン技術およびマイクロインジェクション法の使用を含みうる（一般的に、Sambrookら、1989を参照）。

10

【0088】

組換え宿主細胞は、その後導入されたベクターを含むそれらの細胞の増殖について生得的に選択する選択培地に有利に増殖する。インキュベーション条件は、組換えポリペプチドの発現を最適化するように理想的に選択される。

【0089】

それゆえに、本発明における使用のための組換えアクチビン拮抗物質は、転写制御配列の支配下に、フォリスタチンまたはその活性断片もしくは類似体のようなアクチビン拮抗物質をコードする組換えポリヌクレオチドを含む、少なくとも1つの発現ベクターで宿主細胞をトランسفエクションすることにより産生されうる。形質転換された細胞は、その後フォリスタチンの発現を可能にする条件下で培養される。発現されたタンパク質は、その後細胞または培地から回収され、単離され、選択的に当業者に公知の適当な手段により精製されうる。例えばタンパク質は、細胞溶解後、可溶性の形で単離されうる、または塩化グアニジンにおいてのような公知の技術を用いて抽出されうる。

20

【0090】

例えば、外因性フォリスタチン遺伝子を含む微生物細胞は、大容量のリアクターで培養され、遠心分離で収集され、その後例えば高压均質化により破壊されうる。その結果生じた細胞溶解物は、適切な希釈液/緩衝液に再懸濁され、フォリスタチンタンパク質の水溶性懸濁液を得るために濾過されうる。組換えタンパク質は、例えば50 μg/ml～500 μg/mlの濃度まで0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)に希釈し、その後滅菌した0.22マイクロンのフィルターに通すことにより、粗製の形で投与されることができる。

30

【0091】

フォリスタチンまたはその断片のようなアクチビン拮抗物質はまた、当業者に周知の固相化学の方法により合成されうる。例えば、フォリスタチン断片は、StewardおよびYoung (Steward, J. M. および Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis (第2版) Pierce Chemical Co.、イリノイ、米国(1984)) の固相化学手順に従って合成されうる。一般的に、そのような合成方法は、増大するペプチド鎖に1つもしくは複数のアミノ酸または適当に保護されたアミノ酸の逐次的な付加を含む。典型的には、第一のアミノ酸のアミノ基かまたはカルボキシル基かのいずれかの一つ以外の機能性基は、適当な保護基により保護される。保護されたアミノ酸は、その後不活性の固体支持体に付着しているか、または適当に保護された相補性の（アミノもしくはカルボキシル）基を有する配列において、かつアミド結合を形成するのに適した条件下において、次のアミノ酸を付加することにより溶液中で使用される。保護基は、その後この新たに付加されたアミノ酸残基から除去され、そして次の（保護された）アミノ酸が付加される、など。結局、所望のアミノ酸は連結され、どの残っている保護基も、および必要ならばどの固体支持体も、最終ポリペプチドを作製するために、逐次的にまたは同時に除去される。

40

【0092】

フォリスタチンポリペプチドまたはその断片におけるような、アクチビン拮抗物質におけるアミノ酸変化は、当関連業者に周知の技術により果たされうる。例えば、アミノ酸変化は正しい読み取り枠を維持しながらヌクレオチドの付加、欠失または置換（保存的および/または非保存的）により果たされうる。標的ポリヌクレオチドにおけるそのような改変

50

は、ランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異、オリゴヌクレオチド媒介性またはポリヌクレオチド媒介性突然変異誘発、現存のまたは操作された制限酵素部位の使用による選択された領域の欠失、およびポリメラーゼ連鎖反応を含む技術により生じうる。

【0093】

または、本発明のアクチビン拮抗物質は、融合タンパク質として作製されうる。例えば、選択された宿主細胞においてタンパク質の発現を増強するために、精製を向上させるために、または組織、細胞もしくは細胞抽出物においてフォリスタチンの存在をモニターすることに使用するために、フォリスタチン融合タンパク質を作製することが望ましい場合がある。適した融合パートナーは、当業者によく知られており、以下を含む： -ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、およびポリヒスチジン。

10

【0094】

本発明のアクチビン拮抗物質はまた、典型的にはアクチビンまたはアクチビン受容体に対して産生された抗体でもありうる。

【0095】

抗体（またはその断片）は、下記の方法を用いて、アクチビン、アクチビン受容体、またはその免疫原性部分に対して産生されうる。十分な量の抗体の便利な製造として、これらは、血清を含まない培地でのバッチ発酵により製造され、その後クロマトグラフィー段階およびウイルスの不活化/除去段階を組み入れた多段階手順により精製されうる。例えば、抗体は、最初、プロテインAアフィニティクロマトグラフィーにより分離され、その後いずれの脂質エンベロープ型ウイルスも不活化するために溶剤/界面活性剤で処理されうる。典型的には、サイズ排除、逆相、陰イオンおよび/または陽イオン交換クロマトグラフィーによるさらなる精製が、タンパク質、溶剤/界面活性剤および核酸のような残留する望ましくない混入物を除去するために用いられる。このように得られた抗体はさらに精製され、ゲル濾過カラムを用いて0.9%食塩水へ製剤化されうる。製剤化されたバルク調製物は、その後滅菌され、ウイルスの濾過をされ、投薬されうる。

20

【0096】

これらの抗体は、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab断片、およびFab発現ライブラリーを含むことができる。

【0097】

モノクローナル抗体は、抗体産生細胞の单一クローンにより分泌される抗体を指し、特定の抗原またはエピトープに対して单一特異的である。それゆえに、モノクローナル抗体は、それが免疫反応するいずれの抗原に対しても单一の結合親和性を示す。

30

【0098】

アクチビンまたはアクチビン受容体の抗体は、当業者に周知の方法を用いて産生されうる。例えば、モノクローナル抗体は、典型的にはFab部を含むが、「Antibodies-A Laboratory Manual」、HarlowおよびLane編、Cold Spring Harbor Laboratory、N.Y. (1988) (その開示は、参照として本明細書に組み入れられている)に記載されるハイブリドーマ技術を用いて調製されうる。培養中の継続的な細胞系による抗体分子の産生を提供するいずれの技術も用いられる。適する技術は、Kohlerら、Nature、256: 495-497 (1975) により最初に開発されたハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozborら、Immunology Today、4:72 (1983))、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術 (Coleら、「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」、pp. 77-96、Alan R. Liss, Inc.、(1985)) を含む。不死の抗体産生細胞系は、発癌性DNAでのBリンパ球の直接的形質転換、またはエプスタイン-バーウィルスでのトランスフェクションのような融合以外の技術により作製されうる。例えば、M. Schreierら、「Hybridoma Techniques」(1980); Hammerlingら、「Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas」(1981); Kennettら、「Monoclonal Antibodies」(1980)を参照されたい；これらの引用文献のそれぞれの開示もまた、参照として本明細書に組み入れられている。

40

【0099】

50

アクチビン、アクチビン受容体、またはそれらの断片に対するポリクローナル抗体の産生のために使用されうる、当技術分野において公知の様々な手順もある。例えば、1つまたは複数の宿主動物が関連性ポリペプチドまたはその誘導体（例えば、断片もしくは融合タンパク質）での注入により免疫化されうる。適する宿主は、例えばウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含む。

【0100】

抗体（またはその断片）は、結合親和性または結合活性をもつものである。好ましくは、この結合親和性または結合活性は、約 10^5 M^{-1} より大きい、より好ましくは約 10^6 M^{-1} より大きい、より好ましくはさらに約 10^7 M^{-1} より大きい、最も好ましくは約 10^8 M^{-1} より大きい。

10

【0101】

1. アクチビン拮抗物質を用いる疾患の治療および/または予防

本発明に記載されているアクチビン拮抗物質の投与は、脊椎動物において線維症依存性疾患、特に、過剰増殖性または炎症性線維性疾患；特発性肺線維症、間質性肺疾患のような肺線維症；潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患ならびに関連症状；肝線維症および肝硬変を伴う腎臓における管壊死を治療するために有用である。

【0102】

典型的には、脊椎動物は、ヒト、非ヒト靈長類、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ、トリ、ネコおよびイヌからなる群より選択される。より典型的には、脊椎動物は、ヒト、非ヒト靈長類またはマウスである。さらにより典型的には、脊椎動物は、ヒトである。

20

【0103】

いずれの特定の患者についても治療的有効投与量レベルは、医学で周知の他の関連因子と共に、以下を含む様々な因子に依存する：治療される疾患および疾患の重症度；使用されるアクチビン拮抗物質またはその断片もしくは類似体の活性；使用される組成物；患者の年齢、体重、一般的健康状態、性別および食事；投与の時期；投与経路；アクチビン拮抗物質の排出の比率；治療の期間；アクチビン拮抗物質またはその断片もしくは類似体と併用してまたは同時に使用される薬剤。例えば、望ましい治療効果を達成することが予想されるレベルよりも低いレベルでの治療用化合物の投与量で始めること、および必要な場合には、望ましい効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることは、当技術分野において周知である。

30

【0104】

それゆえに、アクチビン拮抗物質が適用できる疾患/病気を治療するために必要とされるアクチビン拮抗物質の効力があり、毒性のない量の決定は、日常的実験法だけで当業者により容易に決定されうる。典型的には、フォリストチンについて、有効投与量は24時間あたり1 kgの体重につき約0.00001 mg～約100 mg フォリストチン、好ましくは24時間あたり1 kgの体重につき約0.0001 mg～約10 mg フォリストチン、より好ましくは24時間あたり1 kgの体重につき約0.001 mg～約1 mg フォリストチン、さらにより好ましくは24時間あたり1 kgの体重につき約0.002 mg～約0.5 mg フォリストチン、さらにさらにより好ましくは24時間あたり1 kgの体重につき約0.005 mg～約0.20 mg フォリストチンの範囲であると予想される。さらに望ましい場合には、投与のために、一日有効量を複数の用量に分割できる。

40

【0105】

または、フォリストチンの有効投与量は、24時間あたり約6,500 mg/m²まででありうる。一般的に、有効投与量は、約0.004 mg/m²～約400 mg/m²、好ましくは約0.04 mg/m²～約40 mg/m²、より好ましくは約0.08 mg/m²～約20 mg/m²、さらにより好ましくは約0.2 mg/m²～約8 mg/m²の範囲であることが予想される。

【0106】

典型的には、治療はその状態の持続期間の間であり、接触時間は典型的にはその状態の持続期間の間であるものと思われる。

50

【 0 1 0 7 】

明らかに、本発明の化合物の個々の投与量の最適の量および間隔は、治療される状態の性質および程度、投与の型、経路および部位、ならびに治療される特定の脊椎動物の性質により決定されるものであり、これらの最適条件は、当業者により日常的手段で決定される。

【 0 1 0 8 】

アクチビン拮抗物質のプロドラッグもまた、本発明の範囲内に含まれる。典型的には、これらのプロドラッグは、本発明における使用に必要とされる化合物ヘインビボで容易に変換されるフォリスタチンの機能しうる誘導体である。プロドラッグの選択および調製のための典型的手順は、確立され、例えばH. Bundgaard編、「Design of Prodrugs」、Elsevier, 1985のような入手可能なテキストに記載されている。10

【 0 1 0 9 】

疾患の治療において使用される場合、アクチビン拮抗物質またはその類似体もしくは断片は、単独で投与されうる。しかしながら、アクチビン拮抗物質が、疾患を治療するために通常患者に投与される他の化学療法的治療と共に投与されることは、一般的に好ましい。

【 0 1 1 0 】

本発明の薬学的製剤は、典型的には当業者に公知の方法により調製され、それゆえ、典型的には薬学的に許容される担体、希釈剤および/もしくはアジュバントのような賦形剤、またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 1 1 1 】

製剤は、標準的経路により投与されうる。例えば、製剤は、経口、直腸、非経口（例えば、静脈内、髄腔内、皮下もしくは筋肉内）、局所的、経皮的、腹腔内、頭蓋内、脳室内、大脳内、腔内、または子宮内の経路により投与されうる。20

【 0 1 1 2 】

アクチビン拮抗物質またはその類似体もしくは活性断片はまた、選択的に他の活性薬剤と共に、徐放を可能にする生分解性ポリマーへ組み入れられうり、ポリマーは、薬剤送達が望まれる所（局在性疾患の部位のような）の付近に埋め込まれるか、または活性薬剤が全身にゆっくり放出されるように埋め込まれる。浸透性ミニポンプもまた、直接的に例えば、線維性増殖へまたはその増殖への血管供給へのよう、対象となる部位へカニューレを通して活性薬剤の高濃度の制御された送達を提供するために使用されうる。30

【 0 1 1 3 】

2. 疾患を治療するための治療的/薬学的組成物

本発明の治療的/薬学的組成物に用いられる担体、希釈剤およびアジュバントは、他の成分と適合性があること、および患者に対して有害ではないことについて、「許容され」なければならない。薬学的および獣医学的に許容される担体または希釈剤の例は、脱塩水または蒸留水；食塩水またはリン酸緩衝食塩水（PBS）；ゼラチン；キサンタンガム、アルギン酸塩、寒天、カラギーナン、トラガカントゴムまたはアラビアゴムのような植物性ゴム；微結晶性セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはヒドロキシプロピルエチルセルロースのようなセルロース誘導体；天然または改変デンプンおよびデキストリン；乳酸基盤ポリマー；低級アルカノール、例えばエタノールまたはイソプロパノール；低級アラルカノール；クエン酸塩；アセトニトリル；ベンジルアルコール；ジメチルアセトアミド；ジメチルホルムアミド；モノメチルアセトアミド；N-メチルピロリドンのような2-ピロリドン；フタル酸ジメチルのようなフタル酸エステル；ポリグリコール化グリセリド；低級ポリアルキレングリコールもしくは低級アルキレングリコール、またはそれらのアルキルエーテルもしくはエステル、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ブロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテルおよびジエチレングリコールモノブチルエーテルおよびポリエチレングリコール脂肪酸エステル；糖または多価アルコールの脂肪エステルおよびエーテル、ならびにアルコールエトキシレート、ポリオキシエチレンソルビタン-またはソル

4050

ビトール-脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンプロック共重合体 (ethoxylated propoxylated block copolymer) のようなそれらのポリオキシアルケン (alkoxylated) 誘導体；グリセロールおよびその脂肪酸モノ-、ジ-もしくはトリ-エステル；ソルビタンモノラウレートのようなソルビタンエステル；ポリソルベート；脂肪酸；ピーナッツ油、サフラワー油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、落花生油またはヤシ油のような植物を素材とする油；蜜蠟もしくはラノリンまたはそれらの誘導体のような、動物由来の蠟；パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、アジピン酸ジイソブチルまたはオレイン酸エチルのような脂肪酸エステル；セトステアリルアルコールのような脂肪アルコール；硫酸化脂肪アルコール；第四アンモニウム化合物；ドデシル硫酸ナトリウムのような脂肪硫酸エステル；アルキルベンゼンスルホン酸またはブチルナフタレンスルホン酸のような脂肪芳香族スルホン酸塩；アルキルナフタレンスルホン酸塩；ステアリン酸カリウムまたはステアリン酸アンモニウムのようなアルカリ性ステアリン酸塩；ラウリル硫酸ナトリウム、セチル硫酸ナトリウムおよびドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムのような、アルキルおよびアルカリル硫酸塩；メチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサンおよびメチルフェニルポリソルポキサンのようなポリシロキサンを含む、シリコーン油；揮発性シリコーン；ヒュームドシリカ；コロイド二酸化ケイ素；マグネシウムアルミニウムケイ酸；流動パラフィン、軟質パラフィンまたはスクアランのような鉛油；ポリビニルピロリドンまたはそのポリマー；ならびにワセリンである。典型的には、担体は、組成物の 10% から 99.9% 重量までを構成する。

10

20

30

40

【0114】

好ましい形態において、本発明の薬学的組成物は、活性薬剤として、フォリスタチン、その類似体もしくは活性断片、またはフォリスタチンの有効量を、薬学的に許容される担体、希釈剤および/もしくは実施例1に示されるようなアジュバントと共に含む。

【0115】

本発明の薬学的組成物は、以下でありうる：非経口投与、すなわち皮下、筋肉内もしくは静脈内注射に適した形態；経口摂取に適したカプセル；局所的投与に適した軟膏、クリームまたはローション；目薬としての送達に適した形態；または、鼻腔内もしくは経口吸入によるような吸入による投与に適したエアゾールの形態。

【0116】

注射可能な溶液または懸濁液としての投与について、毒性のない非経口的に受け入れられる希釈剤または担体は、リンガー溶液、等張食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノールおよび1,2プロピレングリコールを含みうる。

【0117】

経口に適した担体、希釈剤、賦形剤およびアジュバントは、ピーナッツ油、流動パラフィン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、トラガカントゴム、デキストロース、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、ゼラチンおよびレシチンを含む。さらに、これらの経口製剤は、適するフレーバー剤および着色剤を含みうる。カプセル形で用いられる場合、カプセルは、分解を遅らせるグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートのような化合物でコーティングされうる。または、製剤は、小腸のような吸着についての所望の位置まで、例えば胃液から製剤を保護する、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ならびにアクリル酸およびメタクリル酸の重合体もしくは共重合体ならびに/またはそれらのエステル、またはそれらの組み合わせのような腸溶性コーティングされて提供されうる。

【0118】

経口製剤のためのアジュバントは、典型的には緩和薬、乳化剤、濃化剤、保存料、殺菌剤および緩衝剤の1つまたは複数を含む。

【0119】

経口投与のための固体剤形は、ヒトもしくは獣医学の薬学的実施において許容される結合剤、甘味料、着色剤、崩壊剤、希釈剤、フレーバー剤、コーティング剤、保存料、潤滑剤

50

および/または時間遅延剤を含みうる。適する結合剤は、アラビアゴム、ゼラチン、コーンスタークまたは他の天然もしくは改変デンプンおよびデキストリン、トラガカントゴム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、またはポリエチレングリコールを含む。適する甘味料は、ショ糖、乳糖、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、ブドウ糖、アスパルテームまたはサッカリンを含む。多数の適する着色剤が公知であり、特定の製剤の性質に従って選択されるものであり、例えばクロロフィル、カロテン、コチニールのような天然着色剤を含むことが有利である場合がある。適する崩壊剤は、コーンスターク、メチルセルロースのようなセルロース誘導体、ポリビニルピロリドン、グアルガム、キサンタンガム、ベントナイト、アルギン酸または寒天を含む。適する希釈剤は、乳糖、ソルビトール、マンニトール、デキストロース、カオリン、セルロース、炭酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、クエン酸塩またはリン酸二カルシウムを含む。適するフレーバー剤は、ハッカ油、冬緑油、グロスグリ、サクランボ、オレンジ、レモンまたはラズベリーのフレーバーを含む。適するコーティング剤は、アクリル酸および/もしくはメタクリル酸の重合体もしくは共重合体ならびに/またはそれらのエステル、ヒドロキシプロピルエチルセルロースのようなセルロース誘導体、蠍、脂肪アルコール、ゼイン、セラックまたはグルテンを含む。適する保存料は、安息香酸ナトリウム、ビタミンE、-トコフェロール、アスコルビン酸、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは重亜硫酸ナトリウムを含む。適する潤滑剤は、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、オレイン酸ナトリウム、塩化ナトリウムまたはタルクを含む。適する時間遅延剤は、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを含む。

10

20

30

40

50

【0120】

経口投与のための液体剤形は、典型的には上記の薬剤に加えて、例えば水、オリーブ油、ピーナッツ油、ゴマ油、ヒマワリ油、サフラワー油、落花生油もしくはヤシ油のような植物油、流動パラフィン、エチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールのようなグリコール、エタノール、プロパノールもしくはイソプロパノールのような低級アルカノール、グリセロール、脂肪アルコール、トリグリセリド、またはそれらの混合物から選択される液状担体を含む。

【0121】

経口投与のための懸濁液は、分散剤および/または、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロースのようなセルロース誘導体、グアルガムもしくはキサンタンガムのような植物性ガム、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウムまたはアセチルアルコールから選択される沈殿防止剤をさらに含みうる。適する分散剤は、レシチン、ステアリン酸のような脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビトールモノ-もしくはジ-オlein酸、-ステアリン酸またはラウリン酸、ポリオキシエチレンソルビタンモノ-もしくはジ-オlein酸、-ステアリン酸またはラウリン酸などを含む。

【0122】

経口投与のための乳液は、1つまたは複数の乳化剤をさらに含みうる。適する乳化剤は、上記で例示されている分散剤、またはアラビアゴムもしくはトラガカントゴムのような他の天然ゴムを含む。

【0123】

非経口的に投与可能な組成物のための方法は、当業者にとって明らかであり、例えば「Remington's Pharmaceutical Science」、第15版、Mack Publishing Company、Easton、Pa.により詳細に記載されており、これにより、参照として本明細書に組み入れられている。

【0124】

本発明の局所用製剤は、1つまたは複数の許容される担体、および選択的に任意の他の治療的成分と共に、活性成分として、アクチビン拮抗物質、またはその類似体もしくは活性断片を含む。局所的投与に適した製剤は、リニメント剤、ローション、クリーム、軟膏またはペーストのような、治療が必要とされる部位へ皮膚を通しての浸透に適した流動性または半流動性調製物、および目、耳または鼻への投与に適した滴剤を含む。

【0125】

本発明による滴剤は、滅菌した水性もしくは油性溶液または懸濁液を含みうる。これらは、典型的には殺細菌剤および/もしくは殺真菌剤、ならびに/または酸化防止剤のような任意の他の適する保存料の水溶液に、選択的に界面活性剤を含み、活性成分を溶解することにより調製される。その結果生じた溶液は、その後濾過により清澄にされ、適する容器に移動され、滅菌されうる。滅菌は、例えば90 ~ 100 度30分間、加圧滅菌もしくは維持することによりまたは濾過により達成され、続いて無菌技術により容器へ移動する。滴剤での含有に適した殺細菌剤および殺真菌剤は、例えば硝酸または酢酸フェニル水銀(0.002%)、塩化ベンザルコニウム(0.01%)および酢酸クロルヘキシジン(0.01%)を含む。油性溶液の調製に適した溶媒は、例えばグリセロール、希アルコールまたはプロピレングリコールを含みうる。

10

【0126】

本発明によるローションは、皮膚または眼への適用に適したものと同様の方法により調製されうる。皮膚への適用のためのローション、クリームまたはリニメント剤はまた、アルコールやアセトンのような乾燥を促進するもしくは皮膚を冷やすための薬剤、および/またはグリセロールもしくはヒマシ油や落花生油のような油のような保湿剤を含みうる。皮膚への適用のためのローション、クリームまたはリニメント剤はまた、未処置の動物と処置済みの区別を容易にするために獣医学の適用について、当技術分野において周知の適切かつ適合性の着色剤/染料を、特に降り注ぎ方式の(pour-on) 製剤において含みうる。

20

【0127】

本発明によるクリーム、軟膏またはペーストは、外用のための活性成分の半固体製剤である。それらは、微細に分割された形または粉末状の形の活性成分を、単独または溶液もしくは水性や非水性液中の懸濁液として、脂肪性または非脂肪性基剤と混合することにより作製されうる。基剤は、硬質、軟質または流動パラフィン、グリセロールまたはその脂肪酸モノエステル、ジエステル、もしくはトリエステル、蜜蠟、金属石鹼のような炭化水素；ゴム糊；アーモンド油、トウモロコシ油、落花生油、ヒマシ油またはオリーブ油のような天然源の油；羊毛脂もしくはその誘導体、またはマクロゴールもしくはグリコールのようなアルコールと共にステアリン酸もしくはオレイン酸のような脂肪酸、またはそのエーテルおよび/もしくはエステル、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテルおよびジエチレングリコールモノブチルエーテル、低級アルカノール、例えばエタノールもしくはイソプロパノール、低級アラルカノール、またはN-メチルピロリドンのような2-ピロリドンを含みうる。

30

【0128】

皮膚適用のための製剤はまた、一面に行き渡らせるにおいてまたは皮膚を通しての吸着において助けとなりうる、任意の適する界面活性剤を組み込むことが有利である場合がある。そのような界面活性剤は、陰イオン性、陽イオン性、非イオン性、または両性イオン性の界面活性剤でありうる。典型的には、界面活性剤は、非イオン性であり、より典型的には、糖または多価アルコールのエステルおよびエーテル、ならびにアルコールエトキシート、ポリオキシエチレンソルビタン-またはソルビトール-脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロック共重合体のようなそれらのポリオキシアルケン誘導体から選択されるものである。当技術分野において公知の適する消泡剤もまた、必要な場合には含まれうる。

40

【0129】

天然のガム、セルロース誘導体もしくは珪質のシリカのような無機物質のような沈殿防止剤および/または粘性改変剤、ならびにラノリンのような他の成分もまた、含まれうる。

【0130】

50

本発明による局所用製剤における使用に適した保存料は、例えば安息香酸ナトリウム、ベンジルアルコール、ビタミンE、-トコフェロール、アスコルビン酸、2,6-ジtert-ブチル-4-クレゾール(BHT)、2-tert-ブチル-4-メトキシフェノール(BHA)、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは重亜硫酸ナトリウムを含みうる。

【0131】

本発明の薬学的組成物はまた、リポソームの形で投与されうる。リポソームは、一般的に、リン脂質または他の脂質物質から得られ、水性媒体に分散する単層状または多層状水和化液晶により形成される。リポソームを形成することができる、毒性がなく、生理学的に許容されかつ代謝可能な脂質のいずれも使用することができる。リポソームを含む製剤はまた、当技術分野において公知の安定化剤、保存料、賦形剤などを含みうる。リポソームの調製のために、好ましい脂質は、天然および合成のリン脂質ならびにホスファチジルコリン(レシチン)である。リポソームを形成するための方法は、確立され、Prescott編、「Methods in Cell Biology」、XIV巻、Academic Press、New York、N.Y. (1976)、P. 33以下参照のようなテキストに発表されており、その内容は参考として本明細書に組み入れられている。10

【0132】

3. 疾患の診断

アクチビンに対して産生される抗体、またはフォリスタチン、または両方を用いる、脊椎動物における線維症関連疾患についてのスクリーニングはまた、例えば以下を含む当技術分野において公知の多数の技術のいずれか1つにより達成されうる：ゲル拡散沈殿反応法；免疫拡散アッセイ法；インサイチュー免疫アッセイ法；ウエスタンプロット法；沈殿反応法；凝集アッセイ法；補体結合アッセイ法；免疫蛍光アッセイ法；プロテインAアッセイ法；免疫電気泳動アッセイ法；放射免疫検定法；ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)；サンドイッチ免疫アッセイ法；免疫放射測定アッセイ法；受容体結合アッセイ法；およびその他同種類のもの。20

【0133】

アクチビンに対する抗体は、本明細書で前に記載されているように産生されうり、そのような方法は、フォリスタチンに対する抗体の産生に等しく適用される。

【0134】

アクチビンおよびフォリスタチンは、脊椎動物において、正常組織では基礎レベルで発現するため、基礎発現レベルと比較しての試料における抗体に結合したアクチビンまたはフォリスタチンのレベルの変化の検出は、線維症関連疾患を示すものと思われる。30

【0135】

上記のようなスクリーニング試験を行うためのキットは、試験を行うために必要なすべての試薬を含む。例えば、キットは以下の容器を含みうる：

- (a) アクチビンかまたはフォリスタチンかのいずれかに対して産生される抗体(またはその断片)を含む第一の容器；
- (b) 抗体(またはその断片)の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む第二の容器。

【0136】

疾患の進行中における組織でのアクチビンレベルとフォリスタチンレベルの増加の差、健康な参照試料における差と比較して、試料におけるアクチビンレベルとフォリスタチンレベルの差における変化の検出は、線維症関連疾患を示す。上記のようなスクリーニング試験を行うためのキットは、試験を行うために必要なすべての試薬を含む。例えば、キットは以下の容器を含みうる：40

- (a) 少なくともアクチビン抗体(またはその断片)を含む第一の容器、および；
- (b) 少なくともフォリスタチン抗体(またはその断片)を含む第二の容器；
- (c) アクチビン抗体(またはその断片)の結合パートナーを検出可能な標識と共に含む結合体を含む第三の容器、および
- (d) フォリスタチン抗体(またはその断片)の結合パートナーを検出可能な標識と共に

10

20

30

40

50

含む結合体を含む第四の容器。

【0137】

典型的には、上記のキットはまた、例えば洗浄試薬、および/または結合した抗体の存在を定量的に検出することができる他の試薬を含む、1つまたは複数の他の容器を含む。好ましくは、検出試薬は、標識（第二）抗体を含む、またはアクチビンもしくはフォリスタチンに対して産生される抗体（またはその断片）がそれ自身標識されているところにおいて、その区画にアクチビンに対して産生される標識抗体（またはその断片）と反応することができる抗体結合試薬を含む。

【0138】

本発明に関連して、区画に分けられたキットは、試薬が別々の容器に含まれているいずれのキットも含み、小型のガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックもしくは紙の条片を含みうる。そのような容器は、試料および試薬の交差混入を防止しながら、一つの区画から別の区画への試薬の効率的な移動、および定量的様式における一つの区画からもう一つへの各容器の試薬または溶液の追加を可能にする。都合のよいようには、そのようなキットは、試験試料を受け入れる容器、アッセイ法に用いられる抗体を含む容器、洗浄試薬（リン酸緩衝食塩水、トリス緩衝液などのよう）を含む容器、および検出試薬を含む容器を含む。

【0139】

4. 遺伝子治療

本発明はまた、線維症関連疾患を治療するための遺伝子治療法に関する。本明細書に記載されているように、遺伝子治療は、遺伝子移入およびアンチセンスバイオテクノロジー技術を含みうる。

【0140】

遺伝子移入は、マイクロインジェクション法により細胞の核へ微量のDNAをただ単に注入することにより行われうる。導入された遺伝子は、転写および翻訳についての細胞の通常の機構により認識ことができ、遺伝子産物は、その後発現されることになる。

【0141】

以下を含む、より大量の細胞へDNAを導入するための多数の方法もまた試みられてきた：その後飲作用により細胞へ取り込まれる、CaPO₄を伴う標的DNAの沈殿を含む、トランスフェクション法；標的DNAが通過しうる穴を膜に導入するために高電圧パルスに細胞を曝す段階を含む、エレクトロポレーション法；その後標的細胞と融合することができる親油性小胞への標的DNAのパッケージングを含む、リポフェクション法/リポソーム融合法；および微小発射体に結合した標的DNAが細胞へ撃ち込まれる微粒子銃法。標的DNAはまた、DNAを化学修飾されたタンパク質へカップリングすることにより細胞へ導入されうる。

【0142】

典型的には、本発明による遺伝子移入の方法において、フォリスタチンもしくはその断片もしくは類似体のようなアクチビン拮抗物質をコードする核酸分子を含む発現ベクター、またはそのアクチビン拮抗物質をコードする核酸分子を含むベクターが細胞へ挿入される。形質転換された細胞は、インビトロで増殖され、その後患者へ大量で注入される。標的細胞集団（例えば、肝実質細胞、肝星細胞のような他の肝細胞型、平滑筋細胞、肺線維芽細胞、線維芽細胞、腎細胞）へのこれらの核酸配列の送達に適した発現ベクターは、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、数種のRNAウイルス、またはウシパピローマウイルスのようなウイルス由来であります。標的核酸配列を含む組換えウイルスベクターは、当業者によく知られている多数の方法のいずれか一つにより調製されうる。または、フォリスタチン、もしくはその類似体もしくは活性断片のようなアクチビン拮抗物質をコードする組換え核酸分子は、裸のDNAとして、または再構築された系、例えば標的細胞への送達のためのリポソームもしくは他の脂質系において、用いられうる。

【0143】

典型的には、本発明によるアンチセンス技術を含む方法において、アクチビン、アクチビ

10

20

30

40

50

ン受容体、もしくは他のアクチビン関連伝達経路分子、もしくはその断片もしくは類似体をコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部に対してアンチセンスの核酸分子についてコードする核酸分子を含む発現ベクター、またはそのような発現ベクターを含むベクターが細胞へ挿入される。適する発現ベクターは、遺伝子移入の目的のための上記のものを含みうる。典型的には、発現ベクターは、インビポで標的組織における細胞に挿入されるものであり、これは、典型的には適切なウイルスベクターのようなトランスフェクションベクターの使用、または発現ベクターの受動的取り込みの使用を含みうる。典型的には、方法は、アクチビン、アクチビン受容体、または他のアクチビン関連伝達経路分子の発現されたレベルが非形質転換型組織と比較して低下し、それにより、組織における疾患の進行が遅くなる、停止する、または疾患が後退するような、標的組織における相当量の細胞の形質転換を含む。アンチセンスをコードする核酸分子での細胞のトランスフェクションに適するウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、数種のRNAウイルス、レトロウイルス、またはウシパピローマウイルスのような弱毒化型ウイルスを含みうる。

10

【0144】

アデノウイルスタンパク質はエンドソームを不安定にして、細胞へのDNAの取り込みを増強させる能力があることもまた示された。DNA複合体を含む溶液へのアデノウイルスの混合、またはタンパク質架橋剤を用いてアデノウイルスへ共有結合的に付着したポリリシンへのDNAの結合は、実質的に、組換え遺伝子の取り込みおよび発現を向上させる。

20

【0145】

本発明を、ここで特定の実施例を参考することにより、より詳細に記載するが、決して本発明の範囲を限定するものではないと解釈されるべきである。

【0146】

実施例

実施例1 アクチビンAおよびフォリスタチン免疫反応性は、正常なラット肝臓における恒常的な肝細胞発現を示す

本発明者らは、正常な肝臓の肝細胞のみへのフォリスタチン免疫局在性を実証した(図1)。

【0147】

組織学的試験に必要とされる肝臓試料は、室温で24時間、10% PBS緩衝ホルマリンで固定され、その後70% アルコールで2回洗浄され、使用されるまで室温で70% アルコール中に保存された。その後、組織試料は、以下の計画を用いて処理された。試料を、1時間70% エタノール、2時間90% エタノール、および2時間100% エタノール、ならびに1時間10% エタノールの逐次浴で脱水した。その後、組織を別々の浴槽で3回、ヒストソルに1時間浸水させ、2個の別々の浴槽のそれぞれにおいて、1時間、蟻に浸漬した。その後、組織を蟻の型に包埋し、いったん固まつたら、使用するまで室温で保存した。

30

【0148】

免疫組織化学のために、ホルマリン固定化パラフィン包埋組織塊を4 μmの薄片に切り、スーパークロストプラス(Superfrost Plus)(商標)スライドに置き、60 °Cで30分間、インキュベートし、必要とするまで室温で保存した。その後、スライドを、標準的技術を用いて脱パラフィン化し、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)に浸水させて400 Wで10分間、マイクロ波熱回復させた。色は、他のように記載されない限り、すべての染色工程において3',3-ジアミノベンザジン(DAB)を用いて発色させ、スライドはヘマトキシリントリカルミンで対比染色された。

40

【0149】

肝臓組織においてアクチビンAの位置を確認するために、アクチビン-_Aサブユニットに対して産生されるモノクローナル抗体「E₄」を18 μg/mlの最終濃度で適用し、4 °Cで一晩、インキュベートした。「E₄」は、アクチビンA ELISAにおいて使用された同じモノクローナル抗体であり、両方の工程について以前に確証されている(Jarred, RA, Cancilla B, Richards M, Groome NP, McNatty KP, Risbridger GP. 「Differential localization o

50

f inhibin subunit proteins in the ovine testis during fetal gonada development.」*Endocrinology* 1999; 140:979-986)。反応性は、製造会社の使用説明書に従い、CSAシグナル增幅キット(DAKO)を用いて増幅され、色は発色され、切片は対比染色された。ヒト前立腺切片が陽性対照として用いられ、陰性対照は、その一次抗体を除いて関連性のない抗体(正常なマウス免疫グロブリン)を代わりに用いた。インヒビンは、本質的に肝臓で発現されないため、_Aサブユニットの検出は、アクチビンAタンパク質を示し、インヒビン(および_Aのサブユニットのヘテロ二量体)ではない。

【0150】

ヒトフォリスタチンの2つの主なアイソフォームに対するモノクローナル抗体が組織免疫反応性を測定するために用いられた。モノクローナル抗体17/2(1:150)は、ヒトフォリスタチン288に特異的であり、H10(1:100)クローンは、ヒトフォリスタチン315に特異的である(McPherson SJ、Mellow SL、Wang H、Evans L.W、Groome NP、およびRisbridger GP、「Expression of activin A and follistatin core proteins by human prostate tumor cell lines.」*Endocrinology* 1999; 140:5303-5309)。各モノクローナル抗体についての染色工程は、陽性対照として、アクチビン-_Aサブユニットに関してはHepG2細胞系のサイトスピニン調製物を用いて行われ、一次抗体の代わりに用いられた関連性のない抗体が陰性対照としての役割を果たした。

【0151】

実施例2 アクチビンAについての免疫反応性は、小葉の肝細胞においてより線維性中隔に隣接した所で強いが、硬変においてフォリスタチン発現における変化はない
線維性および硬変性の肝臓におけるアクチビンAの発現は、正常な肝臓のそれよりも論議的となることは少ない。

【0152】

80 gm~100 gmの体重のオスのウィスターラットを一定の温度および湿度で、標準的な12時間の昼夜サイクルにおいて収容し、水およびラット用飼料へ自由に接近できるようにした。線維症および硬変のモデルを確立するために、ラットに1:1 四塩化炭素/オリーブ油の混合物を1週間に3回、12週間、0.8 ml/kgの投与量で腹膜内に注射した。注射は、3日続けて与えられた。対照動物は、等容量のオリーブ油のみを注射された。線維症および硬変のこのモデルにおいて、本発明者らは、小葉の肝細胞から線維性帯状組織周囲の領域まで、免疫反応性アクチビンAの分布における変化(図2)、およびHSCのマーカーとの偶然の共局在性(図3)を観察した。

【0153】

実験は、実施例1どおりに行われ、線維性中隔内のアクチビン発現HSCを評価するために、共焦点顕微鏡が用いられた。活性化肝星細胞についてのマーカーである平滑筋アクチンが、活性化肝星細胞に存在するアクチンフィラメントに対して作製されたモノクローナル抗体を用いて検出された。₋平滑筋アクチンを発現させる細胞は、室温で1時間、x mg/ml(1:100、DAKO corporation)の最終濃度で適用されるモノクローナルマウス抗ヒト一次抗体を用いて可視化された。この抗体は、ラット₋平滑筋と交差反応性を示すことが以前に確認されている。反応性を可視化するために、切片を、正常なラット血清に対してあらかじめ吸収されたヒツジ抗マウスFITC結合体(1:50、Silenus、Victoria)と室温で1時間、インキュベートした。線維性内HSCによるアクチビン発現を評価するために、ビオチン化アクチビンA結合体(1:20)を1時間適用し、ストレプトアビシン-テキサスレッド結合体(1:50)で30分間、可視化した。反応性は、蛍光条件下、バイオラッド(Biorad)共焦点顕微鏡で測定され、バイオラッドソフトウェアを用いて解析された。

【0154】

特に、正常なものと比較した場合、線維症および硬変の動物において、フォリスタチンの反応性における認識できる変化はなかった(図4)。この発見は、線維症および硬変の肝臓におけるフォリスタチン発現の初めての記載であり、線維性中隔に隣接したアクチビン発現の増加が、フォリスタチン中和活性の増加により抵抗されることを示唆しているものと思われる。

10

20

30

40

50

【0155】

実施例3 肝臓のアクチビンmRNAの発現が、肝臓の線維形成の発生の間、フォリスタチンmRNAにおける変化に先行する

アクチビンおよびフォリスタチンの発現は、多くの組織の間に広く分布しているため、タンパク質レベルでの観察は、肝外の供給源からのタンパク質蓄積により混同されうる。

【0156】

全肝臓抽出物のリアルタイムPCR分析を用いて、本発明者らは、実施例2に記載されているように線維症のモデルの期間中、アクチビンAおよびフォリスタチンの両方のmRNAの発現を分析した(図5)。

【0157】

全RNAを、改変されたトリゾール(Trizol)(商標)を用いて精製した。簡単には、最初の抽出後、より効率的な沈殿が生じることが可能になるように、上清を0.8Mクエン酸ナトリウムおよび1.2M塩化ナトリウムの高塩溶液と混合した。ゲノムDNAの混入を除去するために、その後試料を37℃で45分間、10UのDNA分解酵素(Roche Biochemicals)で処理し、95℃で3分間、インキュベートすることにより反応を停止した。その後、試料をA₂₆₀/A₂₈₀分光光度計により定量した。各試料についての2マイクログラムのRNAをスーパースクリプトII(Superscript II)(登録商標)およびオリゴdT₁₃₋₁₅(Gibco-BRL)を用いて転写した。

【0158】

アクチビン_AサブユニットmRNA分析は、リアルタイムでPCR産物の形成を蛍光測定的にモニターする、ロシュライトサイクラー(Roche LightCycler)(Roche)を用いて行われた。これは、その結合していない形では低蛍光性であるが、dsDNAに結合した場合、蛍光強度がdsDNAの量に比例して増加するように強く蛍光を発するマーカーSYBRグリーンI(SYBR Green I)を用いることにより達成される。PCR增幅曲線の対数直線部分は、対数直線領域を通す最適合線とノイズバンドの交差として定義される限界点または交差点(サイクル数に示される)で同定される。これらの研究において、正常なラットcDNA調製物は、品質管理として用いられ、実験の実施間で一定のまま保持されるサイクリング条件を確実にするためにすべての反応において使用される。各mRNAの発現レベルおよび各試料におけるそれらの推定される交差点は、ライトサイクルーソフトウェアを用いて決定された。その後、特定のmRNA/GAPDH増幅の比率を計算した。PCR試薬は、ロシュバイオケミカルズ(Roche Biochemicals)から購入された。

【0159】

PCRについて、各cDNA調製物の2μlを1:400の最終濃度まで希釈し、dNTP、Mg²⁺、SYBRグリーンおよび関連プライマーを含有する個々のキャピラリーへ添加した。マグネシウム濃度、アニーリング温度、伸長時間ならびにプライマー特異的ヌクレオチドの位置および配列は、表1に示されている。対数直線相に到達することを確実にするために、40サイクルのPCRをプログラムした。反応の完了時点において、生じたDNA産物の特異性を確立するために、融解曲線分析を行った。PCR産物をキャピラリーから取り出し、産物のサイズおよびPCR反応の完全性を確認するためにゲル電気泳動法により可視化した。あらゆる例において、個々の動物についての各プライマーセットは、単一のPCR実験において実施された。アッセイ内変動は、各プライマーセットについて4%であった。

【0160】

CCl₄での中毒後すぐに、1週間目でアクチビンA発現において有意な低下があり、2週間目まで通して続いた。次いで発現レベルは、4週間目で基準線レベルまで戻り、モデルの残りの間ずっと一定のままであった。

【0161】

対照的に、フォリスタチン発現は、正常なレベルと比較して最初は上昇した。興味深いことに、フォリスタチン発現におけるこの上昇は、PCNA発現により測定されたピークの肝細胞増殖と相關した。最初の上昇後、フォリスタチンmRNA発現レベルは、2週間目で有意に降下し、その後は、アクチビン発現を模倣した。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 2 】

フォリスタチンおよびアクチビンのこの最初の応答は、修復性応答を誘発するCCl₄の急性傷害による可能性が高い。

【 0 1 6 3 】

これらの結果は、アクチビンAおよびフォリスタチンのレベルは肝線維症の病因間で異なって制御されるが、この発現は込み入った形で結び付けられているという考えを強調するものである。

【 0 1 6 4 】

実施例4 アクチビンA mRNA発現は、フォリスタチンmRNA発現と比較して、HSC活性化の初期の間、急速に増加する

本発明者らは、HSC増殖およびECM生成の他の重要なマーカーに関連してアクチビンAおよびフォリスタチンの発現パターンを測定するために、インビトロで分化転換した時、新鮮に単離されたHSCについてリアルタイムPCR分析を行った。

【 0 1 6 5 】

HSC培養物は、以前に記載されているように (Ramm GA. 「Isolation and culture of rat hepatic stellate cells.」 J Gastroenterol Hepatol (1998) 13:846-851)、連続的なプロナーゼおよびコラゲナーゼの灌流により確立された。簡単には、細胞をナイコデンツ (Nycomeden) (Sigma、シドニー、オーストラリア) の2段階不連続勾配に分離し、純度は特有のビタミンA UV自己蛍光およびフローサイトメトリーにより評価した。生存力を測定するためのトリパンブルー排除後、 1×10^6 細胞/mlを標準的5% CO₂条件下、10% ウシ胎児血清および10% 標準ウマ血清 (Trace Scientific、ピクトリア) で補充されたM199培地で培養した。培地は、24時間後交換され、その後は48時間毎に交換された。

【 0 1 6 6 】

RNA単離およびリアルタイムPCRは、実施例3どおりに行われた。

【 0 1 6 7 】

HSCが分化転換した時、1型コラーゲンmRNA発現は、予想通り上昇した。しかしながら、本発明者らの分析により、HSC活性化の間のごく初期にアクチビンA mRNA発現の誘導があり、5日目まで通して続くことが明らかになった(図6)。なおさらに、この発現はTGF の発現の前に上昇したが、1日目の後は、TGF は、アクチビンAより多かった。

【 0 1 6 8 】

しかしながら、重要な発見は、フォリスタチンmRNA発現が単離後1日でピークになり5日目まで一定のままであり、アクチビンAおよびFSの発現レベルが著しく異なっていたという観察であった。それは、内分泌的または自己分泌的のどちらに由来しても、アクチビンAの存在がHSCフィブロネクチンおよびコラーゲン合成を刺激することができることが示唆されていた。上記実施例で報告されている発見とひとまとめにして考えたこれらの観察、およびフォリスタチンがアクチビンAの生物活性を中和するという知識により、フォリスタチンの添加がHSC ECM生成を改善し、それゆえに肝線維形成を改善することができるこことが示唆されているものと思われる。

【 0 1 6 9 】

実施例5 単離された肝星細胞は、それらが典型的な「筋線維芽細胞様」表現型に転換する時、増加した濃度の生物活性アクチビンAを産生する

HSCの一次培養は、実施例4どおり正常な肝臓から確立され、分析により、それらが活性化表現型に転換した時の増加した量のアクチビンの産生が明らかになった(図7)。

【 0 1 7 0 】

アクチビン免疫反応性は、Knight PG、Mutukrishna S、Groome NPのように、ELISAにより測定された。血清および卵胞液における「総」アクチビンA濃度の測定のための2部位酵素免疫アッセイ法の開発および適用は、J Endocrinol (1996)、148:267-279に記載される方法に基づいた。

【 0 1 7 1 】

HSC培養からの馴化培地は、以前に確証されたインビトロでの生物検定法 (Phillips, D.J 50

.、Brauman, J.N.、Mason, A.J.、de Kretser, D.M. およびHedger, M.P. 「A sensitive and specific *in vitro* bioassay for activin using a mouse plasmacytoma cell line, MPC-11. *J Endocrinol*」(1999)、162:111-115)を用いてアクチビン生物活性について評価された。アクチビンの添加は、マウスMPC-11細胞において、用量依存的増殖抑制を引き起こす。これらの細胞は、TGF およびインヒビンに無反応性であるが、アクチビンの効果は、過剰フォリスタチンの添加により遮断されうる。

【0172】

MPC-11細胞へのHSC培養物からの上清の添加は、結果として、増殖において用量依存的減少を生じた(図8)。この増殖における減少は、rh-アクチビンAのそれを模倣した。

【0173】

培養上清の添加がrh-アクチビンAについて観察されるものより強力であることが観察された。

【0174】

実施例6 HSCの培養物への外因性アクチビンAおよびフォリスタチンの添加により、結果としてHSC増殖が減少した

実施例4どおりに単離されるが、新鮮に単離されかつ活性化されたHSCの培養物は、増殖への影響を測定するために外因性アクチビンAおよびフォリスタチンに曝された。アクチビンAおよびフォリスタチンの両方の添加は、結果として、TGF について観察されたものと類似したプロフィールで、両方の実験条件(図9および図10)において、HSC増殖に用量依存的減少を生じた。

【0175】

様々な外因性介在物質に対するHSCおよび転換されたHSC(筋線維芽細胞)の増殖性応答は、インビトロで³H-チミジンの取り込みにより評価された。最適な細胞密度が決定された後、細胞を 0.5×10^5 細胞/ウェルで24ウェルプレート上に播種し、37 °Cで一晩、接着させておいた。細胞培地を除去し、0.1% BSAを含むM199培地に交換し、18時間、細胞が細胞サイクルのG0期へ移行するようにした。その後、細胞をアクチビン(0.15 ng/ml、0.3 ng/ml、0.6 ng/ml、1.25 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、および20 ng/ml)、TGF (0.15 ng/ml、0.3 ng/ml、0.6 ng/ml、1.25 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml)、フォリスタチン(1.6 ng/ml、3.2 ng/ml、6.25 ng/ml、12.5 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、および100 ng/ml)およびPDGF-BB(1.6 ng/ml、3.2 ng/ml、6.25 ng/ml、12.5 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml)の様々な濃度に18時間、曝した。その後、培養物は、³H-チミジンの0.5 μCiでパルスされ、37 °Cでさらに16時間、インキュベートされた。次いで、接着および非接着細胞をトリプシン処理し、その後バイオラッド(Biorad)細胞ハーベスターで濾紙上に収集し、ワラック(Wallac)シンチレーションチューブへ加えた。750マイクロリットルのシンチレーション液を各チューブへ添加し、ワラック カウンター(Wallac)で1分間、カウントした。

【0176】

このデータは、フォリスタチンが肝線維形成を治療するための有益な治療剤である可能性があることを示唆している。

【0177】

実施例7 アクチビンAは、TGF と比較して、HSCアポトーシスに多岐にわたる影響を及ぼす

アクチビンAおよびフォリスタチンの両方ともHSC増殖を低下させるため、一方または両方ともHSCアポトーシスを引き起こしているという仮説を立てた。

【0178】

実施例4どおりに単離した活性化HSCの培養物を、様々な量のアクチビンA、フォリスタチン、およびTGF に曝し、アネキシンV; 細胞アポトーシスの初期マーカーの発現についてフローサイトメトリーにより評価した。

【0179】

少なくとも6回の継代培養を受けた筋線維芽細胞の細胞系のアポトーシスは、マーカーと

10

20

30

40

50

してアネキシンVの細胞表面発現を用いるフローサイトメトリーにより測定された。アネキシンVは、アポトーシスを起こしている細胞の細胞表面上に発現している細胞内タンパク質である。簡単には、 2×10^5 筋線維芽細胞HSCを6ウェル培養プレート上で一晩、継代培養した。次いで、細胞をHBSSで洗浄し、アクチビン(0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml、および100 ng/ml)、TGF (1 ng/mlおよび5 ng/ml)、フォリスタチン(10 ng/mlおよび100 ng/ml)、PDGF-BB(50 ng/ml)、同時にアクチビンおよびTGF (それぞれ、1 ng/mlおよび5 ng/ml)、ならびに同時にアクチビンおよびFS(それぞれ、10 ng/mlおよび100 ng/ml)で、16時間、処理した。陽性対照として、ニトロブルシドナトリウム(SNP)を0.5 μ Mの最終濃度で使用した。SNPは様々な固体癌および白血病の治療に用いられる化学療法剤である。接着および非接着細胞をトリプシン-EDTAでの処理後、収集し、1 ml PBSで洗浄し、2000 rpmで10分間、遠心分離した。アポトーシスの細胞とネクローシスの細胞を識別するために、ヨウ化プロピジウム(PI)と共に、アネキシンV-FITC特異的抗体を製造会社の使用説明書(Roche diagnostics)に従って、30分間適用した。その後、細胞をPBSで洗浄し、2000 rpmで10分間、遠心分離し、300 μ lのPBSに再懸濁した。その後、単一の懸濁液をMoFlo-サイトメーションアナライザー(MoFlo-cytomation analyzer)で分析した。

10

20

30

40

【0180】

TGF と対照的に、アクチビンAおよびフォリスタチンの添加は、HSCアポトーシスを誘導しなかった(図11)。

【0181】

これはTGF と比較してアクチビンAについての異なる細胞制御機構を強く示唆しており、重要な発見である。

【0182】

実施例8 短期間および長期間の肝臓傷害モデルにおける、組換えヒトフォリスタチンの非経口投与

フォリスタチンの非経口投与が肝線維症の進行を衰えさせることができかを決定するために、ラットを4週間(短期間)または8週間(長期間)のいずれかの間、CCl₄に曝した。その後、動物を最初の4週間(短期間)、または8週間目から12週間目まで(長期間)、週に3回1 μ gのフォリスタチンを同時注射し、その後屠殺した。対照動物には、同じ長さの時間CCl₄を与えた。

30

【0183】

硬変は、0.4 mg/kgの最終濃度で、四塩化炭素(CCl₄)およびオリーブ油の1:5 vol/vol混合物を週に3回、4週間(短期間モデル)または12週間(長期間モデル)のいずれかの間、注射することにより、オスのウイスターラットに引き起こされた。対照動物は、等容量のオリーブ油のみの注射を受けた。上の実施例1~実施例3において記載されているような組織構造およびmRNAおよび分析のために、全肝臓がモデルの死の時点で取り出された。さらに、全肝線維症部分の見積もりを測定するために、ヒドロキシプロリン含有量を以前に記載されているように(Bergman, I. および R. Loxley、「Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline」、Anal Chem (1963) 35:1961-1965)、測定した。簡単には、凍結した肝臓試料は重さを計り、テフロンコーティングされた試験管において110 °Cで16時間~18時間、6 N HCl中で加水分解した。試料を冷却し、40 mg ダウエックス(Dowex)(Sigma)/活性炭を各試料へ添加し、ボルテックスした。加水分解物を2枚の濾紙を通して新しい試験管へ濾過し、その後試料をpH7.4にした。その後、試料を60 °Cで25分間、イソプロパノールおよびクロラミンTとインキュベートした。室温まで冷却した後、ヒドロキシプロリン含有量は、570 nmの波長で試料の吸光度を読むことにより推定される。

40

【0184】

線維症の短期間モデルについて、組換えヒトFS-288の1 μ gをモデルの存続期間の間(4週間)、週に3回、後脚の筋肉内に注射した。線維症および硬変の長期間モデルについて、動物は、モデルの8週間目と12週間目の間、同じ経路により同じ投与量で注射された。

50

【 0 1 8 5 】

短期間モデルにおいて、フォリスタチンで処理された動物は、より体重が多く（図12）、残りの肝臓重量はより多かった（図13）。さらになお、それらは2週目で、対照より肝臓内ヒドロキシプロリン含有量が有意に少なかった（図14）。

【 0 1 8 6 】

長期間モデルにおいて、フォリスタチンで処理された動物は、体重（図15）、残りの肝臓重量（図16）、または肝臓内ヒドロキシプロリン含有量（図17）において変化を示さなかった。

【 0 1 8 7 】

これらのデータから、本発明者らは、フォリスタチンの注入が残存している肝細胞の肝機能の向上に寄与している可能性があると結論する。 10

【 0 1 8 8 】

さらになお、本発明者らは、フォリスタチンの使用が、単独または現行の通常の治療と共に、新たに診断された患者において肝臓の線維形成を減衰させるための治療剤として有益である可能性があると結論する。

【 0 1 8 9 】

さらなる治療的適用は以下を含みうる：1) 通常の治療を成功裡に完了した患者において、肝臓の再生およびコラーゲン吸収を促進すること；2) 肝臓の切除を受けた患者において肝機能を回復させ、かつ再生している肝臓の線維症を減衰させること。

【 0 1 9 0 】**実施例9 ヒトにおける研究**

Patella, S.ら、(2001)、「Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis」、J Hepatol、34(4):576-583にも報告されているが、血清アクチビンAは、正常な対照と比較して、慢性ウイルス性肝炎の患者において増加していることが実証され（図18）、他方、血清フォリスタチンは、正常なレベルのままであった（図19）。この研究は、ヒト疾患においてアクチビンAを調査した数少ない研究のうちの一つであり、いくらか詳細にヒトウイルス性肝炎を調べた唯一の研究である。 20

【 0 1 9 1 】

簡単には、-80°で保存されたアーカイブの血清は、15の正常対象、22のB型肝炎対象、および47のC型肝炎対象から分析され、肝機能試験、ウイルス学および肝臓生検は、日常的な臨床管理間で行われた。総血清アクチビンAは、以前に記載されているように（Knight, P.G.、Muttukrishna, S.、およびGroome, N.P.「Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of "total" activin-A concentrations in serum and follicular fluid.」J Endocrinol 1996; 148:267-279）、ヒト組換えアクチビンAが標準として使用される2段階サンドイッチELISAにより測定された。総血清フォリスタチンは以前に確証されている（Evans, L.W.、Muttukrishna, S.、およびGroome, N.P.「Development, validation and application of an ultra-sensitive two-site enzyme immunoassay for human follistatin.」J Endocrinol 1998; 156:275-282）、組換えモノクローナル抗体を使用する超高感度ELISAを用いて定量された。使用される標準は、国立ホルモン下垂体プログラム（National Hormone and Pituitary Program）（ロックビル、MD、米国）から得られるヒト組換えフォリスタチン288であった。アクチビンAサブユニットおよびフォリスタチンについての免疫組織化学は、実施例2に詳述されているように行われた。 30 40

【 0 1 9 2 】

HBVに感染した患者のさらなる分析により、血清アクチビンAが、ALT、肝細胞傷害、および肝臓内炎症についてのマーカーと有意に相關していることが明らかになった（図20）。HBVをもつ患者における血清アクチビンAはまた、ウイルス複製と正に相關していることが観察されたが（図21）、他方、血清フォリスタチンは負に相關していた（図22）。これは、この系における敵対する者のないアクチビンAの存在がウイルス複製に影響を及ぼすこ 50

とにより慢性肝炎感染症の病因に寄与している可能性があることを示唆しているものと思われる。

【0193】

実施例10 CHO細胞における組換えヒトフォリスタチンの発現

ヒトフォリスタチン288(FS288)遺伝子は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、ヒト卵巣cDNA(Clontech)から増幅された。954塩基対断片は、ヒトFS288遺伝子の5'末端および3'末端に相補的なプライマーを用いて作製された。この断片は、標準的技術を用いて、プラスミドpGem7zf(-)(Promega)へクローニングされた。FS288挿入断片の配列が正しいことを決定した後、FS288遺伝子は、哺乳動物発現ベクター、pDSVCのSV40初期プロモーターの後ろにサブクローニングされた。その後、組換えベクターは、リン酸カルシウム沈殿法により、哺乳動物細胞系(チャイニーズハムスター卵巣、CHO)へトランスフェクションされた。トランスフェクションされた細胞は、コロニーが現れるまで選択培地で増殖された。これらのコロニーはプールされ、マウスDHFRおよび連結されたFS288遺伝子を増幅するためのメトトレキセートを含有する選択培地(透析された5%FBSを加えた、又クレオシドを含まない-MEM)で増殖された。最高レベルのFS288を分泌するプールを選択し、希釈液を播いた。数日後、単細胞から生じたコロニーは肉眼で見えた。これらのコロニーをマルチウェルプレートの別々のウェルへ移した。各クローンから分泌されたフォリスタチンの量を測定した。一つのクローニングされた細胞系である、約8 μg FS288/ml/24時間 を分泌するcD15を選択し、~1×10⁹細胞まで増殖させた。これらの細胞は、培地(-MEM、グルコース、および5%FBS)およびマイクロキャリア粒子(Cytodex 2)を含む30リットルのブラウン(Braun)バイオリアクターに接種するのに使用された。発酵槽作業容量は、20リットル~25リットルであった。細胞は、「フィル-ドロー(fill-draw)」法を用いて発酵槽中で増殖させた。培養物を定期的に取り出し、新しい培地およびマイクロキャリア粒子に交換した。収集された培地は、5 μm、1.2 μm、および0.2 μmの濾紙を通して全量濾過(dead end filtration)により細胞から分離された。最終濾液は、10 kDaカットオフ限外濾過カートリッジ(AG technologies)での接線流動濾過により~5倍に濃縮された。細胞から分泌されたフォリスタチンを含む濃縮液は、-20°で凍結保存された。

【0194】

実施例11 組換えヒトフォリスタチン288の精製

組換えヒトFS288を含む濃縮された馴化培地を解凍し、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーにかけた。50 mM リン酸Na緩衝液(緩衝液A)でのヘパリンセファロースカラムに材料を添加し、緩衝液Aおよび緩衝液B(緩衝液A + 2 M NaCl)の勾配で溶出した。フォリスタチンを含む画分はプールされ、YM10膜を用いて濃縮された。そのプールをPBS pH 7.0でのセファクリルS-200 HR(Sephacryl S-200 HR)カラムへ添加した。フォリスタチンを含む画分は、プールかつ再び濃縮し、0.2 μmフィルターを通して無菌濾過し、-20°で保存された。最終プールにおけるフォリスタチンの濃度は、Bradford)アッセイ法およびフォリスタチン特異的ELISA(Nigel Groome)により~900 μg/mlであると推定された。純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により>90%であると推定された。

【0195】

実施例12 製剤および投与の方法

フォリスタチン、またはその類似体もしくは活性断片は、担体、アジュバント、または賦形剤を含むかまたは含まずに投与されるが、好ましくは薬学的製剤として投与される。非経口投与について、製剤は典型的には水溶液であり、フォリスタチン、その類似体、または活性断片を製剤の0.001% w/vから5% w/vまで、例えば0.01% w/vから2% w/vまでの量で含みうるが、製剤の5% w/v程度、しかし好ましくは2% w/vを超過しない、より好ましくは0.01% w/vから1% w/vを含みうる。

【0196】

経口投与について、製剤は、フォリスタチン、その類似体、または活性断片を製剤の0.001%から10%重量まで、例えば0.01%から5%重量までの量で含みうるが、製剤の10%重量

10

20

30

40

50

程度、しかし好ましくは5%重量を超過しない、より好ましくは0.1%から2%重量まで含みうる。

【0197】

局所的投与について、製剤は、フォリスタチン、その類似体または活性断片を製剤の0.005%から5%重量まで、例えば0.05%から2%重量までの量で含みうるが、製剤の5%重量くらい、しかし好ましくは2%重量を超過しない、より好ましくは0.1%から1%重量まで含みうる。

【0198】

上記に提供される本発明の記載に従って、特定の好ましい本発明の薬学的組成物を調製することができ、その例は下記に提供される。以下の特定の製剤は、単に製剤の実例となる例としてのみ解釈されるべきであり、いずれの点においても本発明の範囲の限定として解釈されるべきではない。

【0199】

実施例12(a) 局所的クリーム組成物

局所的クリームとしての送達のための典型的組成物については、以下に概説する：

フォリスタチン	0.1 g ~ 1.0 g
ヒドロキシ安息香酸メチル (Methyl hydroxybenzoate)	0.2 g
ラノリン(無水)	6.0 g
白蠟	7.5 g
ポラワックスGP 200 (Polawax GP200)	25.0 g

滅菌等張食塩水で100.0 gにする。

【0200】

ポラワックス、蜜蠟およびラノリンを共に60°で加熱し、ヒドロキシ安息香酸メチルの溶液を添加し、高速攪拌を用いて均質化させる。その後、温度を50°未満に下がるようにする。その後、フォリスタチンを添加し、充分に分散させ、組成物を緩やかな速度で攪拌しながら冷ます。

【0201】

実施例12(b) 局所的ローション組成物

局所的ローションとしての送達のための典型的組成物については、以下に概説する：

フォリスタチン	0.1 g ~ 1.0 g
ヒドロキシ安息香酸メチル	0.2 g
ソルビタンモノラウレート	1.0 g
ポリソルベート	1.0 g
セトステアリルアルコール	1.5 g
グリセリン	10.0 g

等張食塩水で100.00 mlにする。

【0202】

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびグリセリンを75°で、70 mlの等張食塩水に溶解する。

ソルビタンモノラウレート、ポリソルベート20、およびセトステアリルアルコールを共に75°で融解し、水溶液に添加する。その結果生じた乳濁液をホモジナイズし、連続的に攪拌しながら50°未満に冷まし、フォリスタチンを残りの水での懸濁液として添加する。懸濁液全体を均質化されるまで攪拌する。

【0203】

実施例12(c) 点眼組成物

点眼としての送達のための典型的組成物については、以下に概説する：

フォリスタチン	0.01 g ~ 0.1 g
ヒドロキシ安息香酸メチル	0.003 g
ヒドロキシ安息香酸プロピル	0.08 g

精製された等張食塩水で約100.00 mlにする。

【0204】

10

20

30

40

50

ヒドロキシ安息香酸メチルおよびヒドロキシ安息香酸プロピルを75で70ml等張食塩水に溶解し、その結果生じた溶液を50未満に冷ます。その後、フォリスタチンを添加し、溶液を膜フィルター(0.22μm孔サイズ)を通して濾過滅菌し、無菌的に滅菌した容器へ詰める。

【0205】

実施例12(d) 吸入投与用組成物

20ml~30mlの容量をもつエアゾール容器について：0.5%~1.0%重量のポリソルベート85またはオレイン酸のような潤滑剤と、10mg~50mgのフォリスタチンとの混合物をフレオンのような適する噴射剤中に分散させ、鼻腔内または経口のいずれかの吸入投与のための適切なエアゾール容器へ入れる。

10

【0206】

実施例12(e) 非経口投与用組成物

筋肉内注射のための本発明の薬学的組成物は、1mLの滅菌等張食塩水および0.5mg~2mgのフォリスタチンを含むように調製されうる。

【0207】

同様に、静脈内注入のための薬学的組成物は、250mlの滅菌リンガー溶液および1mg~5mgのフォリスタチンを含みうる。

【0208】

実施例12(f) カプセル組成物

カプセルの形状をとるフォリスタチンの薬学的組成物は、粉末状の0.5mg~5.0mgのフォリスタチン、180mgの乳糖、65mgのタルク、および12mgのステアリン酸マグネシウムを、標準的な2部分からなる硬質ゼラチンカプセルに詰めることにより調製されうる。

20

【0209】

実施例12(g) 注射可能な非経口組成物

注射による投与に適した形状の本発明の薬学的組成物は、0.1%重量のフォリスタチンを12%容量のプロピレン glycolel および等張食塩水に混合することにより調製されうる。溶液は濾過滅菌される。

【0210】

実施例12(h) 軟膏組成物

軟膏としての送達のための典型的な組成物は、なめらかで均質の製品を作製するように分散させた、0.1g~0.5gのフォリスタチンを100.0gとなるように含み、白色ワセリンと共に含む。

30

【0211】

実施例12(i) 降り注ぎ方式の製剤

降り注ぎ方式の製剤としての送達のための典型的な組成物については、例えばウシ用として、以下に概説するように、0.05%~0.1%重量のフォリスタチンを含む：

フォリスタチン	0.05 g ~ 0.10 g
ブチルヒドロキシトルエン	0.02 g
ブリリアントブルー FCF	0.16 g
キサンタンガム	0.4 g
ベンジルアルコール	3.0 g

40

ジエチレングルコールモノブチルエーテルで100gにする。

【0212】

動物の皮膚および/もしくは毛髪への製剤の散布において助けとなるように、ならびに/または皮膚を通しての製剤の吸収において助けとなるように、界面活性剤が製剤に含まれることが望ましい場合には、適する界面活性剤、好ましくはエコ-テリックT80(Eco-teric T80)(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート)のような陰イオン性界面活性剤が、例えば20%重量の濃度で製剤に含まれうる。

【図面の簡単な説明】

【0213】

50

【図1】免疫組織化学による正常な肝臓切片におけるアクチビンA(図1A)およびフォリスタチン(図1B)の発現を示す。

【図2】免疫組織化学による硬変の肝臓切片におけるアクチビン発現を示す。

【図3】アクチビンAおよび-平滑筋アクチンの発現を示すラット肝臓切片の共焦点顕微鏡検査を示す。

【図4】免疫組織化学による線維症動物の肝臓切片におけるフォリスタチン発現を示す。

【図5】 CCl_4 ラット肝臓傷害のモデルの間の全肝臓抽出物におけるアクチビンAおよびフォリスタチンの両方のmRNAの発現を示す。

【図6】HSC増殖および細胞外マトリックス(ECM)生成の他の重要なマーカーに関連してアクチビンAおよびフォリスタチンの発現パターンを測定するために、インビトロで分化転換した時、新鮮に単離された肝星細胞(HSC)についてのリアルタイムPCR分析を示す。 10

【図7】活性化表現型に転換した時のHSCの一次培養によるアクチビンAタンパク質の分泌を示す。

【図8】HSC培養物からのアクチビンA含有上清の添加後、MPC-11細胞の増殖における減少(^3H チミジン取り込み、1分あたりの計数)を示す。

【図9】新鮮に単離されたHSC増殖(対照と比較した%増殖対添加された外因性介在物質の濃度)への様々な外因性介在物質の影響を示す:図9Aは、外因性介在物質としてアクチビンについての結果を示す;図9Bは、外因性介在物質としてトランスフォーミング成長因子(TGF)についての結果を示す;図9Cは、外因性介在物質としてフォリスタチンについての結果を示す;図9Dは、外因性介在物質として血小板由来成長因子(PDGF)についての結果を示す。 20

【図10】活性化/分化転換化HSC増殖(対照と比較した%増殖対添加された外因性媒介物質の濃度)への様々な外因性介在物質の影響を示す:図10Aは、外因性介在物質としてアクチビンについての結果を示す;図10Bは、外因性介在物質としてトランスフォーミング成長因子(TGF)についての結果を示す;図10Cは、外因性介在物質としてフォリスタチンについての結果を示す;図10Dは、外因性介在物質として血小板由来成長因子(PDGF)についての結果を示す。

【図11】活性化HSCの培養物に様々な量のアクチビンA、フォリスタチンおよびTGFへの曝露の、細胞生存度(アネキシンV、細胞のアポトーシスの初期マーカー、の発現についてフローサイトメトリーにより評価される)への影響を示す。 30

【図12】4週間 CCl_4 に曝され、その後最初の4週間は週に3回、1 μg のフォリスタチンを同時注射され、その後屠殺されたラットと比較した、対照ラットの体重における変化を示す。対照動物には、同じ長さの期間 CCl_4 を与えた。

【図13】図12について記載された同じ実験条件に関して、残りの肝臓重量を示す。

【図14】図12について記載された同じ実験条件に関して、肝臓内ヒドロキシプロリン含有量を示す。

【図15】8週間 CCl_4 に曝され、その後8週間目から12週間目まで、週に3回、1 μg のフォリスタチンを同時注射され、その後屠殺されたラットと比較した、対照ラットの体重における変化を示す。対照動物には、同じ長さの期間 CCl_4 を与えた。

【図16】図15について記載された同じ実験条件に関して、残りの肝臓重量を示す。 40

【図17】図15について記載された同じ実験条件に関して、肝臓内ヒドロキシプロリン含有量を示す。

【図18】慢性ウイルス性肝炎に罹患しているヒト対象および正常な対照における血清アクチビンAを示す。

【図19】慢性ウイルス性肝炎に罹患しているヒト対象および正常な対照における血清フォリスタチンを示す。

【図20】B型肝炎(HBV)の患者における血清アクチビンAの、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT、肝細胞傷害および肝臓内傷害についてのマーカー)との相関を示す。

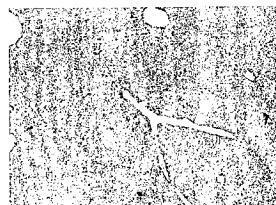
【図21】HBVの患者における血清アクチビンAとウイルスの複製(血清HBV、 pg/mL として 50

アッセイされる)の相関を示す。

【図2】HBVの患者における血清フォリスタチンとウイルスの複製(血清HBV、pg/mLとしてアッセイされる)の負の相関を示す。

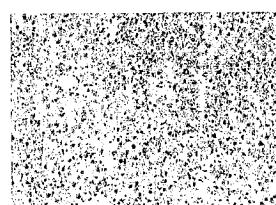
【図1】

A

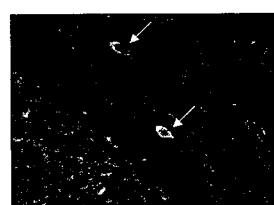


【図2】

B



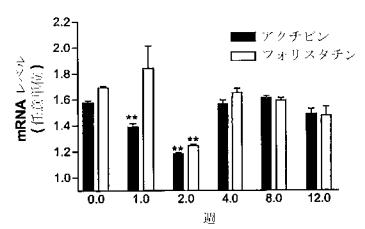
【図3】



【図4】

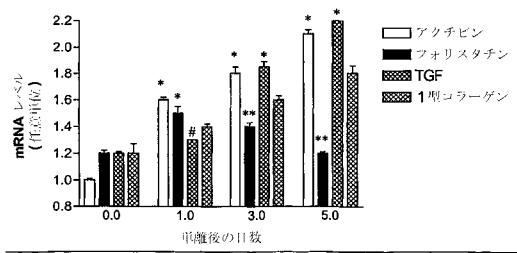


【図5】



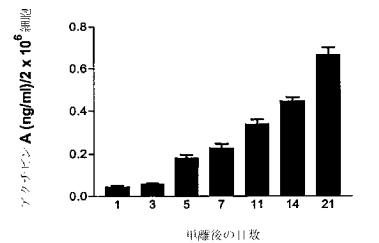
** p < 0.01 第0調と比較

【図6】

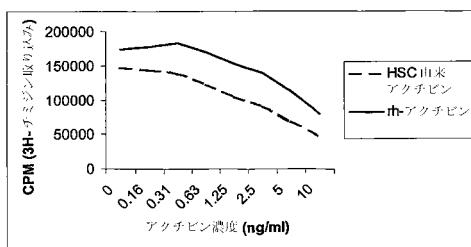


* p < 0.01 0日目と比較; 同じ都
** p < 0.01 開始する時点におけるアクチビンAとFS;
p < 0.05 アクチビンA対 TGF

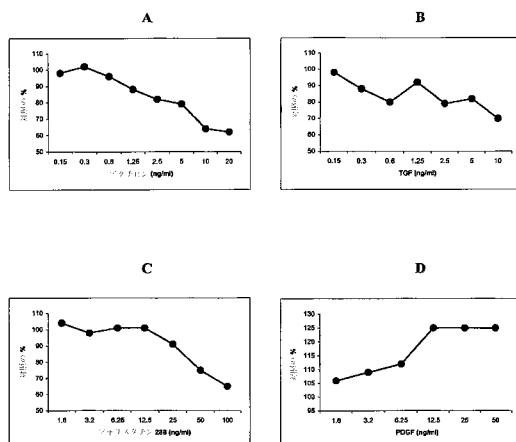
【図7】



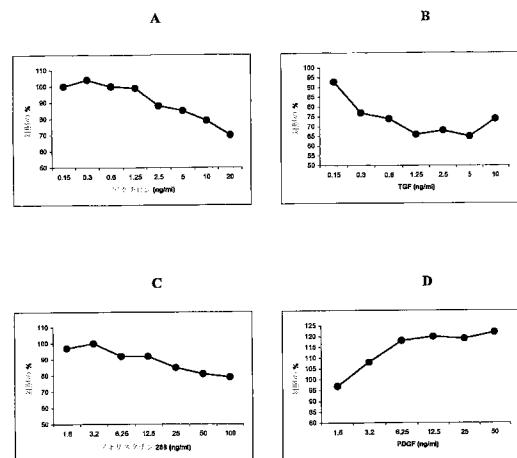
【図8】



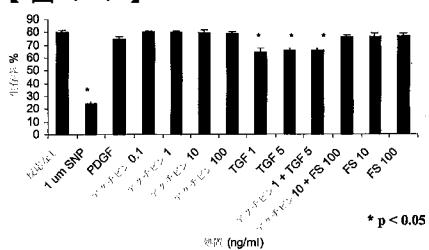
【図9】



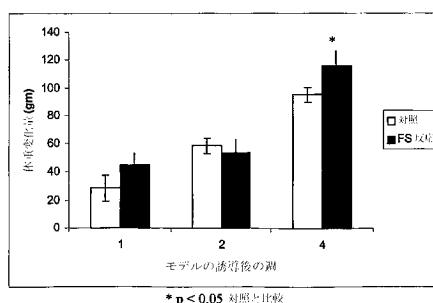
【図10】



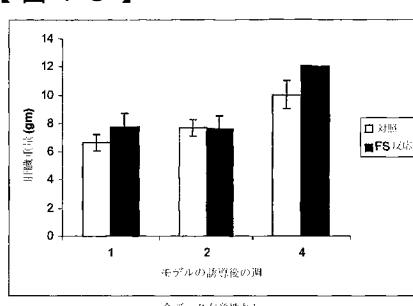
【図11】



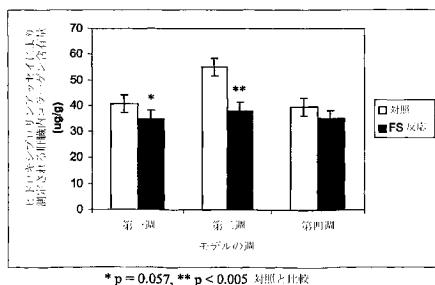
【図12】



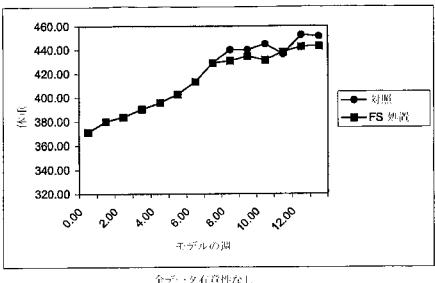
【図13】



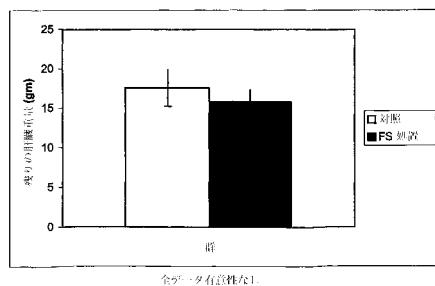
【図14】



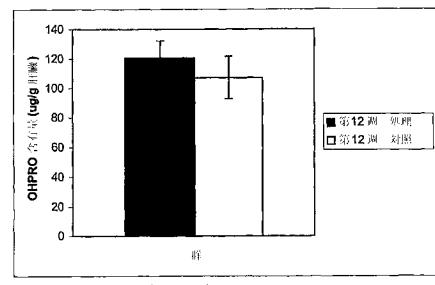
【図15】



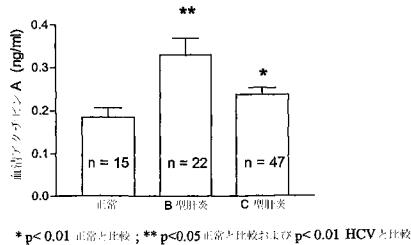
【図16】



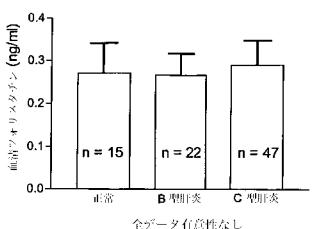
【図17】



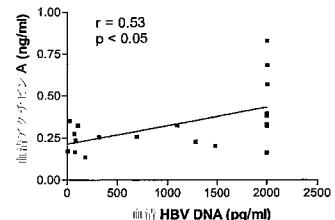
【図18】



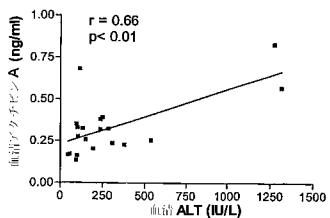
【図19】



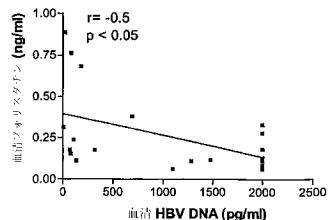
【図21】



【図20】



【図22】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/006057 A1(51) International Patent Classification⁵: A61K 39/395,
38/17, 48/00, 31/4174, A61P 43/00[AU/AU]; Centre for Heart and Chest Research, Monash
University, Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU).
FENNESSY, Paul [AU/AU]; Centre for Clinical Effectiveness,
Monash University, Wellington Road, Clayton,
VIC 3800 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU02/00945

(22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PR 6381 13 July 2001 (13.07.2001) AU(71) Applicants (for all designated States except US): **BIOA
PTY LIMITED** [AU/AU]; Level 1, 378 Victoria Road,
Rydalmere, NSW 2116 (AU). **MONASH UNIVERSITY**
[AU/AU]; Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **PHILLIPS, David**
[AU/AU]; C/O Monash Institute of Reproduction and
Development, nt. 27-31 Wright Street, Clayton, VIC 3168
(AU). **DE KRESTER, David** [AU/AU]; Monash Medical
Centre, 246 Clayton Road, Clayton, VIC 3168 (AU).
SEIVERT, William [AU/AU]; Department of Medicine,
Monash Medical Centre, 246 Clayton Road, Clayton, VIC
3168 (AU). **PATELLA, Shane** [AU/AU]; Department of
Medicine, Monash University, Wellington Road, Clayton,
VIC 3800 (AU). **SMOLICH, Joseph** [AU/AU]; Centre
for Heart and Chest Research, Monash University, Wellington
Road, Clayton, VIC 3800 (AU). **MCGAW, David**(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GH,
GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SL, SG,
SI, SK, SI, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CL, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FL, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NU, SN, TD, TG).**Published:**
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/006057 A1

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR THE TREATMENT OF DISEASE:

(55) Abstract: The present invention relates to pharmaceutical compositions for the treatment and/or prophylaxis of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said composition comprising at least one activin antagonist, and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or diluent. The invention also relates to methods of treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate, as well as methods for diagnosing such conditions, and kits therefor.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

Composition and Method for the Treatment of Disease**Technical Field**

The present invention relates to the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate via the administration of a therapeutically effective amount of an activin antagonist.

Background Art

A number of serious diseases of mammals, including humans, are associated with fibrosis. Such diseases include cirrhosis of the liver, pulmonary fibrosis, and inflammatory bowel disease such as Crohn's disease.

10 Cirrhosis of the liver is a progressive disease of the liver characterised by diffuse damage to hepatic parenchymal cells with nodular regeneration, fibrosis and disturbance of normal architecture. It is associated with failure of hepatic cell function and interference with blood flow and can lead to total hepatic failure and hepatocellular carcinoma (HCC). There are a number of agents that cause hepatocellular injury including alcohol, the hepatitis viruses, various drugs and iron overload (Haemochromatosis) amongst others. Exposure to these agents promotes a cascade of events that, given repeated exposure, can result in the development of chronic disease including progressive fibrosis and cirrhosis.

20 Interstitial lung disease (ILD) is a term that includes a variety of chronic lung disorders. ILD is also referred to as interstitial pulmonary fibrosis or pulmonary fibrosis. The lung is usually damaged in some way, resulting in inflammation in the walls of the air sacs (alveolitis), in the walls of the bronchioles (bronchiolitis) or in the capillaries (vasculitis). Scarring (or fibrosis) then begins and the lung loses its elasticity. Fibrosis results in permanent loss of the lung tissue's ability to transport oxygen.

25 There is also a group of chronic lung diseases called idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) which are of an unknown origin.

30 Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic disorders that cause inflammation or ulceration in the small and large intestines. Most often IBD is classified as ulcerative colitis or Crohn's Disease but may be referred to as colitis, enteritis, ileitis, and proctitis. Ulcerative colitis causes ulceration and inflammation of the inner lining of the colon and rectum, while Crohn's Disease is an inflammation that extends into the deeper layers of the intestinal wall. The intestine wall is thickened and at first is pliable, but as fibrosis occurs the wall becomes stiff with luminal narrowing and occasional

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

2

stenosis. Crohn's Disease also may affect other parts of the digestive tract, including the mouth, oesophagus, stomach, and small intestine.

New antifibrotic treatments to prevent development of, or cure fibrosis-associated conditions, such as those identified above, are needed as these conditions are major causes of death and/or loss of quality of life and increased burden on medical systems.

It is now disclosed herein that activin antagonists may be used as agents for treatment and/or prevention of fibrosis, and associated diseases.

Accordingly, the present invention describes a role for activin antagonists that will be useful for the treatment and/or prevention of disease associated with fibrosis.

Therefore, the present invention provides a useful therapeutic in the treatment of disease associated with fibrosis, in the form of activin antagonists. Typically the activin antagonist is follistatin, or a fragment(s) or analogue thereof.

Disclosure of the Invention

The present invention relates to the finding that activin antagonists, particularly the protein follistatin, or a fragment(s) or analogue thereof, are useful therapeutics for the treatment and/or prophylaxis of disease associated with fibrosis. Typically, fibrosis may involve abnormally elevated expression of the hormone activin A. The results disclosed herein support the position that administration of an activin antagonist, particularly follistatin or a fragment(s) or analogue thereof, inhibits the hyperproliferation associated with the hormone activin.

1. Therapeutic/Pharmaceutical Compositions for Treatment and/or Prophylaxis of Disease

According to a first embodiment of the invention, there is provided a pharmaceutical composition for the treatment and/or prophylaxis of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said composition comprising at least one activin antagonist, and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or diluent.

According to a second embodiment of the invention, there is provided a process for preparing a pharmaceutical composition as defined in the first embodiment of the invention, wherein said process comprises homogeneously mixing at least one activin antagonist with a pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or diluent.

Typically, the vertebrate is selected from the group consisting of human, non-human primate, mice, cattle, sheep, goats, horses, rabbits, birds, cats and dogs. More

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

3

typically, the vertebrate is human, non-human primate or mouse. Even more typically, the vertebrate is human.

2. Treatment of Disease using Follistatin

According to a third embodiment of the invention, there is provided a method for 5 the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment, wherein said method comprises administering to said vertebrate, a therapeutically effective amount of at least one activin antagonist.

According to a fourth embodiment of the invention, there is provided at least one 10 activin antagonist when used in the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment.

According to a fifth embodiment of the invention, there is provided use of at least one activin antagonist for the preparation of a medicament for the treatment of disease 15 associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment.

Typically, for the purposes of any one of the third through to fifth embodiments of 15 the invention, the activin antagonist is typically follistatin, or a fragment(s) or analogue thereof, as herein described.

According to a sixth embodiment of the invention, there is provided a method for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment, wherein said method comprises administering to said vertebrate, a therapeutically 20 effective amount of the pharmaceutical composition as defined in the first embodiment of the invention.

According to a seventh embodiment of the invention, there is provided a pharmaceutical composition as defined in the first embodiment of the invention, when used in the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said 25 treatment.

According to an eighth embodiment of the invention, there is provided use of the pharmaceutical composition as defined in the first embodiment of the invention for the preparation of a medicament for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment.

According to one preferred aspect, the disease associated with fibrosis is a 30 hyperproliferative or inflammatory fibrotic diseases.

According to another preferred aspect, the disease associated with fibrosis is a pulmonary fibrosis, such as idiopathic pulmonary fibrosis or an interstitial lung disease.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

4

According to another preferred aspect, the disease associated with fibrosis is an inflammatory bowel disease, or a related condition such as ulcerative colitis or Crohn's Disease.

According to another preferred aspect, the disease associated with fibrosis is liver fibrosis and cirrhosis.

Typically, the treatment of disease associated with fibrosis through the administration of a therapeutically effective amount of an activin antagonist is undertaken in conjunction with other treatments of disease. For example, these other treatments may include: surgery, radiation treatment, or chemotherapy. For instance, the chemotherapy may involve the administration of anti-fibrotic, anti-thrombotic or anti-inflammatory drugs.

Typically, for the purposes of any one of the third through to eighth embodiments of the invention, one skilled in the art would be able, by routine experimentation, to determine what an effective, non-toxic amount of an activin antagonist would be for the purpose of treating the disease.

Typically, for the purposes of the first through to eighth embodiments, the activin antagonist is follistatin, or a fragment(s) or analogue thereof, and more typically the follistatin is a single chain protein comprising between 288 and 315 amino acids with a molecular weight of between about 30,000 and 60,000 Daltons as estimated by SDS-PAGE in the absence of reducing agents, derived from follicular fluid and able to inhibit the secretion of follicle-stimulating hormone (FSH). More typically follistatin is a single chain protein classified as NCBI (National Center for Biotechnology Information) protein XP_003891, AAH04107. Even more typically, follistatin is as described in Australian Patent No 610858. Still more typically, follistatin is as described in Australian Patent No. 620346 or United States Patent No. US5,470,826 or European Patent No. EP 0 299 050, the disclosures of which are incorporated herein by reference.

Typically, the follistatin or a fragment(s) or analogue present in the pharmaceutical composition may also exist in a form selected from the group consisting of: follistatin/chelate, follistatin/drug, follistatin/prodrug, follistatin/toxin and follistatin/detector group and follistatin/imaging marker.

The activin antagonist may also be follistatin-related protein (for example, see Genbank accession number NP_005851).

Alternatively, the activin antagonist may be an antibody raised against activin.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

5

Typically, the activin to which the antibody is raised is activin A, activin AB or activin B. More typically, the activin to which the antibody is raised is a heterodimer or homodimer of mature inhibin β A or β B chains free of inhibin α chain. The two subunits comprise between 110 and 120 amino acids with molecular weights of about 12,000 -
5 13,000 Daltons as estimated by SDS-PAGE in the absence of reducing agents. More typically activin contains β A subunit with sequence defined in GenBank accession number M13436 and/or β B subunit with sequence defined in GenBank accession number M13437. Still more typically, activin is as described in Australian Patent No. AU 596178
10 or United States Patent No. 4,973,577 or 4,798,885 or European Patent No. EP 0 222 491, the disclosures of which are incorporated herein by reference.

In another alternative aspect, the activin antagonist may be a compound which interferes with activin binding to its respective receptor.

Typically, such a compound is an antibody raised against the activin receptor. More typically, the activin receptor to which the antibody is raised is ActRIIA or ActRIIB
15 or ActRLA or ActRIB or ALK2 or ALK4 (DKM: note ALK2 and ALK4 are alternative nomenclatures for ActRIA and ActRIB respectively).

More typically, the compound is an antibody raised against any one of the following receptors: activin A, activin AB and activin B receptors.

Alternatively, the activin antagonist may be a molecule that interferes with any of
20 the other downstream components of activin signal transduction pathway, such as the inhibitory Smad signalling molecules, Smad6 and 7.

According to yet another aspect, the activin antagonist may be a molecule that specifically inhibits TGF β /activin type I receptors. Typically such molecules may be selected from triarylimidazole analogues. More typically such triarylimidazole analogues
25 are as described in Callahan, J.F., et al (2002), "Identification of novel Inhibitors of the Transforming Growth Factor β -1 (TGF- β 1) Type I Receptor (ALK5)", *J. Med. Chem.* 45: 999-1001. Even more typically the triarylimidazole analogue is compound 14 described in Callahan, J.F., et al (2002), *J. Med. Chem.* 45: 999-1001 which is also described as SB-431542 in Inman, G.J. et al (2002), "SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of
30 Transforming Growth Factor- β Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7", *Molecular Pharmacology* 62(1): 65-74.

3. Diagnosis of Disease.

According to a ninth embodiment of the invention, there is provided a method for screening for a disease associated with fibrosis in a vertebrate comprising:

- (a) contacting a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against an activin polypeptide (or fragment or analogue thereof);
- 5 (b) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the activin polypeptide; and
- (c) comparing the amount of bound antibody to the amount bound in a reference sample, and diagnosing a disease associated with fibrosis in said vertebrate, wherein a
10 change in the amount of bound antibody in the sample compared to the reference sample is indicative of disease.

According to a tenth embodiment of the invention, there is provided a method for screening for a disease associated with fibrosis in a vertebrate comprising:

- (a) contacting a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against a follistatin polypeptide (or fragment or analogue thereof);
- 15 (b) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the follistatin polypeptide; and
- (c) comparing the amount of bound antibody to the amount bound in a reference sample, and diagnosing a disease associated with fibrosis in said vertebrate, wherein a
20 change in the amount of bound antibody in the sample compared to the reference sample is indicative of disease.

According to an eleventh embodiment of the invention, there is provided a method for screening for a disease associated with fibrosis in a vertebrate comprising:

- (a) contacting a first aliquot of a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against an activin polypeptide (or fragment or analogue thereof);
- 25 (b) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the activin polypeptide; and
- (c) contacting a second aliquot of a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against a follistatin polypeptide (or fragment or analogue thereof);
- 30 (d) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the follistatin polypeptide; and
- (e) comparing the amount of activin-bound antibody to the amount of follistatin-bound antibody, and comparing the relative difference to that found in a reference sample,

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

7

and diagnosing a disease associated with fibrosis in said vertebrate, wherein a change in the relative ratio of activin- and follistatin-bound antibody in the sample compared to the reference sample is indicative of disease.

Typically, for the purposes of the ninth to eleventh embodiments, the reference sample is obtained from a vertebrate not suffering from a disease associated with fibrosis.

Typically, for the purposes of the ninth to eleventh embodiments, the sample within which the method of screening is performed is a plasma or tissue sample, and involves standard histological and immunohistochemical techniques.

Typically, for the purposes of the ninth or eleventh embodiments, the activin to which the antibody is raised is as described previously herein.

Typically, for the purposes of the tenth or eleventh embodiments, the follistatin to which the antibody is raised is as described previously herein.

Typically, as described herein, the activin or follistatin antibody may be a whole antibody, or an antibody fragment, or other immunologically active fragments thereof, such as complementarity determining regions. More typically, the antibody fragment has functional antigen-binding domains, that is, heavy and light chain variable domains. Even more typically, the antibody fragment exists in a form selected from the group consisting of: Fv, F_{ab}, F(ab)₂, scFv (single chain Fv), dAb (single domain antibody), bi-specific antibodies, diabodies and triabodies.

Typically, the antibody (or fragment thereof) is a polyclonal or monoclonal antibody. More typically, the antibody (or fragment thereof) is a monoclonal antibody. Even more typically, the monoclonal antibody is generated using molecular genetic, hybridoma or EBV (Epstein-Barr virus) transformation technology.

According to a twelfth embodiment of the invention, there is provided a diagnostic kit for the detection of a disease associated with fibrosis in a vertebrate, said kit comprising at least an antibody (or fragment thereof) raised against activin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent.

According to a thirteenth embodiment of the invention, there is provided a diagnostic kit for the detection of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said kit comprising at least an antibody (or fragment thereof) raised against follistatin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent.

Typically, the kit according to the twelfth or thirteenth embodiments may comprise the following containers:

- (a) a first container containing at least the antibody (or fragment thereof), and;

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

8

(b) a second container containing a conjugate comprising a binding partner of the antibody (or fragment thereof), together with a detectable label.

According to a fourteenth embodiment of the invention, there is provided a diagnostic kit for the detection of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said kit comprising at least: an antibody (or fragment thereof) raised against follistatin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent; and an antibody (or fragment thereof) raised against activin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent.

Typically, the kit according to the fourteenth embodiment may comprise the following containers:

- (a) a first container containing at least an activin antibody (or fragment thereof), and;
- (b) a second container containing at least a follistatin antibody (or fragment thereof);
- (c) a third container containing a conjugate comprising a binding partner of the activin antibody (or fragment thereof), together with a detectable label, and
- (d) a fourth container containing a conjugate comprising a binding partner of the follistatin antibody (or fragment thereof), together with a detectable label.

More typically, for the purposes of any one of the twelfth to fourteenth embodiments, the kit may further comprise one or more other containers, containing other components, such as wash reagents, and other reagents capable of detecting the presence of bound antibodies. Even more typically, the detection reagents may include labelled (secondary) antibodies or, where the antibody (or fragment thereof) raised against activin and/or follistatin (or fragment thereof) is itself labelled, the compartments may comprise antibody binding reagents capable of reacting with the labelled antibody (or fragment thereof) of the present invention.

4. Gene Therapy

According to a fifteenth embodiment of the invention, there is provided a method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate, wherein said method comprises:

- (a) inserting a nucleic acid molecule encoding for an activin antagonist, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic acid molecule encoding for an activin antagonist or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell;

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

9

(b) expressing the nucleic acid molecule in the transformed cell.

Typically, the activin antagonist is follistatin or fragment(s) or analogue thereof.

According to a sixteenth embodiment of the invention, there is provided a method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate, 5 wherein said method comprises:

(a) inserting a nucleic acid molecule which is antisense for a fragment of a nucleic acid molecule encoding for activin, an activin receptor, or other activin-associated transduction pathway molecule, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic acid molecule antisense for a nucleic acid molecule encoding for activin or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell. 10

(b) expressing the nucleic acid molecule in the transformed cell; and

wherein the expressed antisense nucleic acid molecule binds to the complementary nucleic acid molecules encoding activin, activin receptor or other activin-associated transduction pathway molecule thereby inhibiting the transcription or expression thereof. 15

Typically, the antisense nucleic acid molecule is selected from the following:

a nucleic acid molecule that is antisense for at least a portion of the nucleic acid sequence encoding activin A, activin AB or activin AB;

a nucleic acid molecule that is antisense for at least a portion of the nucleic acid sequence encoding an activin receptor selected from ActRIIA or ActRIIB or ActRIA or 20 ActRIB or ALK 2 or ALKA;

a nucleic acid molecule that is antisense for at least a portion of the nucleic acid sequence encoding smad 2 or smad 3.

According to a seventeenth embodiment of the invention, there is provided a method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis in a 25 vertebrate, wherein said method comprises:

inserting a nucleic acid molecule which is mutated form of a nucleic acid molecule encoding for activin, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic acid molecule which is a mutated form of the nucleic acid molecule encoding for activin or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell;

30 wherein the mutated activin-encoding nucleic acid molecule integrates into the host cell's native activin-encoding sequence by homologous recombination, thereby resulting in either no or incorrect transcription of the activin sequence, or expression of a mutated activin which does not bind to native activin receptors or interferes with normal activin-signalling.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

10

According to an eighteenth embodiment of the invention, there is provided a method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate, wherein said method comprises:

- inserting a nucleic acid molecule which is a mutated form of a nucleic acid molecule encoding for an activin receptor, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic acid molecule which is a mutated form of the nucleic acid molecule encoding for an activin receptor or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell;
- wherein the mutated form of the nucleic acid molecule encoding for an activin receptor or a fragment(s) or analogue thereof integrates into the host cell's native activin receptor-encoding sequence by homologous recombination, thereby resulting in either no or incorrect transcription of the activin receptor sequence, or expression of a mutated activin receptor which does not bind the native activin or interferes with activin-signalling.

Typically the activin-encoding sequence is a polynucleotide as defined in GenBank entry, accession number M13436 and/or M13437.

Typically the activin receptor-encoding sequence is a polynucleotide encoding one of the following receptors: ActRIIA or ActRIIB or ActRIA or ActRIB or ALK2 or ALK4.

Typically, for the purposes of any one of the fifteenth to eighteenth embodiments, the nucleic acid molecule or vector is inserted using methods selected from the group consisting of: microinjection, CaPO₄ precipitation, electroporation, lipofection/liposome fusion, particle bombardment and coupling the nucleic acid to chemically modified proteins.

Typically the nucleic acid molecule or vector is inserted into the nucleus of a host cell.

Typically, an expression vector containing the nucleic acid molecule is inserted into cells, the cells are grown *in vitro* and then infused in large numbers into patients. More typically, expression vectors derived from viruses such as adenovirus, adeno-associated virus, vaccinia virus, herpes viruses, several RNA viruses, retroviruses, or bovine papilloma virus, may be used for delivery of the nucleic acid into the targeted cell(s).

More typically, the targeted cell(s) comprise fibroblast lineages eg hepatic stellate cells, or smooth muscle cells, lung fibroblasts, myofibroblasts, kidney cells.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

11

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows expression of activin A (Fig. 1A) and follistatin (Fig. 1B) in normal liver section by immunohistochemistry.

Figure 2 shows activin expression in cirrhotic liver section by immunohistochemistry.

Figure 3 shows confocal microscopy of rat liver sections showing activin A and alpha-smooth muscle actin expression.

Figure 4 shows follistatin expression in fibrotic animal liver section by immunohistochemistry.

Figure 5 shows expression of both activin A and follistatin mRNA in whole liver extracts during model of CCl₄ rat liver injury.

Figure 6 shows real time PCR analysis on freshly isolated hepatic stellate cells (HSCs) as they transdifferentiated *in vitro* to determine the expression pattern of activin A and follistatin in relation to other key markers of HSC proliferation and extracellular matrix (ECM) production.

Figure 7 shows secretion of activin A protein by primary cultures of HSCs as they transformed to the activated phenotype.

Figure 8 shows the decrease in proliferation of MPC-11 cells (counts per minute, ³H thymidine incorporation) after addition of activin A-containing supernatants from HSC cultures.

Figure 9 shows the effect of various exogenous mediators on freshly isolated HSC proliferation (% proliferation as compared to control vs concentration of added exogenous mediator): Fig. 9A shows results for activin as exogenous mediator; Fig. 9B shows results for transforming growth factor β (TGF) as exogenous mediator; Fig. 9C shows results for follistatin as exogenous mediator; Fig. 9D shows results for platelet derived growth factor (PDGF) as exogenous mediator.

Figure 10 shows the effect of various exogenous mediators on activated/transdifferentiated HSC proliferation (% proliferation as compared to control vs concentration of added exogenous mediator): Fig. 10A shows results for activin as exogenous mediator; Fig. 10B shows results for transforming growth factor β (TGF) as exogenous mediator; Fig. 10C shows results for follistatin as exogenous mediator; Fig. 10D shows results for platelet derived growth factor (PDGF) as exogenous mediator.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

12

Figure 11 shows the effect of exposure to varying quantities of activin A, follistatin and TGF β to cultures of activated HSC's on cell viability (assessed by flow cytometry for the expression of annexin V, an early marker of cellular apoptosis).

Figure 12 shows change in body weight of control rats compared to rats exposed to CCl₄ for 4 weeks and then co-injected with 1 μ g of follistatin 3 times a week for the first 4 weeks and then sacrificed. Control animals received CCl₄ for the same length of time.

Figure 13 shows remnant liver weight for the same experimental conditions described for Figure 12.

Figure 14 shows intrahepatic hydroxyproline content for the same experimental conditions described for Figure 12.

Figure 15 shows change in body weight of control rats compared to rats exposed to CCl₄ for 8 weeks and then co-injected with 1 μ g of follistatin 3 times a week from weeks 8-12 and then sacrificed. Control animals received CCl₄ for the same length of time.

Figure 16 shows remnant liver weight for the same experimental conditions described for Figure 15.

Figure 17 shows intrahepatic hydroxyproline content for the same experimental conditions described for Figure 15.

Figure 18 shows serum activin A in human subjects with chronic viral hepatitis and normal controls.

Figure 19 shows serum follistatin in human subjects with chronic viral hepatitis and normal controls.

Figure 20 shows correlation of serum activin A in patients with hepatitis B (HBV) with serum alanine aminotransferase (ALT, a marker for hepatocyte injury and intrahepatic injury).

Figure 21 shows Correlation of serum activin A in patients with HBV and viral replication (assayed as serum HBV, pg/mL).

Figure 22 shows negative correlation of serum follistatin in patients with HBV and viral replication (assayed as serum HBV, pg/mL).

Definitions

The term "activin antagonist" encompasses molecules that inhibit activin activity. The term includes molecules that bind to activin and molecules that antagonise activin by binding to the activin receptor (type I or II) to block downstream signalling. For example, molecules that inhibit activin activity by binding to activin include follistatin, follistatin-

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

13

related protein (Genbank accession number NP_005851), and alpha-2 macroglobulin, and molecules that antagonise activin by binding to the activin receptor (type I or II) to block downstream signalling include inhibin. "Activin antagonists" may also include: molecules that interfere with any of the other downstream components of activin signal transduction pathway, such as the inhibitory Smad signalling molecules, Smad6 and 7; dominant negative mutants of the activin receptor (eg BAMBI) which if expressed in a cell will interfere with that cell's activin signal transduction pathway; molecules that specifically inhibit TGF β /activin type I receptors such as triarylimidazole analogues as are described in Callahan, J.F., et al (2002), "Identification of novel Inhibitors of the Transforming Growth Factor β -1 (TGF- β 1) Type I Receptor (ALK5)", *J. Med. Chem.* **45**: 999-1001.

The term "nucleic acid" encompasses single or double-stranded deoxyribonucleotide (DNA) and/or ribonucleotide (RNA) nucleic acid, including all known analogues of natural nucleotides.

The term "polynucleotide" encompasses single or double-stranded deoxyribopolynucleotide and/or ribopolynucleotide, including all known analogues of natural nucleotides. It also includes within its scope the relevant sequence as specified, together with the sequence complementary thereto.

As used herein the term "polypeptide" refers to a polymer made up of a plurality of amino acids linked together by peptide bonds.

The term "antibody" refers to an immunoglobulin molecule able to bind to a specific epitope on an antigen, and which may be comprised of a polyclonal mixture, or be monoclonal in nature. Antibodies may be entire immunoglobulins derived from natural sources, or from recombinant sources. An antibody according to the present invention may exist in a variety of forms including, for example, whole antibody, an antibody fragment, or another immunologically active fragment thereof, such as a complementarity determining region. Similarly, the antibody may be an antibody fragment having functional antigen-binding domains, that is, heavy and light chain variable domains. The antibody fragment may also exist in a form selected from the group consisting of: Fv, F_{ab}, F(ab)₂, scFv (single chain Fv), dAb (single domain antibody), bi-specific antibodies, diabodies and triabodies.

The term "antisense" pertaining to nucleic acid molecules, as referred to herein, means an artificial oligo- or polynucleotide molecule which is complementary to a target

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

14

polypeptide encoding nucleotide sequence. The antisense nucleic acid molecule may be transcribed in a cell, and is capable of hybridising to the polypeptide-encoding mRNA produced in the cell. On the basis that the reaction occurs under conditions allowing the complementary antisense nucleotide sequence to hybridise to the polypeptide mRNA, the amount of polypeptide translated is thus altered, that is, reduced or eliminated.

5 A "therapeutically effective amount", as referred to herein, includes a sufficient, but non-toxic amount of a compound or composition of the invention to provide the desired therapeutic effect. The "effective amount" will vary from subject to subject depending on one or more of a number of factors amongst, for example, the particular agent being administered, the severity of the condition being treated, the species being treated, the age and general condition of the subject and the mode of administration. For any given case, an appropriate "effective amount" may be determined by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation. Typically, "therapeutically effective amount" refers to an amount sufficient to result in one or more of the following: recession/reduction in 10 the extent of the disease, inhibition of disease growth or progression, cessation of disease growth, relief of disease-imposed discomfort, or prolongation of life of the vertebrate having the disease.

The term "isolated" indicates that the material in question has been removed from its naturally existing environment, and associated impurities reduced or eliminated. 15 Essentially, the 'isolated' material is enriched with respect to other materials extracted from the same source (ie., on a molar basis it is more abundant than any other of the individual species extracted from a given source), and preferably a substantially purified fraction is a composition wherein the 'isolated' material comprises at least about 30 percent (on a molar basis) of all macromolecular species present. Generally, a 20 substantially pure composition of the material will comprise more than about 80 to 90 percent of the total of macromolecular species present in the composition. Most preferably, the 'isolated' material is purified to essential homogeneity (contaminant species cannot be detected in the composition by conventional detection methods) 25 wherein the composition consists essentially of the subject macromolecular species.

30 "Conservative amino acid substitutions" refer to the interchangeability of residues having similar side chains. For example, a group of amino acids having aliphatic side chains includes glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; a group of amino acids having aliphatic-hydroxyl side chains includes serine and threonine; a group of amino acids having amide-containing side chains includes asparagine and glutamine; a group of

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

15

amino acids having aromatic side chains includes phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; a group of amino acids having basic side chains includes lysine, arginine, and histidine; and a group of amino acids having sulfur-containing side chains includes cysteine and methionine. Typically, conservative amino acids substitution groups are:
5 valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, and asparagine-glutamine.

The term "fragment" of a compound, with reference to polypeptides, is a compound having qualitative biological activity in common with for example, a full-length polypeptide from which it is derivable.

10 With reference to nucleic acids, nucleotides and/or polynucleotides, the term "fragment" relates to compounds including, for example: portions of a target nucleic acid sequence which encode a product having qualitative biological activity in common with for example, a full-length polypeptide derivable from the full length nucleic acid sequence; or fragments of a target nucleic acid sequence which are suitable as specific
15 probes or PCR primers for the detection and/or amplification of the target nucleic acid sequence, or a functional product-encoding portion thereof.

20 The term "analogue" as used herein with reference to a nucleic acid sequence means a sequence which is a derivative of a target nucleic acid sequence, the derivative comprising addition, deletion, or substitution (including conservative amino acid substitutions) of one or more bases and wherein the encoded polypeptide retains substantially the same function as the polypeptide encoded by the target nucleic acid molecule. Similarly, the term "analogue" as used herein refers to a derivative of a target polypeptide comprising addition, deletion, or substitution of one or more amino acids, the analogue retaining, however, substantially the same function as the target polypeptide.

25 The term "expression cassette" refers to a nucleic acid construct comprising the necessary nucleic acid elements (promoters, enhancers, the nucleic acid to be transcribed, etc) which permit the transcription of the particular nucleic acid in a host cell. The expression construct can be incorporated into a vector, host chromosome etc.

30 The term "promoter" refers to nucleic acid sequences that influence and/or promote initiation of transcription.

The term "operably linked" refers to the situation wherein, for example, a nucleic acid is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, a promoter operably linked to a heterologous DNA, which encodes a protein, promotes the production of functional mRNA corresponding to the heterologous DNA.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

16

As used herein "gene transfer" means the process of introducing foreign genetic material into a cell, and is commonly performed to enable the expression of a particular product encoded by the gene. The product may include a protein, polypeptide, anti-sense DNA or RNA, or enzymatically active RNA. Gene transfer can be performed in cultured cells or by direct administration into animals, and generally involves the process of contacting a target cell with a desired nucleic acid by non-specific or receptor mediated interactions, uptake of nucleic acid into the cell through the membrane or by endocytosis, and release of nucleic acid into the cytoplasm from the plasma membrane or endosome. For successful expression, movement of the nucleic acid into the nucleus of the cell and binding to appropriate nuclear factors for transcription may also be required where the nucleic acid of interest is part of an expression construct.

By the term "gene therapy" includes gene transfer and antisense biotechnological techniques, as referred to above. "Gene therapy" specifically refers to either gene transfer to express a therapeutic product from a cell *in vivo* or *in vitro*, or to antisense techniques whereby oligo- or polynucleotide sequences complementary for a target polynucleotide-encoding sequence(s) is inserted into and expressed in cells *in vivo* or *in vitro* so as to impede production of the target polypeptide. Gene transfer can be performed: *ex vivo* on cells which are then transplanted into a patient; by direct administration of the nucleic acid or nucleic acid-protein complex into the patient; or by transfer of modified cells into a patient. Antisense techniques can be performed *in vivo* using appropriate transfection vectors to deliver expression vectors comprising the antisense-encoding sequence(s) to target cells.

As used herein the term "treatment", refers to any and all uses which remedy a disease state or symptoms, or otherwise prevent, hinder, retard, or reverse the progression of disease or other undesirable symptoms in any way whatsoever.

In the context of this specification, the term "comprising" means "including principally, but not necessarily solely". Variations of the word "comprising", such as "comprise" and "comprises", have correspondingly varied meanings.

Best Mode of Performing the Invention

The present invention describes the use of activin antagonists, as exemplified by follistatin, for the treatment of a number of other disorders, a common feature of which is the association of these disorders with fibrosis. Follistatin is best known for its involvement in the suppression of follicle-stimulating hormone, with a consequential role

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

17

in the treatment of fertility disorders, but has now been found to be an effective activin antagonist capable of inhibiting hyperproliferation of cells associated with fibrotic diseases.

Methods of making activin antagonists, where these are proteins such as follistatin, or a fragment(s) or analogue thereof, can employ conventional techniques of molecular biology, microbiology, recombinant DNA and immunology, all of which are within the skill of the art and fully explained in any one of a number of well known scientific publications, such as: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Second Edition by Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, 1989. For example, the gene for follistatin may be isolated from cells or tissues that express follistatin by: isolating messenger RNA from the tissue or cells, using reverse transcriptase to generate the corresponding DNA sequence, and finally using the polymerase chain reaction (PCR) with the appropriate primers to amplify the DNA sequence coding for the active follistatin amino acid sequence. Also, a polynucleotide encoding a follistatin fragment may be cloned into an appropriate expression vector, and then expressed in a suitable prokaryotic, viral or eucaryotic host. Expressed follistatin polypeptides can be purified according to standard procedures known in the art, including one or more of the following established procedures: protein precipitation, including ammonium sulfate, ethanol or polyethylene glycol precipitation and immuno-precipitation; chromatographic techniques using ion-exchange, size exclusion, reverse-phase, hydrophobic interaction, affinity, or immuno-affinity technologies and carried out by, for example, column chromatography, HPLC, or FPLC; electrophoretic techniques such as gel electrophoresis and HPEC; and the like.

For instance, for producing recombinant follistatin or active fragment(s) thercof for use in the present invention, the relevant DNA sequences are inserted into a suitable expression system. Preferably, a recombinant molecule or vector is constructed in which the polynucleotide sequence encoding follistatin is operably linked to a heterologous expression control sequence enabling expression of the follistatin protein. A number of appropriate expression vectors are known in the art for mammalian (including human) protein expression, and employed using standard molecular biology techniques. Such vectors may be selected from among conventional vector types including insects, such as baculovirus expression, or yeast, fungal, bacterial or viral expression systems.

Suitable host cells or cell lines for transfection in such a method include mammalian cells, such as Human 293 cells, Chinese hamster ovary cells (CHO), the monkey COS-1 cell line or murine 3T3 cells. Similarly bacterial cells such as the various

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

18

well-known strains of *E. coli* (e.g., HB101, MC1061), and various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas*, other bacilli and the like are useful as host cells for the present invention. Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for expression of the polypeptides of the present invention. Insect cells such as 5 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells may also be used.

The vectors containing the DNA segments of interest can be transferred into the host cell by any one of a number of well-known methods, depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection and electroporation are commonly utilised for prokaryotic cells. Calcium phosphate treatment, electroporation, 10 lipofection, biolistics or viral-based transfection may be used for other cellular hosts. Methods for transforming mammalian cells may also include the use of transfection, transformation, conjugation, polybrene, liposomes, electroporation, particle gun technology and microinjection (see, generally, Sambrook *et al.*, 1989).

Recombinant host cells are then advantageously grown in a selective medium, 15 which inherently selects for the growth of those cells containing the introduced vector. The incubation conditions are ideally selected to optimise expression of the recombinant polypeptide.

Therefore, for use in the present invention recombinant activin antagonist(s) may be produced by transfected a host cell with at least one expression vector containing a 20 recombinant polynucleotide encoding an activin antagonist, such as follistatin, or active fragment or analogue thereof, under the control of a transcriptional regulatory sequence. The transformed cell is then cultured under conditions that allow expression of the follistatin protein. The expressed protein may then be recovered from the cell or the culture medium, isolated, and optionally purified by appropriate means known to one of 25 skill in the art. For example, the proteins may be isolated in soluble form following cell lysis, or may be extracted using known techniques, such as in guanidine chloride.

For example, microbial cells containing the exogenous follistatin gene may be cultured in large volume reactors, collected by centrifugation and then ruptured by, for example, high pressure homogenisation. The resulting cell lysate may be resuspended in 30 an appropriate diluent/ buffer, and filtered to obtain an aqueous suspension of the follistatin protein. The recombinant protein can be administered in crude form, for example, by diluting in a 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) to 50-500 μ g/ml concentration, and then passing through a sterile 0.22 micron filter.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

19

Activin antagonists such as follistatin or fragments thereof may also be synthesised by methods of solid phase chemistry well known to those of ordinary skill in the art. For example, follistatin fragments may be synthesised following the solid phase chemistry procedures of Steward and Young (Steward, J. M. & Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis. (2nd Edn.) Pierce Chemical Co., Illinois, USA (1984). In general, such a synthesis method comprises the sequential addition of one or more amino acids or suitably protected amino acids to a growing peptide chain. Typically, functional group(s) other than one of either the amino or carboxyl group of the first amino acid is/are protected by a suitable protecting group. The protected amino acid is then either attached to an inert solid support or utilised in solution by adding the next amino acid in the sequence having the complementary (amino or carboxyl) group suitably protected and under conditions suitable for forming the amide linkage. The protecting group is then removed from this newly added amino acid residue and the next (protected) amino acid is added, and so forth. After all the desired amino acids have been linked, any remaining protecting groups, and if necessary any solid support, is removed sequentially or concurrently to produce the final polypeptide.

Amino acid changes in the activin antagonist, such as in the follistatin polypeptide or fragment thereof may be effected by techniques well known to those persons skilled in the relevant art. For example, amino acid changes may be effected by the addition, deletion or substitution of nucleotides (conservative and/or non-conservative), whilst maintaining the proper reading frame. Such modifications in the target polynucleotide may be produced by techniques including random mutagenesis, site-directed mutagenesis, oligonucleotide-mediated or polynucleotide-mediated mutagenesis, deletion of selected region(s) through the use of existing or engineered restriction enzyme sites, and the polymerase chain reaction.

The activin antagonist of the invention may alternatively be produced as a fusion protein. For instance, it may be desirable to produce follistatin fusion proteins, to enhance expression of the protein in a selected host cell, to improve purification, or for use in monitoring the presence of follistatin in tissues, cells or cell extracts. Suitable fusion partners are well known to those of skill in the art and include: β -galactosidase, glutathione-S-transferase, and poly-histidine.

The activin antagonist of the invention may typically also be an antibody raised against activin or an activin-receptor.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

20

An antibody (or fragment thereof) may be raised against activin, activin receptors, or immunogenic portions thereof using the methods described below. For convenient production of adequate amounts of antibody(s), these may be manufactured by batch fermentation with serum free medium, and then purified via a multistep procedure incorporating chromatography and viral inactivation/removal steps. For example, the antibody may be first separated by Protein A affinity chromatography and then treated with solvent/detergent to inactivate any lipid enveloped viruses. Further purification, typically by size-exclusion, reverse-phase, anion and/or cation exchange chromatographies, may be used to remove residual undesired contaminants such as proteins, solvents/detergents and nucleic acids. The antibody(s) thus obtained may be further purified and formulated into 0.9% saline using gel filtration columns. The formulated bulk preparation may then be sterilised and viral filtered and dispensed.

These antibodies can include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library.

A monoclonal antibody refers to an antibody secreted by a single clone of antibody-producing cells and which is monospecific for a particular antigen or epitope. Therefore, a monoclonal antibody displays a single binding affinity for any antigen with which it immunoreacts.

Activin or activin receptor antibodies may be raised using methods well known to those skilled in the art. For instance, a monoclonal antibody, typically containing Fab portions, may be prepared using the hybridoma technology described in Antibodies-A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988), the disclosure of which is incorporated herein by reference. Any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. Suitable techniques include the hybridoma technique originally developed by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495-497 (1975), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique [Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 4:72 (1983)], and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies [Cole *et al.*, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., (1985)]. Immortal, antibody-producing cell lines can be created by techniques other than fusion, such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. See, e.g., M. Schreier *et al.*, "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling *et al.*, "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett *et*

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

21

al., "Monoclonal Antibodies" (1980); wherein the disclosures of each of these citations are also incorporated herein by reference.

- There are also various procedures known in the art which may be used for the production of polyclonal antibodies to activin, activin receptors, or fragments thereof.
- 5 For example, one or more host animals can be immunised by injection with the relevant polypeptide, or a derivative (e.g., fragment or fusion protein) thereof. Suitable hosts include, for example, rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc.

The antibody (or fragment thereof) will have a binding affinity or avidity. Preferably, this binding affinity or avidity is greater than about 10^5 M^{-1} , more preferably greater than about 10^6 M^{-1} , more preferably still greater than about 10^7 M^{-1} and most preferably greater than about 10^8 M^{-1} .

1. Treatment and/or Prophylaxis of Disease using Activin Antagonists

The administration of activin antagonists as described in the present invention is useful for treating fibrotic-dependent diseases in vertebrates, especially hyperproliferative or inflammatory fibrotic diseases; pulmonary fibrosis, such as idiopathic pulmonary fibrosis, interstitial lung diseases; inflammatory bowel disease, and related conditions such as ulcerative colitis and Crohn's Disease; tubular necrosis in the kidney together with liver fibrosis and cirrhosis.

Typically, the vertebrate is selected from the group consisting of human, non-human primate, mice, cattle, sheep, goats, horses, rabbits, birds, cats and dogs. More typically, the vertebrate is human, non-human primate or mouse. Even more typically, the vertebrate is human.

The therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including: the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the activin antagonist or a fragment(s) or analogue thereof employed; the composition employed; the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration; the route of administration; the rate of excretion of the activin antagonist; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the activin antagonist or a fragment(s) or analogue thereof, together with other related factors well known in medicine. For example, it is well known in the art to begin doses of a therapeutic compound at levels lower than those expected to achieve a desired therapeutic effect, and to gradually increase the dosage, if necessary, until the desired effect is achieved.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

22

Therefore, determination of an effective, non-toxic amount of an activin antagonist required to treat a disorder/ disease to which the antagonist is applicable can be readily determined by an appropriately skilled person by no more than routine experimentation. Typically, for follistatin, an effective dosage is expected to be in the range of about 5 0.00001 to about 100mg follistatin per kg body weight per 24 hours, preferably about 0.0001 to about 10mg follistatin per kg body weight per 24 hours, more preferably about 0.001 to about 1mg follistatin per kg body weight per 24 hours, even more preferably about 0.002 to about 0.5mg follistatin per kg body weight per 24 hours, even more preferably still about 0.005 to about 0.20mg follistatin per kg body weight per 24 hours.

10 Further, if desired, the effective daily dose may be divided into multiple doses for purposes of administration.

Alternatively, an effective dosage of follistatin may be up to about 6,500mg/m² per 24 hours. Generally, an effective dosage is expected to be in the range of about 0.004 to 15 about 400mg/m², preferably about 0.04 to about 40mg/m², more preferably about 0.08 to about 20mg/m², still more preferably about 0.2 to about 8mg/m².

Typically the treatment would be for the duration of the condition, and contact times would typically be for the duration of the condition.

Clearly the optimal quantity and spacing of individual dosages of a compound of the present invention will be determined by the nature and extent of the condition being treated, the form, route and site of administration, and the nature of the particular vertebrate being treated, and these optimum conditions can be determined by routine procedures by skilled persons in the field.

Also included within the scope of the present invention are prodrugs of activin antagonists. Typically, these prodrugs are functional derivatives of follistatin which are readily converted *in vivo* to the required compound for use in the present invention. Typical procedures for the selection and preparation of prodrugs are established and described in available texts such as, for instance, H. Bundgaard (Ed), *Design of Prodrugs*, Elsevier, 1985.

When used in the treatment of disease, the activin antagonist, or analogue or fragment thereof may be administered alone. However, it is generally preferable that the activin antagonist be administered in conjunction with other chemotherapeutic treatments conventionally administered to patients for treating disease.

Pharmaceutical formulations of the present invention will typically be prepared by methods known to those of ordinary skill in the art and will therefore typically include

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

23

excipients such as a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant, or combinations thereof.

The formulations may be administered by standard routes. For example, the formulations may be administered by oral, rectal, parenteral (e.g., intravenous, intraspinal, 5 cutaneous or intramuscular), topical, transdermal, intraperitoneal, intracranial, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, or intrauterine routes.

Activin antagonists, or analogues or active fragments thereof may also be incorporated, optionally along with other active agents, into biodegradable polymers allowing for sustained release, the polymers being implanted in the vicinity of where drug 10 delivery is desired (such as at the site of a localised disease), or implanted so that the active agents are slowly released systemically. Osmotic minipumps may also be used to provide controlled delivery of high concentrations of the active agents through cannulae to the site of interest, such as directly into for example, a fibrotic growth or into the vascular supply to that growth.

15 2. Therapeutic/Pharmaceutical Compositions for Treatment of Disease

The carriers, diluents and adjuvants used in the therapeutic/pharmaceutical compositions of the invention must be "acceptable" in terms of being compatible with the other ingredients, and not being deleterious to the patient. Examples of pharmaceutically and veterinarily acceptable carriers or diluents are demineralised or distilled water; saline 20 solution or phosphate buffered saline (PBS); gelatin; vegetable gums such as xanthan gums, alginates, agar, carrageenan, gum tragacanth or gum acacia; cellulose derivatives such as microcrystalline cellulose, methyl cellulose, ethyl cellulose, carboxymethylcellulose or hydroxypropylethylcellulose; natural or modified starches and dextrins; lactic acid-based polymers; lower alkanols, for example ethanol or isopropanol; 25 lower aralkanols; citrates; acetonitrile; benzyl alcohol; dimethylacetamide; dimethylformamide; monomethylacetamide; 2-pyrrolidones such as N-methylpyrrolidone; phthalates such as diethyl phthalate; polyglycolysed glycerides; lower polyalkylene glycols or lower alkylene glycols, or alkyl ethers or esters thereof, for example polyethylene glycol, polypropylene glycol, ethylene glycol, propylene glycol, 30 1,3-butylene glycol, propylene glycol monomethyl ether, diethylene glycol monoethyl ether and diethylene glycol monobutyl ether and polyethylene glycol fatty acid esters; fatty esters and ethers of sugars or polyhydric alcohols, and alkoxylated derivatives thereof such as alcohol ethoxylates, polyoxyethylene sorbitan- or sorbitol-fatty acid

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

24

esters, polyoxyethylene fatty alcohol ethers, and ethoxylated propoxylated block copolymers; glycerol and fatty acid mono-, di- or tri- esters thereof; sorbitan esters such as sorbitan monolaurate; polysorbates; fatty acids; vegetable based oils such as peanut oil, safflower oil, olive oil, cottonseed oil, maize oil, sesame oils such as peanut oil, safflower oil, olive oil, cottonseed oil, maize oil, sesame oil, arachis oil or coconut oil; animal-derived waxes or oils, such as beeswax or lanolin, or derivatives thereof; fatty acid esters such as isopropyl palmitate, isopropyl myristate, diisobutyl adipate or ethyl oleate; fatty alcohols, such as cetostearyl alcohol; sulphated fatty alcohols; quaternary ammonium compounds; fatty sulphate esters such as dodecyl sodium sulphate; fatty aromatic sulphonates such as alkyl-benzene sulphonates or butyl-naphthalene sulphonates; alkyl naphthalene sulphonates; alkaline stearates, such as potassium or ammonium stearates; alkyl and alkaryl sulphates, such as sodium lauryl sulphate, sodium cetyl sulphate and sodium dodecybenzenesulphonate; silicone oils, including polysiloxanes, such as methyl polysiloxane, phenyl polysiloxane and methylphenyl polysiloxane; volatile silicones; fumed silica; colloidal silicon dioxide; magnesium aluminium silicates; mineral oils such as liquid paraffin, soft paraffin or squalane; polyvinylpyrrolidone or polymers thereof; and petroleum jelly. Typically, the carrier or carriers will form from 10% to 99.9% by weight of the compositions.

In a preferred form the pharmaceutical composition of the invention comprises as active agent an effective amount of follistatin, an analogue or active fragment thereof or follistatin, together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or adjuvant as shown in Example 1.

The pharmaceutical composition of the invention may be: in a form suitable for parenteral administration, that is, subcutaneous, intramuscular or intravenous injection; a capsule suitable for oral ingestion; an ointment, cream or lotion suitable for topical administration; in a form suitable for delivery as an eye drop; or in an aerosol form suitable for administration by inhalation, such as by intranasal inhalation or oral inhalation.

For administration as an injectable solution or suspension, non-toxic parenterally acceptable diluents or carriers can include Ringer's solution, isotonic saline, phosphate buffered saline, ethanol and 1,2 propylene glycol.

Suitable carriers, diluents, excipients and adjuvants for oral use include peanut oil, liquid paraffin, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, sodium alginate, gum acacia, gum tragacanth, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, gelatine and lecithin. In

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

25

addition these oral formulations may contain suitable flavouring and colourings agents. When used in capsule form the capsules may be coated with compounds such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate which delay disintegration. Alternatively, the formulations may be provided with enteric coatings such as hydroxypropylethylcellulose and acrylic and methacrylic polymers or co-polymers and/or their esters, or combinations thereof, which protect the formulation from, for example gastric juices, until at the desired locus for absorption, such as the small intestine.

Adjutants for oral formulations may typically include one or more of emollients, emulsifiers, thickening agents, preservatives, bactericides and buffering agents.

Solid forms for oral administration may contain binders acceptable in human and veterinary pharmaceutical practice, sweeteners, colouring agents, disintegrating agents, diluents, flavourings, coating agents, preservatives, lubricants and/or time delay agents. Suitable binders include gum acacia, gelatine, corn starch or other natural or modified starches and dextrins, gum tragacanth, sodium alginate, carboxymethylcellulose or polyethylene glycol. Suitable sweeteners include sucrose, lactose, sorbitol, mannitol, xylitol, glucose, aspartame or saccharine. Many suitable colouring agents are known and will be selected according to the properties of the particular formulation, and may advantageously include natural colouring agents such as, for example, chlorophylls, carotenes, cochineal. Suitable disintegrating agents include corn starch, cellulose derivatives such as methylcellulose, polyvinylpyrrolidone, guar gum, xanthan gum, bentonite, alginic acid or agar. Suitable diluents include lactose, sorbitol, mannitol, dextrose, kaolin, cellulose, calcium carbonate, calcium silicate, citrate salts or dicalcium phosphate. Suitable flavouring agents include peppermint oil, oil of wintergreen, blackcurrant, cherry, orange, lemon or raspberry flavouring. Suitable coating agents include polymers or copolymers of acrylic acid and/or methacrylic acid and/or their esters, cellulose derivatives such as hydroxypropylethylcellulose, waxes, fatty alcohols, zein, shellac or gluten. Suitable preservatives include sodium benzoate, vitamin E, alpha-tocopherol, ascorbic acid, methyl paraben, propyl paraben or sodium bisulphite. Suitable lubricants include magnesium stearate, stearic acid, sodium oleate, sodium chloride or talc. Suitable time delay agents include glyceryl monostearate or glyceryl distearate.

Liquid forms for oral administration will typically contain, in addition to the above agents, a liquid carrier selected from, for example, water, vegetable oils such as olive oil, peanut oil, sesame oil, sunflower oil, safflower oil, arachis oil, or coconut oil, liquid paraffin, glycols such as ethylene glycol, propylene glycol, or polyethylene glycol, lower

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

26

alkanols such as ethanol, propanol, or isopropanol, glycerol, fatty alcohols, triglycerides or mixtures thereof.

Suspensions for oral administration may further comprise dispersing agents and/or suspending agents selected from, for example, cellulose derivatives such as sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, or hydroxypropylmethylcellulose, vegetable gums such as guar gum or xanthan gum, polyvinylpyrrolidone, sodium alginate or acetyl alcohol. Suitable dispersing agents include lecithin, polyoxyethylene esters of fatty acids such as stearic acid, polyoxyethylene sorbitol mono- or di-oleate, -stearate or -laurate, polyoxyethylene sorbitan mono- or di-oleate, -stearate or -laurate and the like.

The emulsions for oral administration may further comprise one or more emulsifying agents. Suitable emulsifying agents include dispersing agents as exemplified above or other natural gums such as gum acacia or gum tragacanth.

Methods for preparing parenterally administrable compositions are apparent to those skilled in the art, and are described in more detail in, for example, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., hereby incorporated by reference herein.

The topical formulations of the present invention, comprise as active ingredient an activin antagonist, or an analogue or active fragment thereof together with one or more acceptable carriers, and optionally any other therapeutic ingredients. Formulations suitable for topical administration include liquid or semi-liquid preparations suitable for penetration through the skin to the site of where treatment is required, such as liniments, lotions, creams, ointments or pastes, and drops suitable for administration to the eye, ear or nose.

Drops according to the present invention may comprise sterile aqueous or oily solutions or suspensions. These are typically prepared by dissolving the active ingredient in an aqueous solution of a bactericidal and/or fungicidal agent and/or any other suitable preservative such as an antioxidant, and optionally including a surface active agent. The resulting solution may then be clarified by filtration, transferred to a suitable container and sterilised. Sterilisation may be achieved by, for example, autoclaving or maintaining at 90°C-100°C for half an hour, or by filtration, followed by transfer to a container by an aseptic technique. Bactericidal and fungicidal agents suitable for inclusion in the drops include, for example, phenylmercuric nitrate or acetate (0.002%), benzalkonium chloride (0.01%) and chlorhexidine acetate (0.01%). Suitable solvents for the preparation of an oily solution may include, for example, glycerol, diluted alcohol or propylene glycol.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

27

Lotions according to the present invention include those suitable for application to the skin or eye. An eye lotion may comprise a sterile aqueous solution optionally containing a fungicide, bactericide and/or a preservative such as an antioxidant, and may be prepared by methods similar to those described above in relation to the preparation of drops. Lotions, creams or liniments for application to the skin may also include an agent to hasten drying and to cool the skin, such as an alcohol or acetone, and/or a moisturiser such as glycerol, or oil such as castor oil or arachis oil. Lotions, creams or liniments for application to the skin may also include appropriate and compatible colouring agents/dyestuffs as are well known in the art, particularly in pour-on formulations for 10 veterinary applications so as to facilitate distinction of treated from non-treated animals.

Creams, ointments or pastes according to the present invention are semi-solid formulations of the active ingredient for external application. They may be made by mixing the active ingredient in finely-divided or powdered form, alone or in solution or suspension in an aqueous or non-aqueous fluid, with a greasy or non-greasy basis. The 15 basis may comprise hydrocarbons such as hard, soft or liquid paraffin, glycerol or fatty acid mono-, di-, or tri- esters thereof, beeswax, a metallic soap; a mucilage; an oil of natural origin such as almond, corn, arachis, castor or olive oil; wool fat or its derivatives, or a fatty acid such as stearic or oleic acid together with an alcohol such as macrogols or glycols or ethers and/or esters thereof, for example polyethylene glycol, polypropylene 20 glycol, ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, propylene glycol monomethyl ether, diethylene glycol monoethyl ether and diethylene glycol monobutyl ether, lower alkanols, for example ethanol or iso-propanol, lower aralkanols, or 2-pyrrolidones such as N-methylpyrrolidone.

The formulations for skin applications may also advantageously incorporate any 25 suitable surface active agent which may aid in spreading over, or absorption through the skin. Such surfactants may be anionic, cationic, non-ionic surfactant or zwitterionic. Typically the surface active agent will be non-ionic, and more typically will be selected from fatty esters and ethers of sugars or polyhydric alcohols, and alkoxylated derivatives thereof such as alcohol ethoxylates, polyoxyethylene sorbitan- or sorbitol- fatty acid 30 esters, polyoxyethylene fatty alcohol ethers, and ethoxylated propoxylated block copolymers. Suitable anti-foaming agents as known in the art may also be included if necessary.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

28

Suspending and/or viscosity modifying agents such as natural gums, cellulose derivatives or inorganic materials such as siliceous silicas, and other ingredients such as lanolin, may also be included.

Suitable preservatives for use in topical formulations according to the invention 5 may include, for example, sodium benzoate, benzyl alcohol, vitamin E, alpha-tocopherol, ascorbic acid, 2,6-di-tert-butyl-4-cresol (BHT), 2-tert-butyl-4-methoxyphenol (BHA), methyl paraben, propyl paraben or sodium bisulphite.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be administered in the 10 form of liposomes. Liposomes are generally derived from phospholipids or other lipid substances, and are formed by mono- or multi-lamellar hydrated liquid crystals that are dispersed in an aqueous medium. Any non-toxic, physiologically acceptable and metabolisable lipid capable of forming liposomes can be used. The formulations comprising liposomes may also contain stabilisers, preservatives, excipients and the like known in the art. For preparation of liposomes, the preferred lipids are natural and 15 synthetic phospholipids and phosphatidyl cholines (lecithins). Methods for forming liposomes are established and published in texts such as: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 *et seq.*, the contents of which is incorporated herein by reference.

3. Diagnosis of Disease

Screening for diseases associated with fibrosis in vertebrates using antibodies raised 20 against activin, or follistatin, or both, can also be accomplished by any one of a number of techniques known in the art including, for example: gel diffusion precipitation reactions; immunodiffusion assays; *in situ* immunoassays; Western blots; precipitation reactions; agglutination assays; complement fixation assays; immunofluorescence assays; protein A 25 assays; immunoelectrophoresis assays; radioimmunoassays; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); sandwich immunoassays; immunoradiometric assays; receptor-binding assays; and the like.

Antibodies to activin can be raised as described previously herein, and such methods are equally applicable to the production of antibodies to follistatin.

As activin and follistatin are expressed at basal levels in normal tissue in 30 vertebrates, detection of changes in levels of antibody-bound activin or follistatin in samples, as compared to the basal expression levels will be indicative of a disease associated with fibrosis.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

29

A kit for carrying out screening tests as described above contains all the necessary reagents to carry out the test. For example, the kit may comprise the following containers:

- 5 (a) a first container containing the antibody (or fragment thereof) raised against either activin or follistatin;
- (b) a second container containing a conjugate comprising a binding partner of the antibody (or fragment thereof), together with a detectable label.

It has also been found that the difference between activin and follistatin levels in tissues increases during progression of disease, detection of a change in the difference 10 between activin and follistatin levels in a sample, as compared to the difference in a healthy, reference sample, will be indicative of a disease associated with fibrosis. A kit for carrying out screening tests as described above contains all the necessary reagents to carry out the test. For example, the kit may comprise the following containers:

- 15 (a) a first container containing at least an activin antibody (or fragment thereof), and;
- (b) a second container containing at least a follistatin antibody (or fragment thereof);
- (c) a third container containing a conjugate comprising a binding partner of the activin antibody (or fragment thereof), together with a detectable label, and

20 (d) a fourth container containing a conjugate comprising a binding partner of the follistatin antibody (or fragment thereof), together with a detectable label.

Typically, the kits described above will also comprise one or more other containers, containing for example, wash reagents, and/or other reagents capable of quantitatively detecting the presence of bound antibodies. Preferably, the detection reagents include 25 labelled (secondary) antibodies or, where the antibody (or fragment thereof) raised against activin or follistatin is itself labelled, the compartments comprise antibody binding reagents capable of reacting with the labelled antibody (or fragment thereof) raised against activin.

In the context of the present invention, a compartmentalised kit includes any kit in 30 which reagents are contained in separate containers, and may include small glass containers, plastic containers or strips of plastic or paper. Such containers allow the efficient transfer of reagents from one compartment to another compartment whilst avoiding cross-contamination of the samples and reagents, and the addition of agents or solutions of each container from one compartment to another in a quantitative fashion.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

30

Advantageously, such kits will include a container which will accept the test sample, a container which contains the antibody(s) used in the assay, containers which contain wash reagents (such as phosphate buffered saline, Tris-buffers, and like), and containers which contain the detection reagent.

5 **4. Gene Therapy**

The present invention also relates to a method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis. As described herein, gene therapy can include gene transfer and antisense biotechnological techniques.

Gene transfer can be performed by simply injecting minute amounts of DNA into
10 the nucleus of a cell by microinjection. The introduced genes can be recognised by the cells normal mechanisms for transcription and translation, and a gene product will then be expressed.

A number of methods for introducing DNA into larger numbers of cells have also been attempted, including: transfection, which includes precipitation of target DNA with
15 CaPO₄ which is then taken into cells by pinocytosis; electroporation, which includes exposing cells to large voltage pulses to introduce holes in the membrane through which the target DNA may pass; lipofection/liposome fusion, which includes packaging of the target DNA into lipophilic vesicles which can then fuse with a target cell; and particle bombardment whereby target DNA bound to small projectiles is forced into cells. The
20 target DNA may also be introduced into cells by coupling the DNA to chemically modified proteins.

Typically, in a method of gene transfer according to the invention, an expression vector containing a nucleic acid molecule encoding for an activin antagonist such as follistatin or a fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic acid
25 molecule encoding the activin antagonist, is inserted into cells. The transformed cells are multiplied *in vitro* and then infused in large numbers into patients. Suitable expression vectors for delivery of these nucleic acid sequences into the targeted cell population (eg., hepatocytes, other liver cell types such as hepatic stellate cells, smooth muscle cells, lung fibroblasts, fibroblasts, kidney cells) may be derived from viruses such as retroviruses,
30 vaccinia virus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes viruses, several RNA viruses, or bovine papilloma virus. Recombinant viral vectors containing the target nucleic acid sequences may be prepared by any one of a number of methods which are well known to those skilled in the art. Alternatively, recombinant nucleic acid molecules encoding an

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

31

activin antagonist such as follistatin, or an analogue or active fragment thereof can be used as naked DNA or in a reconstituted system, for example, liposomes or other lipid systems for delivery to target cells.

Typically, in a method involving antisense technology according to the invention, an expression vector containing a nucleic acid molecule encoding for a nucleic acid molecule antisense to at least a portion of a nucleotide sequence encoding activin, an activin receptor, or other activin-associated transduction pathway molecule, or a fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising such an expression vector is inserted into cells. Suitable expression vectors may include those described above for gene transfer purposes. Typically the expression vector will be inserted in cells in a target tissue *in vivo*, and this may typically include use of a transfection vector, such as an appropriate viral vector, or use of passive uptake of the expression vector. Typically the method will include transformation of a substantial amount of the cells in the target tissue, such that expressed levels of activin, activin receptor, or other activin-associated transduction pathway molecule, are reduced compared to untransformed tissue whereby progression of the disease in the tissue is slowed, stopped or the disease recedes. Suitable viral vectors for transfection of cells with the antisense-encoding nucleic acid molecules may include attenuated versions of viruses such as adeno-associated virus, vaccinia virus, herpes viruses, several RNA viruses, retroviruses, or bovine papilloma virus.

It has also been shown that adenovirus proteins are capable of destabilising endosomes and enhancing the uptake of DNA into cells. Admixture of adenovirus to solutions containing DNA complexes, or the binding of DNA to polylysine covalently attached to adenovirus using protein crosslinking agents substantially improves the uptake and expression of the recombinant gene.

The invention will now be described in greater detail by reference to specific Examples, which should not be construed as in any way limiting the scope of the invention.

Examples

Example 1 - Activin A and follistatin immunoreactivity indicate constitutive hepatocyte expression in normal rat liver.

We demonstrated follistatin immunolocalisation exclusively to hepatocytes of normal liver (Figure 1).

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

32

Liver samples required for histological examination were fixed in 10% PBS buffered formalin for 24 hours at room temperature, and then washed twice in 70% alcohol and stored in 70% alcohol at room temperature until required for use. Tissue samples were then processed using the following schedule. Samples were dehydrated in sequential baths of 70% ethanol for 1 hr, 90% ethanol for 2 hrs and 100% ethanol for 2 hrs and 100% ethanol for 1 hr. Tissues were then submerged in Histosol for 1 hr 3 times in separate baths, and immersed in wax for 1 hr each in 2 separate baths. Tissues were then embedded in wax moulds and once set, stored at room temperature until required for use.

For immunohistochemistry, formalin fixed-paraffin embedded tissue blocks were sectioned at 4 μ m and placed on Superfrost PlusTM slides, incubated at 60 °C for 30 minutes and stored at room temperature until required. Slides were then deparaffinized using standard techniques and underwent microwave heat retrieval at 400 W for 10 minutes submerged in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 7.4). Colour was developed in all staining procedures using 3'3-diaminobenzidine (DAB) unless otherwise described and slides were counter stained with hematoxylin.

To localize activin A in liver tissue, the monoclonal antibody "E₄", raised against the activin- β_A subunit, was applied at a final concentration of 18 μ g/ml and incubated overnight at 4°C. "E₄" is the same monoclonal antibody used in the activin A ELISA and has previously been validated for both procedures (Jarred, RA, Cancilla B, Richards M, Groome NP, McNatty KP, Risbridger GP. Differential localization of inhibin subunit proteins in the ovine testis during fetal gonadal development. *Endocrinology* 1999; 140:979-86). Reactivity was amplified using a CSA signal amplification kit (DAKO) to manufacturer's instructions and color was developed and sections counterstained. Human prostate sections were used as a positive control, while the negative control substituted the primary antibody for an irrelevant antibody (normal mouse immunoglobulin). Since inhibin is essentially not expressed in liver, detection of the β_A subunit represents activin A protein and not inhibin (a heterodimer of α and β_A subunits).

Monoclonal antibodies against the two major isoforms of human follistatin were used to determine tissue immunoreactivity. Monoclonal antibody 17/2 (1:150) is specific against human follistatin 288, while the H10 (1:100) clone is specific for human follistatin 315 (McPherson SJ, Mellor SL, Wang H, Evans L.W, Groome NP, and Risbridger GP. Expression of activin A and follistatin core proteins by human prostate

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

33

tumor cell lines. *Endocrinology* 1999; 140: 5303-9.). The staining procedure for each monoclonal antibody was conducted as for the activin- β_A subunit using cytospin preparations of the HepG2 cell line as a positive control, while an irrelevant antibody substituted for the primary antibody served as a negative control.

5 **Example 2 - Immunoreactivity for activin A is more intense adjacent to fibrous septa than in lobular hepatocytes but no change in follistatin expression in cirrhosis.**

The expression of activin A in fibrotic and cirrhotic liver is less controversial than that of normal liver.

Male wistar rats weighing between 80-100 gms were housed in standard 12-hr light 10 and dark cycles at constant temperature and humidity and allowed access to water and rat chow *ad libitum*. To establish a model of fibrosis and cirrhosis, rats were injected intraperitoneally with a 1:1 Carbon tetrachloride/Olive oil mixture 3 times per week for 12 weeks at a dose of 0.8 ml/kg. Injections were given on three consecutive days. Control animals were injected with equal volumes of olive oil alone. In this model of 15 fibrosis and cirrhosis we observed a change in the distribution of immunoreactive activin A from lobular hepatocytes to areas surrounding the fibrotic bands (Figure 2) and occasional co-localisation with markers of HSC's (Figure 3).

The experiment was carried out as per Example 1 and, to assess HSC's expressing activin within fibrotic septa, confocal microscopy was used. Alpha smooth muscle actin, a 20 marker for activated hepatic stellate cells, was detected using a monoclonal antibody directed against actin filaments present in activated hepatic stellate cells. Cells expressing α -smooth muscle actin were visualised using a monoclonal mouse anti-human primary antibody applied at a final concentration of x mg/ml (1:100, DAKO corporation) for 1 hour at room temperature. This antibody has been previously validated to exhibit cross-reactivity with rat α -smooth muscle. To visualize reactivity, sections were incubated with 25 a sheep anti-mouse-FITC conjugate (1:50, Silenus, Victoria) preabsorbed against normal rat serum for 1 hour at room temperature. To assess activin expression by intra-fibrotic HSC's, a biotinylated activin A conjugate (1:20) was applied for 1 hour and visualized with a streptavidin-Texas Red conjugate (1:50) for 30 min. Reactivity was measured 30 under fluorescent conditions with a biorad confocal microscope and analysed using Biorad software.

Notably, there was no discernable change in the immunoreactivity of follistatin in fibrotic and cirrhotic animals when compared to normals (Figure 4). This finding is the

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

34

first description of follistatin expression in fibrotic and cirrhotic livers and would suggest that the increased activin expression adjacent to fibrous septa is unopposed by an increase in follistatin neutralising activity.

Example 3 - Hepatic expression of activin mRNA precedes changes in follistatin mRNA during the development of hepatic fibrogenesis.

As the expression of activin and follistatin is widely distributed amongst many tissues, observations at the protein level can be confounded by accumulation of protein from extrahepatic sources.

Using real-time PCR analysis of whole liver extracts, we analysed the expression of both activin A and follistatin mRNA (Figure 5) during the model of fibrosis as described in Example 2.

Total RNA was purified using Trizol® with modifications. Briefly, after initial extraction, the supernatant was mixed with a high salt solution of 0.8M sodium citrate and 1.2M sodium chloride to allow more efficient precipitation to occur. To remove genomic DNA contamination, samples were then treated with 10U of DNase (Roche Biochemicals) at 37° for 45 mins and the reaction stopped by incubating at 95° for 3 mins. Samples were then quantitated by A_{260}/A_{280} spectrophotometry. Two micrograms of RNA for each sample were transcribed using Superscript II® and oligo dT₁₃₋₁₅ (Gibco-BRL).

Activin β_A subunit mRNA analysis was performed using the Roche LightCycler (Roche) which fluorimetrically monitors the formation of PCR products in real time. This is accomplished by using the marker SYBR Green I, which in its unbound form has low fluorescence but when bound to dsDNA fluoresces strongly such that the fluorescence intensity increases in proportion to the amount of dsDNA. The log-linear portion of the PCR amplification curve is identified with the threshold or crossing point (represented in cycle number) defined as the intersection of the best-fit line through the log-linear region and the noise band. In these studies, a normal rat cDNA preparation was employed as a quality control and used in all reactions to ensure cycling conditions remained constant between experimental runs. The levels of expression of each mRNA and their estimated crossing points in each sample were determined using the LightCycler software. A ratio of specific mRNA/GAPDH amplification was then calculated. PCR reagents were purchased from Roche Biochemicals.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

35

For PCR, 2 µl of each cDNA preparation was diluted to a final concentration of 1:400 and added to individual capillary tubes with dNTP, Mg²⁺, SYBR Green and relevant primers. Magnesium concentrations, annealing temperatures, extension times and primer specific nucleotide locations and sequences are shown in Table 1. Forty cycles of PCR were programmed to ensure that the log-linear phase was reached. At the completion of the reaction, melting curve analysis was performed to establish the specificity of the DNA products produced. PCR products were removed from the capillary tubes and visualised by gel electrophoresis to confirm the product size and integrity of the PCR reaction. In every instance, each primer set for individual animals were performed in a single PCR experiment. The intra assay variation was 4% for each primer set.

Immediately following intoxication with CCl₄ there was a significant reduction in activin A expression at 1 week which continued through to 2 weeks. Following, expression levels returned to baseline levels at 4 weeks and remained constant throughout the remainder of the model.

In contrast, follistatin expression was elevated initially relative to normal levels. Interestingly, this rise in follistatin expression correlated with peak hepatocyte proliferation as measured by PCNA expression. Following the initial rise, follistatin mRNA expression levels dropped significantly at 2 weeks, and mirrored activin expression thereafter.

It is likely that this initial response of follistatin and activin is due to the acute insult of the CCl₄ eliciting a regenerative response.

These results highlight the notion that even though activin A and follistatin levels are differentially regulated during the pathogenesis of hepatic fibrosis, this expression is inextricably linked.

Example 4 - Activin A mRNA expression rapidly increases during the early stages of HSC activation relative to follistatin mRNA expression.

We performed real time PCR analysis on freshly isolated HSC's as they transdifferentiated *in vitro* to determine the expression pattern of activin A and follistatin in relation to other key markers of HSC proliferation and ECM production.

HSC cultures were established by sequential pronase and collagenase perfusion as previously described (Ramm GA. Isolation and culture of rat hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol* (1998) 13:846-851). Briefly, cells were separated on a two-step

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

36

discontinuous gradient of Nycodenz (Sigma, Sydney, Australia) and purity was assessed by characteristic vitamin A UV autofluorescence and flow cytometry. Following trypan blue exclusion to determine viability, 1×10^6 cells/ml were cultured in M199 media supplemented with 10% foetal bovine and 10% normal horse serum (Trace Scientific, Victoria) in standard 5% CO₂ conditions. Media were changed after 24 hours and every 48 hours thereafter.

RNA isolation and real-time PCR were carried out as per Example 3.

As HSC's transdifferentiated, type 1 collagen mRNA expression elevated as expected. However, our analysis revealed the induction of activin A mRNA expression very early during HSC activation which continued through to day 5 (Figure 6). Furthermore, this expression was elevated prior to the expression of TGF β , however after day 1, TGF β was greater than activin A.

The key finding however was the observation that follistatin mRNA expression peaked by day 1 post-isolation and remained constant until day 5 such that activin A and FS expression levels were markedly different. It has been suggested that the presence of activin A, either from an endocrine or autocrine source, is able to stimulate HSC fibronectin and collagen synthesis. These observations taken together with the findings reported in the above examples, and the knowledge that follistatin neutralizes activin A bioactivity would suggest that the addition of follistatin would be able to ameliorate HSC 15 ECM production and therefore hepatic fibrogenesis.

Example 5 - Isolated hepatic stellate cells produce increasing concentrations of bioactive activin A as they transform into the typical "myofibroblast-like" phenotype.

Primary cultures of HSC's were established from normal livers as per example 4 and analysis revealed the production of increasing quantities of activin A as they transformed to the activated phenotype (Figure 7).

Activin A immunoreactivity was measured by ELISA as per Knight PG, Muttukrishna S, Groome NP. Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin A concentrations in serum and follicular fluid was based on the method described in *J Endocrinol* (1996), 148:267-79.

Conditioned medium from HSC cultures were assessed for activin bioactivity using a previously validated *in vitro* bioassay (Phillips, D.J., Brauman, J.N., Mason, A.J., de Kretser, D.M. & Hedger, M.P. A sensitive and specific *in vitro* bioassay for activin using

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

37

a mouse plasmacytoma cell line, MPC-11, *J Endocrinol* (1999), 162:111-115.). Addition of activin causes a dose-dependent inhibition of proliferation in mouse MPC-11 cells. These cells are refractory to TGF β and inhibin, but the effects of activin can be blocked by addition of excess follistatin.

5 The addition of supernatants from HSC cultures to MPC-11 cells resulted in a dose dependant decrease in proliferation (Figure 8). This decrease in proliferation mirrored that of rh-activin A.

It was observed that the addition of culture supernatants was more potent than that observed for rh-activin A.

10 **Example 6 - The addition of exogenous activin A and follistatin to cultures of HSC resulted in a decrease in HSC proliferation.**

Cultures of both freshly isolated and activated HSC's, isolated as per example 4, were exposed to exogenous activin A and follistatin to determine their effects on proliferation. The addition of both activin A and follistatin resulted in dose dependent 15 decreases in HSC proliferation in both experimental conditions (Figure 9 and 10) in a similar profile to that observed for TGF β .

The proliferative response of HSC's and transformed HSC's (myofibroblasts) to various exogenous mediators was assessed *in vitro* by ^3H -thymidine incorporation. After the optimal cellular density was determined cells were seeded onto 24 well plates at 0.5 x 20 10^5 cells/well and allowed to adhere overnight at 37°C. Cell culture medium was removed and replaced with M199 media containing 0.1% BSA for 18 hours to allow cells to move into the G₀ phase of the cell cycle. Cells were then exposed to various concentrations of Activin (0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 ng/ml), TGF β (0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/ml), Follistatin (1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 ng/ml) and 25 PDGF-BB (1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50 ng/ml) for 18 hrs. Cultures were then pulsed with 0.5 μCi of ^3H -thymidine and incubated at 37°C for a further 16 hrs. Following, adherent and non-adherent cells were trypsinised and then harvested with a Biorad (Biorad) cell harvester onto filter paper and added to a Wallac scintillation tube. Seven hundred and fifty microlitres of scintillation fluid was added to each tube and counted for 1 min on a 30 Wallac beta counter (Wallac).

This data suggests that follistatin may be a beneficial therapeutic agent for the treatment of hepatic fibrogenesis.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

38

Example 7 - Activin A has divergent effects on HSC apoptosis compared to TGF β .
As both activin A and follistatin reduced HSC proliferation, it was hypothesized that either or both were causing HSC apoptosis.

Cultures of activated HSC's, isolated as per example 4, were exposed to varying quantities of activin A, follistatin and TGF β and assessed by flow cytometry for the expression of annexin V; an early marker of cellular apoptosis.

Apoptosis of myofibroblast cell lines that had undergone at least 6 subcultures was measured by flow cytometry using the cell surface expression of Annexin V as a marker. Annexin V is an intracellular protein that is expressed on the cellular surface of cells undergoing apoptosis. Briefly, 2×10^5 myofibroblast HSC were subcultured onto 6 well culture plates overnight. Following, cells were washed in HBSS and treated with Activin (0.1, 1, 10 and 100 ng/ml), TGF β (1 and 5 ng/ml), Follistatin (10 and 100 ng/ml), PDGF-BB (50 ng/ml) Activin and TGF β simultaneously (1 and 5 ng/ml respectively) and Activin and FS simultaneously (10 and 100 ng/ml respectively) for 16 hours. As a positive control, Sodium Nitroprusside (SNP) was used at a final concentration of 0.5 μ M. SNP is a chemotherapeutic drug used in the treatment of various solid cancers and leukaemias. Adherent and non-adherent cells were collected after treatment with trypsin-EDTA, washed with 1 ml PBS and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. An Annexin V-FITC specific antibody was applied for 30 min according to manufacturers instructions (Roche diagnostics) in conjunction with Propidium Iodide (PI) to distinguish between apoptotic and necrotic cells. Cells were then washed in PBS and centrifuged at 2000 rpm for 10 min and resuspended in 300 μ l of PBS. The single suspension was then analysed on a MoFlo-cytomation analyzer.

In contrast to TGF β , the addition of activin A and follistatin did not induce HSC apoptosis (Figure 11).

This is a significant finding, as it strongly suggests a different cellular regulatory mechanism for activin A compared to TGF β .

Example 8 - Parenteral administration of recombinant human follistatin in a model of short term and long term liver injury.

To determine if parenteral administration of follistatin was able to reduce the progression of liver fibrosis, rats were exposed to CCl₄ either for 4 weeks (short term) or for 8 weeks (long term). Animals were then co-injected with 1 μ g of follistatin 3 times a

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

39

week for the first 4 weeks (short term) or from weeks 8-12 (long term) and then sacrificed. Control animals received CCl₄ for the same length of time.

Cirrhosis was induced in male Wistar rats by injecting a 1:5 vol/vol mix of carbon tetrachloride (CCl₄) and olive oil at a final concentration of 0.4mg/kg 3 times weekly for 5 either 4 weeks (short term model) or 12 weeks (long term model). Control animals received injections of equivalent volumes of olive oil alone. Whole livers were removed at model's end for histological and mRNA analysis as previously described above in Examples 1-3. Additionally, to determine an estimate of total liver fibrosis, hydroxyproline content was measured as previously described (Bergman, I., and R. 10 Loxley, "Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline", *Anal Chem* (1963) 35: 1961-1965). Briefly, frozen liver samples were weighed and hydrolysed in 6N HCl acid at 110 °C for 16-18 hours in teflon coated tubes. Samples were cooled and 40 mg Dowex (Sigma)/activated charcoal was added to each sample and vortexed. The hydrolysate was filtered through 2 filter papers into a 15 fresh tube and the samples were then brought to a pH of 7.4. The samples were then incubated with isopropanol and chloramine T for 25 minutes at 60 °C. Following cooling to room temperatures, the hydroxyproline content is estimated by reading the absorbance of the samples at a wavelength of 570 nm.

For the short term model of fibrosis, 1 µg of recombinant human FS-288 was 20 injected intra-muscularly in the hind legs 3 times a week for the duration of the model (4 weeks). For the long term model of fibrosis and cirrhosis, animals were injected at the same dose by the same route between weeks 8 and 12 of the model.

In the short term model, animals treated with follistatin had greater body weight (Figure 12) and a greater remnant liver weight (Figure 13). Furthermore, they had 25 significantly less intrahepatic hydroxyproline content than controls at 2 weeks (Figure 14).

In the long term model, animals treated with follistatin showed no change in body weight (Figure 15), remnant liver weight (Figure 16) or intrahepatic hydroxyproline content (Figure 17).

30 From these data we conclude that the injection of follistatin may contribute to the improvement of hepatic function of remaining hepatocytes.

Furthermore, we conclude that the use of follistatin may be beneficial as a therapeutic agent to attenuate hepatic fibrogenesis in newly diagnosed patients either alone or in conjunction with current conventional therapies.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

40

Further therapeutic applications could include: 1) aiding hepatic regeneration and collagen absorption in patients who have successfully completed conventional therapy; 2) restoring hepatic function in patients who have undergone hepatic resection and to attenuate fibrosis of regenerating liver.

5 **Example 9 – Studies in Humans**

Serum activin A was demonstrated to be elevated in patients with chronic viral hepatitis compared to normal controls (Figure 18) whereas serum follistatin remained at normal levels (Figure 19), as also reported in Patella, S., *et al.* (2001), "Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis", *J Hepatol.*, **34**(4): 576-83. This study is one of the few studies that have investigated activin A in human disease and is the only study that has looked at human viral hepatitis with any detail.

Briefly, archival serum stored at -80° C was analysed from 15 normal, 22 hepatitis B and 47 hepatitis C subjects Liver function tests, virology and liver biopsy were performed during routine clinical management. Total serum activin A was measured by a two step sandwich ELISA in which human recombinant activin-A is used as the standard as described previously (Knight, P.G., Muttukrishna, S. & Groome, N.P. Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *J Endocrinol* 1996; **148**:267-279). Total serum follistatin was quantitated using an ultra-sensitive ELISA using recombinant monoclonal antibodies as previously validated (Evans, L.W., Muttukrishna, S. & Groome, N.P. Development, validation and application of an ultra-sensitive two-site enzyme immunoassay for human follistatin. *J Endocrinol* 1998; **156**: 275-282). The standard used was human recombinant follistatin 288 obtained from the National Hormone and Pituitary Program (Rockville, MD, USA). Immunohistochemistry for activin A subunit and follistatin was performed as detailed in Example 2.

Further analysis of patients infected with HBV revealed that serum activin A significantly correlated with ALT, a marker for hepatocyte injury and intrahepatic inflammation (Figure 20). Serum activin A in patients with HBV were also observed to correlate positively with viral replication (Figure 21), whereas serum follistatin correlated negatively (Figure 22). This would suggest that the unopposed presence of activin A in this system may contribute to the pathogenesis of chronic hepatitis infection by influencing viral replication.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

41

Example 10 - Expression of Recombinant Human Follistatin in CHO Cells

The human follistatin 288 (FS288) gene was amplified from human ovary cDNA (Clontech) using the polymerase chain reaction. A 954 base pair fragment was generated using primers complementary to the 5' and 3' ends of the human FS288 gene. This 5 fragment was cloned into and plasmid pGem7Zf(-) (Promega) using standard techniques. After determining that the sequence of the FS288 insert was correct the FS288 gene was subcloned into a mammalian expression vector, pDSVC, behind the SV40 early promoter. The recombinant vector was then transfected into a mammalian cell line (Chinese Hamster Ovary, CHO) by the calcium phosphate precipitation method. Transfected cells 10 were grown in selective medium until colonies appeared. These colonies were pooled and grown in selective medium (alpha-MEM without nucleosides plus 5% dialysed FBS), with methotrexate to amplify the mouse DHFR and linked FS288 genes. Pools secreting the highest levels of FS288 were selected and dilution plated. After a few days colonies originating from single cells were visible. These colonies were transferred to separate 15 wells in a multiwell plate. The amount of follistatin secreted from each clone was determined. One cloned cell line, cD15 which secreted about 8 μ g FS288/ml/24 hours, was selected and expanded to ~1 x10⁹ cells. These cells were used to inoculate a 30 litre Braun bioreactor containing medium (alpha-MEM, glucose plus 5% FBS) and micro-carrier beads (Cytodex 2). The fermenter working volume was 20-25 litres. The cells 20 were grown in the fermenter using a "fill-draw" method. Culture was removed periodically and replaced with fresh media and micro-carrier beads. Harvested culture medium was separated from cells by dead end filtration through 5, 1.2 and 0.2 μ m filters. The final filtrate was concentrated ~5 fold by tangential flow filtration on a 10kDa cut-off ultrafiltration cartridge (AG technologies). The concentrate, containing follistatin 25 secreted from the cells, was stored frozen at -20°C.

Example 11 - Purification of Recombinant Human Follistatin 288

The concentrated conditioned medium containing recombinant human FS288 was thawed and subjected to heparin sepharose chromatography. Material was loaded onto a heparin sepharose column in 50mM Na phosphate buffer (Buffer A), and eluted in a 30 gradient of buffer A and buffer B (buffer A + 2M NaCl). Fractions containing follistatin were pooled and concentrated using a YM10 membrane. The pool was loaded onto a Sephadryl S-200 HR column in PBS pH7.0. Fractions containing follistatin were pooled and again concentrated, and sterile filtered through a 0.2 μ m filter and stored at -20°C.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

42

The concentration of follistatin in the final pool was estimated to be ~900µg/ml by Bradford assay and follistatin-specific ELISA (Nigel Groome). Purity was estimated to be >90% by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Example 12 – Formulations and methods of administration

5 Follistatin, or an analog or active fragment thereof will be administered with or without carriers adjuvants or excipients, but will be preferably administered as a pharmaceutical formulation. For parenteral administration, the formulation will typically be an aqueous solution, and may comprise follistatin, an analogue or an active fragment thereof in an amount of from 0.001% to 5% w/v, eg., from 0.01% to 2% w/v of the formulation, although it may comprise as much as 5% w/v but preferably not in excess of 10% w/v, and more preferably from 0.01% to 1% w/v of the formulation.

10 For oral administration, the formulation may comprise follistatin, an analogue or an active fragment thereof in an amount of from 0.001% to 10% by weight, eg., from 0.01% to 5% by weight of the formulation, although it may comprise as much as 10% by weight 15 but preferably not in excess of 5% by weight, and more preferably from 0.1% to 2% by weight of the formulation.

20 For topical administration, the formulation may comprise follistatin, an analogue or an active fragment thereof in an amount of from 0.005% to 5% by weight, eg., from 0.05% to 2% by weight of the formulation, although it may comprise as much as 5% by weight 25 but preferably not in excess of 2% by weight, and more preferably from 0.1% to 1% by weight of the formulation.

In accordance with the description of the invention provided above specific preferred pharmaceutical compositions of the present invention may be prepared, and examples of which are provided below. The following specific formulations are to be construed as merely illustrative examples of formulations and not as a limitation of the scope of the present invention in any way.

Example 12(a) - Topical Cream Composition

A typical composition for delivery as a topical cream is outlined below:

Follistatin	0.1-1.0 g
Methyl hydroxybenzoate	0.2 g
Lanolin (Anhydrous)	6.0 g
White Beeswax	7.5 g
Polawax GP 200	25.0 g

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

43

Sterilised isotonic saline to 100.0 g

The Polawax, beeswax and lanolin are heated together at 60°C, a solution of methyl hydroxybenzoate is added and homogenisation is achieved using high speed stirring. The temperature is then allowed to fall to below 50°C. Follistatin is then added and dispersed throughout, and the composition is allowed to cool with slow speed stirring.

Example 12(b) - Topical Lotion Composition

A typical composition for delivery as a topical lotion is outlined below:

Follistatin	0.1-1.0g
Methyl Hydroxybenzoate	0.2g
Sorbitan Monolaurate	1.0g
Polysorbate 20	1.0g
Cetostearyl Alcohol	1.5g
Glycerin	10.0g
Isotonic saline to	100.00ml

The methyl hydroxybenzoate and glycerin are dissolved in 70ml of the isotonic saline at 75°C. The sorbitan monolaurate, polysorbate 20 and cetostearyl alcohol are melted together at 75°C and added to the aqueous solution. The resulting emulsion is homogenised, allowed to cool to below 50°C with continuous stirring and follistatin is added as a suspension in the remaining water. The whole suspension is stirred until homogenised.

Example 12(c) - Eye Drop Composition

A typical composition for delivery as an eye drop is outlined below:

Follistatin	0.01-0.1g
Methyl Hydroxybenzoate	0.003g
Propyl Hydroxybenzoate	0.08g
Purified isotonic saline to about	100.00ml.

The methyl and propyl hydroxybenzoates are dissolved in 70ml isotonic saline at 75°C, and the resulting solution is allowed to cool to below 50°C. Follistatin is then added, and the solution sterilised by filtration through a membrane filter (0.22 µm pore size), and aseptically packed into sterile containers.

Example 12(d) - Composition for Inhalation Administration

For an aerosol container with a capacity of 20-30 ml: a mixture of 10-50mg of follistatin with 0.5-1.0% by weight of a lubricating agent, such as polysorbate 85 or oleic acid, was dispersed in a suitable propellant, such as freon, and put into an appropriate aerosol container for either intranasal or oral inhalation administration.

Example 12(e) - Composition for Parenteral Administration

A pharmaceutical composition of the present invention for intramuscular injection could be prepared to contain 1mL sterile isotonic saline, and 0.5-2mg of follistatin.

Similarly, a pharmaceutical composition for intravenous infusion may comprise 250ml of sterile Ringer's solution, and 1-5mg of follistatin.

Example 12(f) - Capsule Composition

A pharmaceutical composition of follistatin in the form of a capsule may be prepared by filling a standard two-piece hard gelatin capsule with 0.5-5.0mg of follistatin, in powdered form, 180mg of lactose, 65mg of talc and 12mg of magnesium stearate.

Example 21(g) - Injectable Parenteral Composition

A pharmaceutical composition of this invention in a form suitable for administration by injection may be prepared by mixing 0.1% by weight of follistatin in 12% by volume propylene glycol and isotonic saline. The solution is sterilised by filtration.

Example 12(h) - Ointment Composition

A typical composition for delivery as an ointment includes 0.1-0.5g of follistatin, together with white soft paraffin to 100.0g, dispersed to produce a smooth, homogeneous product.

Example 12(i) - Pour-On Formulation

A typical composition for delivery as a pour-on formulation, for example for cattle, includes 0.05-0.1% by weight of follistatin, as outlined below:

Follistatin	0.05-0.10g
Butylated hydroxytoluene	0.02 g
Brilliant Blue FCF	0.16g
Xanthan gum	0.4g
Benzyl alcohol	3.0g

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

45

Diethyleneglycol monobutyl ether to 100g

- If a surface active agent is desired to be included in the formulation so as to aid in spreading of the formulation over the skin and/or hair of the animal, and/or so as to aid in absorption of the formulation through the skin, a suitable surfactant, preferably an anionic surfactant such as Eco-teric T80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate) may be included in the formulation at a concentration of, for example, 20% by weight.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

46

Claims:

1. A pharmaceutical composition for the treatment and/or prophylaxis of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said composition comprising at least one activin antagonist, and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or diluent.
- 5 2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the activin antagonist is follistatin, or a fragment(s) or analogue thereof.
3. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the follistatin is a single chain protein comprising between 288 and 315 amino acids with a molecular weight of between about 30,000 and 60,000 Daltons as estimated by SDS-PAGE in the absence of reducing agents, derived from follicular fluid and able to inhibit the secretion of follicle-stimulating hormone (FSH).
- 10 4. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the follistatin is a single chain protein classified as NCBI (National Center for Biotechnology Information) protein XP_003891, AAH04107.
- 15 5. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the follistatin or a fragment(s) or analogue present in the pharmaceutical composition exists in a form selected from the group consisting of: follistatin/chelate, follistatin/drug, follistatin/prodrug, follistatin/toxin and follistatin/detector group and follistatin/imaging marker.
- 20 6. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the activin antagonist is follistatin-related protein or a fragment(s) or analogue thereof.
7. The pharmaceutical composition of claim 6, wherein the follistatin-related protein has a sequence as defined in Genbank accession number NP_005851.
- 25 8. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the activin antagonist is an antibody raised against activin.
9. The pharmaceutical composition of claim 8, wherein the activin to which the antibody is raised is activin A, activin AB or activin B.
10. The pharmaceutical composition of claim 8, wherein the activin to which the antibody is raised is a heterodimer or homodimer of mature inhibin β A or β B subunit chains free of inhibin α chain.
- 30 11. The pharmaceutical composition of claim 10, wherein the two subunits comprise between 110 and 120 amino acids with molecular weights of about 12,000 - 13,000 Daltons as estimated by SDS-PAGE in the absence of reducing agents.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

47

12. The pharmaceutical composition of claim 10, wherein the activin contains β A subunit with sequence as defined in GenBank accession number M13436 and/or β B subunit with sequence defined in GenBank accession number M13437.
13. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the activin antagonist is a compound which interferes with activin binding to its respective receptor.
14. The pharmaceutical composition of claim 13, wherein said compound is an antibody raised against the activin receptor.
15. The pharmaceutical composition of claim 14, wherein the activin receptor to which the antibody is raised is ActRIIA or ActRIIB or ActRIA or ActRJB or ALK2 or ALK4.
16. The pharmaceutical composition of claim 13, wherein the compound is an antibody raised against receptor for a protein selected from the group consisting of: activin A, activin AB and activin B.
17. The pharmaceutical composition of claim 13, wherein said compound is a Smad signalling molecule selected from Smad6 and Smad7 or fragment(s) or analogue(s) thereof.
18. The pharmaceutical composition of claim 13, wherein said compound is a molecule that specifically inhibits TGF β /activin type I receptors.
19. The pharmaceutical composition of claim 18, wherein said compound is selected from triarylimidazole analogues.
20. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein said compound is SB-431542.
21. The pharmaceutical composition of any one of claims 1 to 20, wherein the disease associated with fibrosis is one of: a hyperproliferative or inflammatory fibrotic disease; a pulmonary fibrosis; an inflammatory bowel disease, or a related condition such as ulcerative colitis or Crohn's Disease; or liver fibrosis or cirrhosis.
22. The pharmaceutical composition of any one of claims 1 to 20, wherein the disease associated with fibrosis is liver fibrosis or cirrhosis.
23. A process for preparing the pharmaceutical composition of any one of claims 1 to 22, wherein said process comprises homogeneously mixing at least one activin antagonist with a pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or diluent.
24. A method for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment, wherein said method comprises administering to said vertebrate, a therapeutically effective amount of at least one activin antagonist.

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

48

25. A method for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate in need of said treatment, wherein said method comprises administering to said vertebrate, a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition of any one of claims 1 to 22.
- 5 26. The method of claim 24 or claim 25, wherein the vertebrate is selected from the group consisting of human, non-human primate, mice, cattle, sheep, goats, horses, rabbits, birds, cats and dogs.
27. The method of claim 26, wherein the vertebrate is human.
28. The method of any one of claims 24 to 27, wherein the disease associated 10 with fibrosis is one of: a hyperproliferative or inflammatory fibrotic disease; a pulmonary fibrosis; an inflammatory bowel disease, or a related condition such as ulcerative colitis or Crohn's Disease; or liver fibrosis or cirrhosis.
29. The method of any one of claims 24 to 27, wherein the disease associated with fibrosis is liver fibrosis or cirrhosis.
- 15 30. A method for screening for a disease associated with fibrosis in a vertebrate comprising:
- (a) contacting a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against an activin polypeptide (or fragment or analogue thereof);
 - (b) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the 20 activin polypeptide; and
 - (c) comparing the amount of bound antibody to the amount bound in a reference sample, and diagnosing a disease associated with fibrosis in said vertebrate, wherein a change in the amount of bound antibody in the sample compared to the reference sample is indicative of disease.
- 25 31. A method for screening for a disease associated with fibrosis in a vertebrate comprising:
- (a) contacting a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against a follistatin polypeptide (or fragment or analogue thereof);
 - (b) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the 30 follistatin polypeptide; and
 - (c) comparing the amount of bound antibody to the amount bound in a reference sample, and diagnosing a disease associated with fibrosis in said vertebrate, wherein a change in the amount of bound antibody in the sample compared to the reference sample is indicative of disease.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

49

32. A method for screening for a disease associated with fibrosis in a vertebrate comprising:

(a) contacting a first aliquot of a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against an activin polypeptide (or fragment or analogue thereof);

5 (b) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the activin polypeptide; and

(c) contacting a second aliquot of a sample from the vertebrate with an antibody (or fragment thereof) raised against a follistatin polypeptide (or fragment or analogue thereof);

10 (d) detecting the presence of the antibody (or fragment thereof) bound to the follistatin polypeptide; and

(e) comparing the amount of activin-bound antibody to the amount of follistatin-bound antibody, and comparing the relative difference to that found in a reference sample, and diagnosing a disease associated with fibrosis in said vertebrate, wherein a change in 15 the relative ratio of activin- and follistatin-bound antibody in the sample compared to the reference sample is indicative of disease.

33. The method of any one of claims 30 to 32, wherein the reference sample is obtained from a vertebrate not suffering from a disease associated with fibrosis.

34. The method of any one of claims 30 to 32, wherein the sample within which 20 the method of screening is performed is a plasma or tissue sample, and involves standard histological and immunohistochemical techniques.

35. The method of any one of claims 30 to 34, wherein the disease associated 25 with fibrosis is one of: a hyperproliferative or inflammatory fibrotic diseases; a pulmonary fibrosis; an inflammatory bowel disease, or a related condition such as ulcerative colitis or Crohn's Disease; or liver fibrosis or cirrhosis.

36. The method of any one of claims 30 to 34, wherein the disease associated 25 with fibrosis is liver fibrosis or cirrhosis.

37. A diagnostic kit for the detection of a disease associated with fibrosis in a vertebrate, said kit comprising at least an antibody (or fragment thereof) raised against 30 activin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent.

38. A diagnostic kit for the detection of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said kit comprising at least an antibody (or fragment thereof) raised against 35

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

50

follistatin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent.

39. The kit of claim 37 or 38, which comprises the following containers:

(a) a first container containing at least the antibody (or fragment thereof), and;

5 (b) a second container containing a conjugate comprising a binding partner of the antibody (or fragment thereof), together with a detectable label.

40. A diagnostic kit for the detection of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said kit comprising at least: an antibody (or fragment thereof) raised against follistatin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent; and an antibody (or fragment thereof) raised against activin (or fragment thereof), together with a diagnostically acceptable carrier and/or diluent.

41. The kit of claim 40 which comprises the following containers:

(a) a first container containing at least an activin antibody (or fragment thereof), and;

15 (b) a second container containing at least a follistatin antibody (or fragment thereof);

(c) a third container containing a conjugate comprising a binding partner of the activin antibody (or fragment thereof), together with a detectable label, and

(d) a fourth container containing a conjugate comprising a binding partner of the

20 follistatin antibody (or fragment thereof), together with a detectable label.

42. A method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate, wherein said method comprises:

(a) inserting a nucleic acid molecule encoding for an activin antagonist, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic acid molecule encoding

25 for an activin antagonist or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell;

(b) expressing the nucleic acid molecule in the transformed cell.

43. The method of claim 42, wherein the activin antagonist is follistatin or fragment(s) or analogue thereof.

44. A method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis 30 in a vertebrate, wherein said method comprises:

(a) inserting a nucleic acid molecule which is antisense for a fragment of a nucleic acid molecule encoding for activin, an activin receptor, or other activin-associated transduction pathway molecule, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

51

comprising a nucleic acid molecule antisense for a nucleic acid molecule encoding for activin or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell.

(b) expressing the nucleic acid molecule in the transformed cell; and
wherein the expressed antisense nucleic acid molecule binds to the complementary
nucleic acid molecules encoding activin, activin receptor or other activin-associated
transduction pathway molecule thereby inhibiting the transcription or expression thereof.

45. The method of claim 44, wherein the antisense nucleic acid molecule is selected from the following:

a nucleic acid molecule that is antisense for at least a portion of the nucleic acid
sequence encoding activin A, activin AB or activin AB;

a nucleic acid molecule that is antisense for at least a portion of the nucleic acid
sequence encoding an activin receptor selected from ActRIIA or ActRIIB or ActRIA or
ActRIB or ALK2 or ALK4;

a nucleic acid molecule that is antisense for at least a portion of the nucleic acid
sequence encoding smad 2 or smad 3.

46. A method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis
in a vertebrate, wherein said method comprises:

inserting a nucleic acid molecule which is mutated form of a nucleic acid molecule
encoding for activin, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector comprising a nucleic
acid molecule which is a mutated form of the nucleic acid molecule encoding for activin
or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell;

wherein the mutated activin-encoding nucleic acid molecule integrates into the host
cell's native activin-encoding sequence by homologous recombination, thereby resulting
in either no or incorrect transcription of the activin sequence, or expression of a mutated
activin which does not bind to native activin receptors or interferes with normal activin-
signalling.

47. The method of claim 46, wherein the activin-encoding sequence is a
polynucleotide as defined in GenBank entry, accession number M13436 and/or M13437.

48. A method of gene therapy for the treatment of disease associated with fibrosis
in a vertebrate, wherein said method comprises:

inserting a nucleic acid molecule which is a mutated form of a nucleic acid
molecule encoding for an activin receptor, or fragment(s) or analogue thereof, or a vector
comprising a nucleic acid molecule which is a mutated form of the nucleic acid molecule
encoding for an activin receptor or a fragment(s) or analogue thereof, into a host cell;

WO 03/06057

PCT/AU02/00945

52

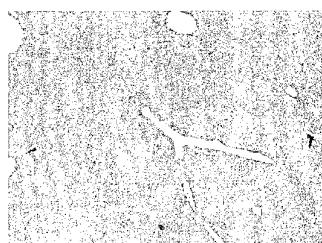
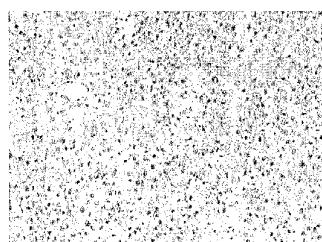
wherein the mutated form of the nucleic acid molecule encoding for an activin receptor or a fragment(s) or analogue thereof integrates into the host cell's native activin receptor-encoding sequence by homologous recombination, thereby resulting in either no or incorrect transcription of the activin receptor sequence, or expression of a mutated activin receptor which does not bind the native activin or interferes with activin-signalling.

49. The method of claim 48, wherein the activin receptor-encoding sequence is a polynucleotide encoding one of the following receptors: ActRIIA or ActRIIB or ActRIA or ActRIB or ALK2 or ALK4.

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

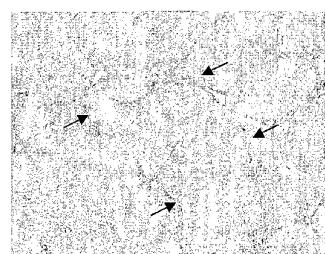
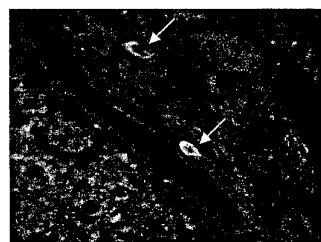
1/13

Fig. 1A**Fig. 1B**

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

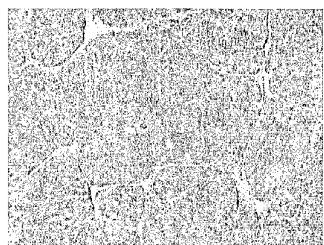
2/13

Fig. 2**Fig. 3**

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

3/13

Fig. 4

4/13

Fig. 5

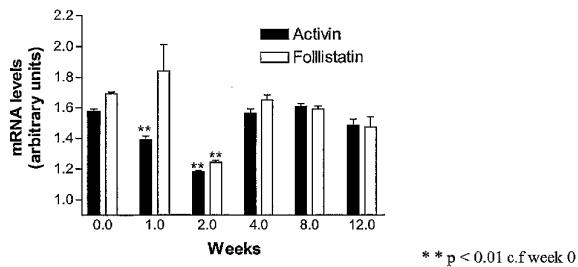
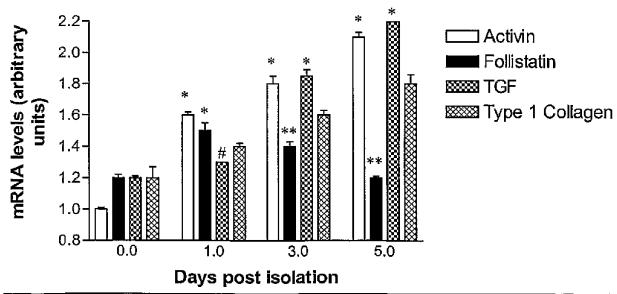


Fig. 6



* p < 0.01 c.f day 0; same group, ** p < 0.01 Activin A vs FS at relevant time points;
p < 0.05 activin A vs TGF

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

5/13

Fig. 7

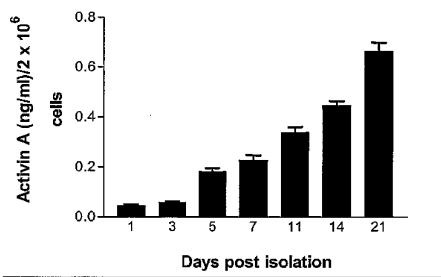
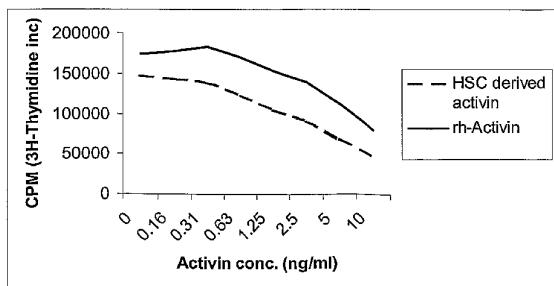


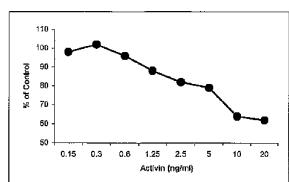
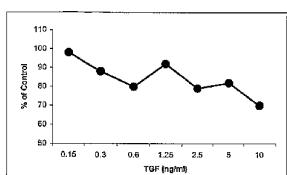
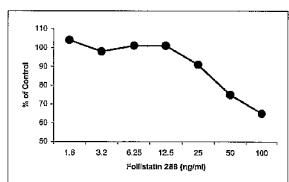
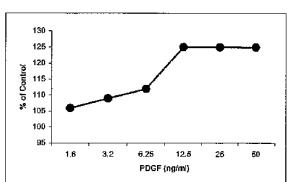
Fig. 8



WO 03/006057

PCT/AU02/00945

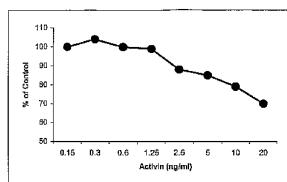
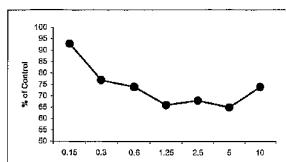
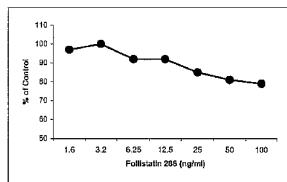
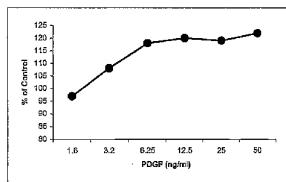
6/13

Fig. 9**Fig. 9A****Fig. 9B****Fig. 9C****Fig. 9D**

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

7/13

Fig. 10**Fig. 10A****Fig. 10B****Fig. 10C****Fig. 10D**

8/13

Fig. 11

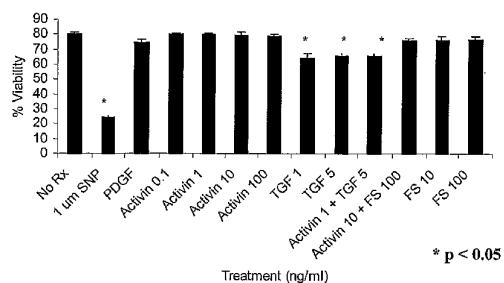
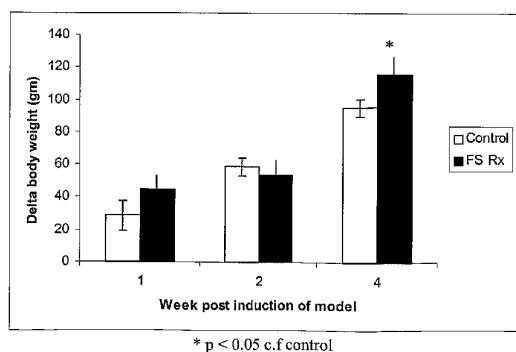


Fig. 12

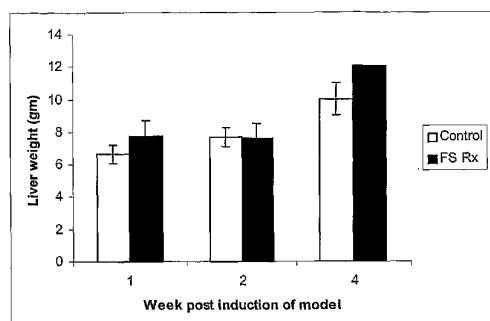


WO 03/006057

PCT/AU02/00945

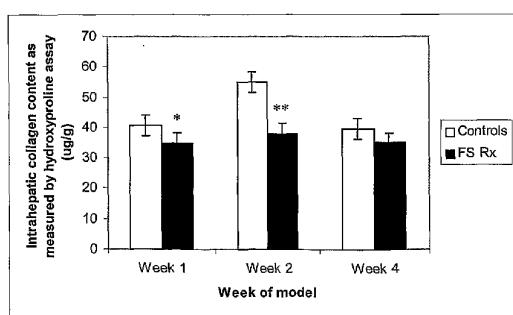
9/13

Fig. 13



All data non-significant

Fig. 14



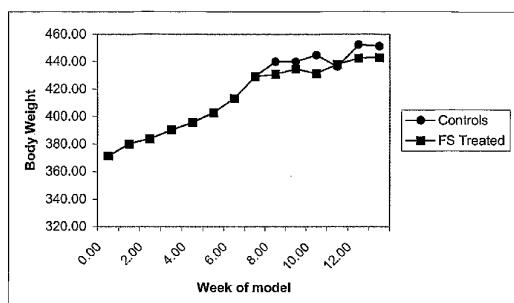
* p = 0.057, ** p < 0.005 cf with controls

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

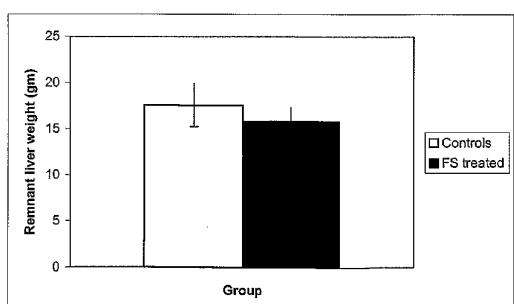
10/13

Fig. 15



All data non-significant

Fig. 16

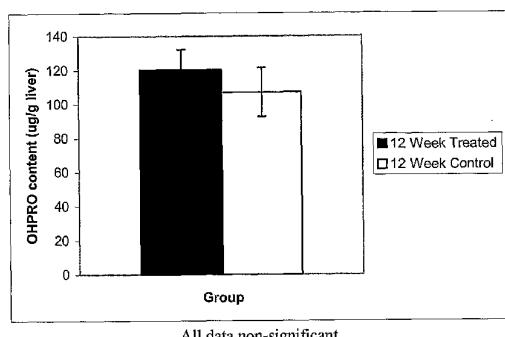


All data non-significant

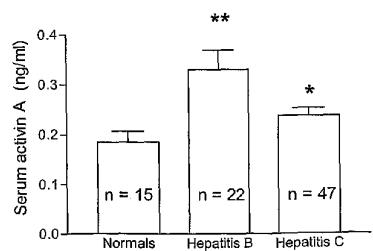
WO 03/006057

PCT/AU02/00945

11/13

Fig. 17

All data non-significant

Fig. 18

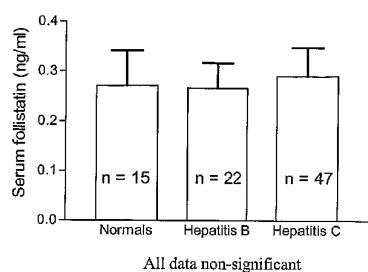
* p< 0.01 cf normals; ** p<0.05 cf normals and 0.01 cf HCV

WO 03/006057

PCT/AU02/00945

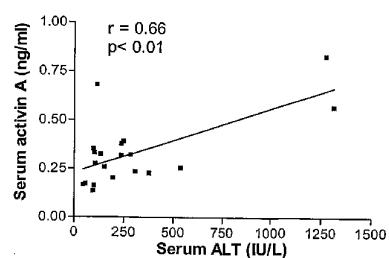
12/13

Fig. 19



All data non-significant

Fig. 20



13/13

Fig. 21

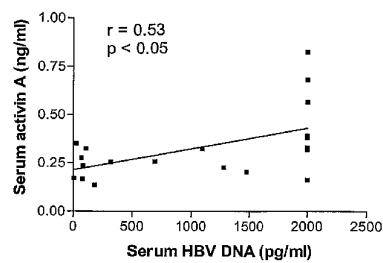
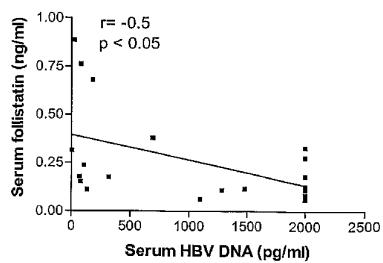


Fig. 22



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

[CORRECTED VERSION]

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau

(43) International Publication Date
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/006057 A1(51) International Patent Classification? A61K 39/395,
38/17, 48/00, 31/4174, A61P 43/00

FENNESSY, Paul [AU/AU]; Centre for Clinical Effectiveness, Monash University, Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU).

(21) International Application Number:
PCT/AU2002/000945

(74) Agent: SPRUSON & FERGUSON; GPO Box 3898, Sydney, NSW 2001 (AU).

(22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Publication Language: English

(48) Date of publication of this corrected version:
15 April 2004(30) Priority Data:
PR 6381 13 July 2001 (13.07.2001) AU(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 16/2004 of 15 April 2004, Section II

(71) Applicants (for all designated States except US): BIOA PTY LIMITED [AU/AU]; Level 1, 378 Victoria Road, Rydalmer, NSW 2116 (AU); MONASH UNIVERSITY [AU/AU]; Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PHILLIPS, David [AU/AU]; CO Monash Institute of Reproduction and Development, nt, 27-31 Wright Street, Clayton, VIC 3168 (AU); DE KRETSE, David [AU/AU]; Monash Medical Centre, 246 Clayton Road, Clayton, VIC 3168 (AU); SIEVERT, William [AU/AU]; Department of Medicine, Monash Medical Centre, 246 Clayton Road, Clayton, VIC 3168 (AU); PATELLA, Shar [AU/AU]; Department of Medicine, Monash University, Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU); SMOLICH, Joseph [AU/AU]; Centre for Heart and Chest Research, Monash University, Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU); MCCAW, David [AU/AU]; Centre for Heart and Chest Research, Monash University, Wellington Road, Clayton, VIC 3800 (AU).

(49) Published:
— with international search report

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR THE TREATMENT OF DISEASE

(57) Abstract: The present invention relates to pharmaceutical compositions for the treatment and/or prophylaxis of disease associated with fibrosis in a vertebrate, said composition comprising at least one activin antagonist, and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or diluent. The invention also relates to methods of treatment of disease associated with fibrosis in a vertebrate, as well as methods for diagnosing such conditions, and kits therefor.

WO 2003/006057 A1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00945																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																						
Int. Cl. ? A61K 39/395, A61K 38/17, A61K 48/00, A61K 31/4174, A61P 43/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																						
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Derwent WPAT and Medline Keywords: activin, follistatin, antagonist, triarylimidazole, receptor, fibrosis, cirrhosis, crohns()disease, inflammatory()bowel()disease and ulcerative()colitis																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
X	Ohga Eijiro et al. "Effects of Activin A on Proliferation and Differentiation of Human Lung Fibroblasts" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 228 No. 2, (1996), Pg. 391-396 See whole document.	1-49																				
X	Matsuse Takeshi et al. "Expression of Immunoreactive and Biocactive Activin A Protein in Adult Murine Lung after Bleomycin Treatment" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 13 No. 1, (July 1995), Pg. 17-24 See whole document	1-23 and 37-41																				
X	WO 99/10364 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 4 March 1999 See whole document	1-23 and 37-41																				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex																						
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 28 August 2002	Date of mailing of the international search report 9 SEP 2002																					
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: (02) 6285 3929	Authorized officer  ARATI SARDANA Telephone No.: (02) 6283 2627																					

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/0094S
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/11259 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 18 April 1996 See whole document	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/AU02/00945

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO	9910364	AU	89216/98	CA	2302525
		US	2001014464		EP 1015468
WO	9611259	AU	10390/95	ZA	9408092

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
// A 6 1 D 7/00	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 D 7/00	Z

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

- (72)発明者 フィリップス デイビット
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン ライト ストリート 27-31 モナシュ イン
スティチュート オブ リプロダクション アンド ディベロップメント内
- (72)発明者 デ クレトサー デイビット
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン クレイトン ロード 246 モナシュ メディカ
ル センター
- (72)発明者 シーベルト ウィリアム
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン クレイトン ロード 246 モナシュ メディカ
ル センター ディパートメント オブ メディシン
- (72)発明者 パテラ シーン
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン ウェーリントン ロード モナシュ ユニバーシテ
ィ ディパートメント オブ メディシン
- (72)発明者 スモーリッヒ ジョセフ
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン ウェーリントン ロード モナシュ ユニバーシテ
ィ センター フォー ハート アンド チエスト リサーチ
- (72)発明者 マクガウ デイビット
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン ウェーリントン ロード モナシュ ユニバーシテ
ィ センター フォー ハート アンド チエスト リサーチ
- (72)発明者 フェネシー ポール
オーストラリア国 ピクトリア クレイトン ウェーリントン ロード モナシュ ユニバーシテ
ィ センター フォー クリニカル エフェクティブネス

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 DC50 MA01 NA14
ZA36 ZA59 ZA66 ZA75 ZB11 ZC42
4C085 AA13 AA14 CC03 DD86 EE05 EE06
4C086 AA01 AA02 AA03 BC38 BC42 BC43 DA38 EA17 EA18 MA03
MA05 NA14 ZA36 ZA59 ZA66 ZA75 ZC42

(111)

JP 2005-506964 A 2005.3.10

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA01 NA14 ZA36 ZA59 ZA66 ZA75
ZC42

专利名称(译)	用于治疗疾病的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005506964A	公开(公告)日	2005-03-10
申请号	JP2003511863	申请日	2002-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	生物呼吁TY有限公司		
申请(专利权)人(译)	Baiao私人有限公司 莫纳什大学		
[标]发明人	フィリップスデイビット デクレトサー・デイビット シーベルト・ウィリアム パテラ・シェーン スマーリッヒ・ヨセフ マクガウ・ディビット フェネシ・ポール		
发明人	フィリップス・デイビット デ・クレト・サー・デイビット シーベルト・・ウイリアム パテラ・シェーン スマーリッヒ・ヨセフ マクガウ・・ディビット フェネシ・・ポール		
IPC分类号	G01N33/53 A61D7/00 A61K31/4164 A61K31/4174 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P9/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/22		
CPC分类号	A61K31/4174 A61K38/1709 A61K38/179 A61K38/1796 A61K38/22 A61K48/00 A61K2039/505 A61P1 /04 A61P1/16 A61P9/00 A61P11/00 A61P19/04 A61P29/00 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/22 G01N2333/495 G01N2800/065 G01N2800/085 G01N2800/12 G01N2800/7052		
FI分类号	A61K45/00 A61K31/4164 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1 /04 A61P1/16 A61P9/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P43/00.111 G01N33/53.N A61K37/02 A61D7/00.Z		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084 /DC50 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA75 4C084/ZB11 4C084/ZC42 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/DD86 4C085/EE05 4C085/EE06 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/BC38 4C086/BC42 4C086/BC43 4C086/DA38 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA03 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086 /ZA75 4C086/ZC42 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA75 4C087/ZC42		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001PR6381 2001-07-13 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗和/或预防脊椎动物中纤维化相关疾病的药物组合物，该组合物包含至少一种激活素拮抗剂和任选的药学上可接受的载体，佐剂和/或稀释剂。本发明还涉及治疗脊椎动物纤维化相关疾病的方法，以及诊断这些病症的方法，及其试剂盒。

【図3】

