

(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2015-530390

(P2015-530390A)

(43) 公表日 平成27年10月15日(2015.10.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/78 (2006.01)	C07K 14/78 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C076
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 142 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-532042 (P2015-532042)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月12日 (2013. 9. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月16日 (2015. 4. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/059458
 (87) 国際公開番号 W02014/043344
 (87) 国際公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
 (31) 優先権主張番号 61/780, 005
 (32) 優先日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/700, 697
 (32) 優先日 平成24年9月13日 (2012. 9. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391015708
 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
 パニー
 BRISTOL-MYERS SQUIB
 B COMPANY
 アメリカ合衆国08543ニュージャージ
 ー州プリンストン、ルート206アンド・
 プロビンス・ライン・ロード
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミオスタチンと結合するフィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、ミオスタチンと結合するフィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質に関する。本発明は、筋ジストロフィー、悪液質、骨格筋減少症、変形性関節症、骨粗鬆症、糖尿病、肥満、COPD、慢性腎疾患、心不全、心筋梗塞、および線維症を治療するための治療的適用における該タンパク質の使用にも関する。本発明は、さらに、該タンパク質を含む細胞、該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその断片、および該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

フィブロネクチンタイプIII第10ドメイン($^{10}\text{Fn3}$)を含むポリペプチドであって、
 該 $^{10}\text{Fn3}$ がヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメインの対応するループの配列と比べて変化したアミノ酸配列を含むループBC、DE、およびFGから選ばれる少なくとも1のループを有し、
 500nM以下のKDでミオスタチンと結合するポリペプチド。

【請求項2】

(a)BCループが、表15に記載の式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列

[式中、

(i) X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(ii) X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる；

(iii) X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる、

(iv) X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(v) X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(vi) X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる；

(vii) X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(viii) X_{58} は、A、C、G、L、M、S、およびTからなる群から選ばれる；および

(ix) X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYからなる群から選ばれる。]

を含み、

(b)DEループは、表15に記載の式： $G-R-G-X_{60}$ （ここで、 X_{60} は、A、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる）で示されるアミノ酸配列を含み、
 および/または

(c)FGループが、表15に記載の式 $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列

[式中、

(i) X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(ii) X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(iii) X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(iv) X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(v) X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(vi) X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(vii) X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(viii) X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(ix) X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる；

(x) X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。]

を含む請求項1記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 3】

BCループが、配列番号34、7、11~21、23~31、および36~38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 4】

DEループが、配列番号39および42からなる群から選ばれるアミノ酸を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5】

FGループが、配列番号75、46、50~62、64~72、76、77、および79からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 6】

BCループが配列番号34のアミノ酸配列を含み、DEループが配列番号39を含み、FGループが配列番号75を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号331、273、281、または118で示される非BC、DE、およびFGループ領域と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号331、273、80~123、228~239、252~272、または281のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%同一なアミノ酸配列を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号3のアミノ酸56~66内の領域と結合する、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号3のアミノ酸85~101および56~66内の領域と結合する請求項9記載のポリペプチド。

【請求項 11】

ミオスタチンとの結合についてActRIIBと競合する、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 12】

ミオスタチンとの結合についてALK4および/またはALK5と競合する、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 13】

さらに、ポリエチレングリコール、シアル酸、Fc、Fc断片、トランスフェリン、血清アルブミン、血清アルブミン結合タンパク質、および血清免疫グロブリン結合タンパク質からなる群から選ばれる1またはそれ以上の薬物動態学的(PK)部分を含む、先の請求項のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 14】

先の請求項のいずれかに記載のポリペプチドおよび担体を含む医薬組成物。

【請求項 15】

請求項1~13のいずれかに記載のポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 16】

請求項1~13のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸を含む細胞。

【請求項 17】

有効量の、請求項1~14のいずれかに記載のポリペプチドまたは組成物を投与することを含む対象のミオスタチン関連疾患または障害を軽減または阻害する方法。

【請求項 18】

対象に対するポリペプチドの投与が以下の生物学的効果の少なくとも1つをもたらす請求項17記載の方法：

(a) 筋肉量の増加；

10

20

30

40

50

- (b) 筋肉細胞の数の増加；
- (c) 筋肉細胞の大きさの増加；および
- (d) 筋肉強度の増加。

【請求項 19】

対象に対するポリペプチドの投与が以下の生物学的効果の少なくとも1つをもたらす請求項17記載の方法：

- (a) インスリン感受性の増加；
- (b) 対象における細胞によるグルコース取り込みの増加；
- (c) 血液グルコースレベルの低下；および
- (d) 体脂肪の減少。

10

【請求項 20】

試料と請求項1~13のいずれかに記載のポリペプチドを接触させ、該ポリペプチドとミオスタチンとの結合を検出または測定することを含む試料中のミオスタチンを検出または測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の参照)

本願は、米国仮出願No. 61/700,697 (発明の名称「Fibronectin based scaffold domain proteins that bind to myostatin」、2012年9月13日出願)および米国仮出願No. 61/780,005 (発明の名称「Fibronectin based scaffold domain proteins that bind to myostatin」、2013年3月13日出願)の優先権を主張する(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。

20

【0002】

本発明は、ミオスタチンと結合するフィブロネクチンベースの足場ドメインタンパク質に関する。本発明は、筋肉消耗疾患および代謝障害を治療するための治療的適用における革新的タンパク質の使用にも関する。本発明は、さらに、該タンパク質を含む細胞、該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその断片、および該革新的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

30

【背景技術】

【0003】

成長および分化因子-8(GDF-8)としても知られるミオスタチンは、分泌成長因子の形質転換成長因子-(TGF-)スーパーファミリーのメンバーである。ミオスタチンは、TGF-ファミリータンパク質と共通の以下のすべての構造的特徴を有する：分泌シグナルとして作用する疎水性アミノ末端、9不変システイン残基、および「RXXR」フリント型タンパク質分解処理部位。該タンパク質のタンパク質分解的開裂は、ミオスタチンの生物学的活性型であるモノダイマーを形成するC末端ドメインを生じる(Thies et al., Growth Factors 2001; 18(4): 251-9)。複数の脊椎動物種由来のミオスタチンアミノ酸配列のC末端断片のアラインメントは、該タンパク質がヒト、サル、ウシ、イヌ、マウス、ラット、シチメンチョウ、およびニワトリの間で高度に保存されている(100%同一)ことを示す(McPherron, et al. PNAS, 94: 12457-61, 1997)。ミオスタチン発現は、主として骨格筋と脂肪組織に限られ、骨格筋の発達のための調節因子であることが示されている(Lee LS, Immunol Endocr Metab Agents Med Chem. 2010; 10: 183-194)。哺乳動物において、骨格筋は、ミオスタチンの主な標的組織であるようであり、ミオスタチンは、細胞表面レセプターと結合し、筋肉の減少をもたらす。ミオスタチンが遺伝的に欠損しているマウスおよびウシは、骨格筋量の顕著な増加を示し(すなわち「筋肉倍増(double muscling)」表現型)、筋肉成長の抑制におけるミオスタチンの役割を示唆する(McPherron and Lee, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23; 100(26): 15842-6)。Belgian BlueおよびPiedmontese牛における筋肥大は、ウシミオスタチン遺伝子の第3エクソン内のミスセンス突然変異による(Bass et al., Domest Anim Endocrinol. 1999; 17(2-3): 191-7)。また、ミオスタ

40

50

チン阻害因子のトランスジェニック過剰発現は、過剰な筋の発達 (hyper-muscularity) をもたらす。これら動物における筋成長の増強は、細胞数の増加 (すなわち過形成的成長) および細胞サイズの増加 (すなわち肥大的成長) により、より大きな重い筋繊維を生じる。ミオスタチン突然変異による骨格筋量の増加はヒトでも報告されている。ミオスタチン阻害は、生後期および成体の両方で骨格筋の量と強度を効果的に増加させる。

【0004】

骨格筋の量および強度の増加は、身体組成、エネルギー消費、グルコース恒常性、およびインスリン要求に良い影響を与える代謝的適応にも関連する。遺伝的知見および薬理的知見は共に、ミオスタチンはエネルギー代謝を調節し、その阻害は肥満および糖尿病を含む代謝疾患の進行を顕著に軽減させることができることを示唆する。例えば、ミオスタチンヌルマウスは、同年齢の野生型マウスに比べて体脂肪蓄積の減少を示す (McPherron & Lee, J. JCI 109: 595, 2002)。この体脂肪の減少は、脂肪細胞の数と大きさの減少の兆候であり、脂質生成と筋形成におけるミオスタチンの重要な役割を示唆する。

10

【0005】

したがって、ミオスタチンは、筋肉量、筋肉強度および/または代謝の増加が有益な障害または病状 (例えば、筋ジストロフィー、虚弱、非活動性萎縮、および悪液質)、筋肉消耗関連障害 (例えば、腎疾患、心不全または心疾患、および肝疾患)、および代謝障害 (例えば、II型糖尿病、メタボリックシンドローム、肥満、および変形性関節症) を治療するための治療的または予防的介入の望ましい標的である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、例えば、代謝障害、筋肉消耗障害、および不活動による筋肉減少の治療的処置のためのミオスタチンと結合する改良されたフィブロネクチンドメイン足場タンパク質を得ることが好都合であろう。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要約)

本発明は、少なくとも一部は、ミオスタチンと結合し、拮抗するアドネクチンの発見に基づく。具体的には、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、ミオスタチン活性を阻害することにより下流SMADシグナル伝達に影響を及ぼす。本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのいくつかのSMADシグナル伝達の変化に關与する機序には、ミオスタチン-ActRIIb複合体に対するAlk4リクルートメントの阻害が含まれ、その生理学的な結果として筋肉容積および体重が増加する。

30

【0008】

ある局面において、本発明は、ヒト¹⁰Fn3ドメインの対応するループのアミノ酸配列と比べてアミノ酸配列が変化したループBC、DE、およびFGから選ばれる少なくとも1のループを有するフィブロネクチンIII型第10ドメイン(¹⁰Fn3)を含む、ミオスタチンと結合するポリペプチドを提供する。ある態様において、該ポリペプチドは、500nM未満のK_Dでミオスタチンと結合する。

40

【0009】

ある態様において、本発明のポリペプチドのBCループは、式: X₁-L-P-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇で示されるアミノ酸配列を含む [式中、(a) X₁は、S、T、およびYからなる群から選ばれ; (b) X₂は、H、Y、N、R、F、G、S、およびTからなる群から選ばれ; (c) X₃は、A、P、Q、S、F、H、N、およびRからなる群から選ばれ; (d) X₄は、G、およびAからなる群から選ばれ; (e) X₅は、H、L、R、V、N、D、F、I、およびKからなる群から選ばれ; (f) X₆は、A、L、G、M、F、I、およびVからなる群から選ばれ; (g) X₇は、H、およびNからなる群から選ばれる。]。ある態様において、X₁はSであり、および/またはX₂はHまたはYであり、および/またはX₃はAまたはPであり、および/またはX₄はGであり、および/またはX₅はH、LまたはRであり、および/またはX₆はAまたはLであり、および/またはX₇はHである。]。

50

【 0 0 1 0 】

他の態様において、該BCループは式： $X_{19}-X_{20}-P-X_{21}-G-X_{22}-A$ で示されるアミノ酸配列を含む〔式中、(a) X_{19} は、D、E、V、およびWからなる群から選ばれ；(b) X_{20} は、A、S、およびVからなる群から選ばれ；(c) X_{21} は、R、A、G、K、およびLからなる群から選ばれ；および(d) X_{22} は、L、およびRからなる群から選ばれる。〕。ある態様において、 X_{19} はDであり、および/または X_{20} はA、SまたはVであり、および/または X_{22} はLである。

【 0 0 1 1 】

ある態様において、該DEループは、式： $G-R-G-X_8$ （ここで、 X_8 はVまたはLである。）で示されるアミノ酸配列を含む。ある態様において、該DEループは、式： $X_{23}-G-R-G-X_{24}$ で示されるアミノ酸配列を含む〔式中、(a) X_{23} は、V、P、F、I、およびLからなる群から選ばれ；(b) X_{24} は、S、N、およびTからなる群から選ばれる。〕。

10

【 0 0 1 2 】

ある態様において、本発明のポリペプチドのFGループは、式： $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ で示されるアミノ酸配列を含む〔式中、(a) X_9 は、L、V、およびIからなる群から選ばれ；(b) X_{10} は、T、およびSからなる群から選ばれ；(c) X_{11} は、K、R、A、G、S、D、H、N、T、およびPからなる群から選ばれ；(d) X_{12} は、S、T、A、E、H、K、およびNからなる群から選ばれ；(e) X_{13} は、K、G、Q、D、E、N、T、およびSからなる群から選ばれ；(f) X_{14} は、V、I、F、L、M、P、T、およびYからなる群から選ばれ；(g) X_{15} は、I、L、およびYからなる群から選ばれ；(h) X_{16} は、H、I、V、K、L、R、F、G、S、およびTからなる群から選ばれ；(i) X_{17} は、Y、およびHからなる群から選ばれ；(j) X_{18} は、K、M、L、R、およびVからなる群から選ばれる。〕。

20

【 0 0 1 3 】

ある態様において、 X_9 はLまたはVであり、および/または X_{10} はTであり、 X_{11} はKまたはRであり、および/または X_{12} はSまたはTであり、および/または X_{13} はK、GまたはQであり、および/または X_{14} はVまたはIであり、および/または X_{15} はIであり、および/または X_{16} はH、IまたはVであり、および/または X_{17} はYであり、および/または X_{18} はKまたはMである。〕。

【 0 0 1 4 】

他の態様において、該FGループは、式： $X_{25}-X_{26}-R-X_{27}-G-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}$ で示されるアミノ酸配列を含む〔式中、(a) X_{25} は、I、およびVからなる群から選ばれ；(b) X_{26} は、F、D、およびYからなる群から選ばれ；(c) X_{27} は、D、およびTからなる群から選ばれ；(d) X_{28} は、P、M、V、およびTからなる群から選ばれ；(e) X_{29} は、V、L、N、R、およびSからなる群から選ばれ；(f) X_{30} は、H、T、L、N、Q、およびSからなる群から選ばれ；(g) X_{31} は、F、W、Y、H、およびLからなる群から選ばれ；(h) X_{32} は、D、A、およびGからなる群から選ばれる。〕。

30

【 0 0 1 5 】

ある態様において、 X_{25} はIであり、および/または X_{26} はFであり、および/または X_{27} はDであり、および/または X_{28} はPであり、および/または X_{29} はVであり、および/または X_{30} はHまたはTであり、および/または X_{31} はFまたはWであり、および/または X_{32} はDである。

【 0 0 1 6 】

ある態様において、該ポリペプチドは、BCループおよびDEループ、またはBCループおよびFGループ、またはDEループおよびFGループ、またはBCループ、DEループおよびFGループを含む。

40

【 0 0 1 7 】

ある態様において、該ポリペプチドのBCループは、配列番号7~38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む。他の態様において、該DEループは、配列番号39~45からなる群から選ばれるアミノ酸を含む。さらなる他の態様において、該FGループは、配列番号46~79からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む。ある態様において、該BC、DE、またはFGループのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号7~38、39~45、および46~79のいずれかと少なくとも80%同一である。他の態様において、該ポリペプチドは、配列番号80~123、2

50

28～239、および252～273のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を含む。さらなる他の態様において、該ポリペプチドは、配列番号80～123、228～239、および252～273からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む。

【0018】

ある態様において、該ポリペプチドは、表1に記載のBC、DE、およびFGループの組み合わせを含む。ある態様において、該ポリペプチドは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを有する。

【0019】

ある態様において、該ポリペプチドはそれぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、該BCループは、1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCループは、式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} で示されるアミノ酸配列を有する[式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。]

10

【0020】

ある態様において、該ポリペプチドは、それぞれ配列番号34、39、および75で示されるBC、DE、およびFGループを含み、該DEループは、1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該DEループは、式： G -R- G - X_{40} （ここで、 X_{40} はLである。）で示されるアミノ酸配列を有する。

20

【0021】

ある態様において、該ポリペプチドは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、該FGループは、1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該FGループは、式： X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} で示されるアミノ酸配列を有する[式中、 X_{41} は、LまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。]

30

【0022】

ある態様において、該ポリペプチドは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、該BCループは1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該DEループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCループは式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} で示されるアミノ酸配列[式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。]を有し、該DEループは式： G -R- G - X_{40} で示されるアミノ酸配列（ここで、 X_{40} はLである）を有する。

40

【0023】

ある態様において、該ポリペプチドはそれぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、該BCループは1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該FGループは1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCループは式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} で示されるアミノ酸配列を有し[式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTを有し； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。]、該FGループは式： X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} で示されるアミノ酸配列を有する[式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q

50

、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。]。

【 0 0 2 4 】

ある態様において、該ポリペプチドは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGグループを含み、該DEグループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該FGグループは1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該DEグループは、式： $G-R-G-X_{40}$ で示されるアミノ酸配列を有し（ここで、 X_{40} はLである）、該FGグループは、式： $X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}$ で示されるアミノ酸配列を有する [式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。]。

10

【 0 0 2 5 】

ある態様において、該ポリペプチドそれぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGグループを含み、該BCグループは1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該DEグループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該FGグループは1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCグループは、式： $X_{33}-L-P-X_{34}-X_{35}-X_{36}-X_{37}-X_{38}-X_{39}$ で示されるアミノ酸配列を有する [式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHであり；該DEグループは、式： $G-R-G-X_{40}$ で示されるアミノ酸配列を有し [式中、 X_{40} はLである。]、該FGグループは、式： $X_{41}-X_{42}-X_{43}-X_{44}-X_{45}-X_{46}-X_{47}-X_{48}-X_{49}-X_{50}$ で示されるアミノ酸配列を有する [式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。]。

20

30

【 0 0 2 6 】

ある態様において、該ポリペプチドは、それぞれ配列番号34、39、および75で示されるBC、DE、およびFGグループを含み、BC、DE、およびFGグループ中に該ポリペプチドがミオスタチンとの結合を維持することができるアミノ酸置換を有する。該アミノ酸置換は、例えば、実施例8に記載のディープミューテーションスキャンニングにより決定することができる。したがって、ある態様において、該ポリペプチドは式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列を含むBCグループを有する [式中、 X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる； X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる； X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{58} は、A、C、G、L、M、S、およびTからなる群から選ばれる； X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYからなる群から選ばれる。]。好ましい態様において、 X_{51} は、C、F、I、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{52} は、Lからなる群から選ばれ； X_{53} は、Pからなる群から選ばれ； X_{54} は、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{56} は、Gからなる群から選ばれ； X_{57} は、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W、およ

40

50

びYからなる群から選ばれ； X_{58} は、A、G、L、M、およびSからなる群から選ばれ； X_{59} は、C、H、N、Q、S、およびYからなる群から選ばれる。より好ましい態様において、 X_{51} は、F、S、およびWからなる群から選ばれる； X_{52} は、Lからなる群から選ばれる； X_{53} は、Pからなる群から選ばれる； X_{54} は、からなる群から選ばれる、C、F、G、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} は、Gからなる群から選ばれる； X_{57} は、A、C、H、K、L、M、N、R、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{58} は、A、G、およびLからなる群から選ばれる；および X_{59} は、H、N、およびQからなる群から選ばれる。具体的態様において、 X_{51} はSであり； X_{52} はLであり； X_{53} はPであり； X_{54} はHであり； X_{55} はQであり； X_{56} はGであり； X_{57} はKであり； X_{58} はAであり； X_{59} はNである。

10

【0027】

ある態様において、該ポリペプチドは、式： $G-R-G-X_{60}$ で示されるアミノ酸配列を含むDループを含む（ここで、 X_{60} はA、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVである）。好ましい態様において、 X_{60} はC、E、I、L、M、Q、T、およびVである。より好ましい態様において、 X_{60} はC、E、I、L、M、およびVである。具体的態様において、 X_{60} はVである。

【0028】

ある態様において、該ポリペプチドは、式： $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列を含むFGループを含む〔式中、 X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。好ましい態様において、 X_{61} は、A、C、I、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{62} は、C、F、H、I、L、M、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、C、F、I、L、M、P、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、C、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、およびVからなる群から選ばれる。より好ましい態様において、 X_{61} は、IおよびVからなる群から選ばれる； X_{62} は、C、F、I、L、M、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、F、G、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、G、S、T、およびWからなる群から選ばれる； X_{66} は、F、I、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、F、H、I、L、M、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、F、G、I、K、L、M、T、V、およびWからなる群から選ばれる； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、G、K、L、M、P、Q、およびRからなる群から選ばれる。具体的態様において、 X_{61} はVであり； X_{62} はTであり； X_{63} はDであり； X_{64} はTであり； X_{65} はGであり； X_{66} はYであり； X_{67} はLであり； X_{68} はKであり； X_{69} はYであり； X_{70} はKである。

20

30

40

【0029】

50

ある態様において、本発明のポリペプチドは、BC、DE、およびFGループを含み、該BCループは、式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列を含み [式中、 X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる； X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる； X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{58} は、A、C、G、L、M、S、およびTである；および X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYである。]；該DEループは、式： $G-R-G-X_{60}$ で示されるアミノ酸配列を含み [式中、 X_{60} は、A、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる]；該FGループは、式： $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列を含む [式中、 X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。]。

10

20

30

40

【 0 0 3 0 】

好ましい態様において、本発明のポリペプチドは、BC、DE、およびFGループを含み、該BCループ式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列を含み [式中、 X_{51} は、C、F、I、S、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{52} はLである； X_{53} はPである； X_{54} は、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} はGである； X_{57} は、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{58} は、A、G、L、M、およびSからなる群から選ばれる； X_{59} は、C、H、N、Q、S、およびYからなる群から選ばれる。]；該DEループは、式： $G-R-G-X_{60}$ で示されるアミノ酸配列を含み [式中、 X_{60} は、C、E、I、L、M、Q、T、およびVからなる群から選ばれる。]；該FGループは、式： $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列を含む [式中、 X_{61} は、A、C、I、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{62} は、C、F、H、I、L、M、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、C、F、I、L、M、P、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、C、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。]。

【 0 0 3 1 】

より好ましい態様において、本発明のポリペプチドは、BC、DE、およびFGループを含み、該BCループ式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列を含み [式中、 X_{51} は、F、S、およびWからなる群から選ばれる； X_{52} はLである； X_{53} はPである； X_{54} は、C、F、G、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55}

50

は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる；
 X_{56} はGである； X_{57} は、A、C、H、K、L、M、N、R、V、W、およびYからなる群から選ばれる
 ； X_{58} は、A、G、およびLからなる群から選ばれる； X_{59} は、H、N、およびQからなる群から
 選ばれる。]；該DEループは式： $G-R-G-X_{60}$ で示されるアミノ酸配列を含み[式中、 X_{60} は
 、C、E、I、L、M、およびVからなる群から選ばれる。]；および該FGループは、式： $X_{61}-$
 $X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列を含む[式中、 X_{61} は、I
 およびVからなる群から選ばれる； X_{62} は、C、F、I、L、M、T、V、W、およびYである； X_{63}
 は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる； X_{64}
 は、A、C、D、F、G、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65}
 は、A、G、S、T、およびWからなる群から選ばれる； X_{66} は、F、I、V、W、およびYからなる
 群から選ばれる； X_{67} は、F、H、I、L、M、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68}
 は、A、C、F、G、I、K、L、M、T、V、およびWからなる群から選ばれる； X_{69} は、WおよびY
 からなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、G、K、L、M、P、Q、およびRからなる群から
 選ばれる。]。

10

【0032】

具体的態様において、本発明のポリペプチドは、BC、DE、およびFGループを含み、該BC
 ループは、式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列を含み[
 式中、 X_{51} はSである； X_{52} はLである； X_{53} はPであり； X_{54} はHであり； X_{55} はQであり； X_{56}
 はGであり； X_{57} はKであり； X_{58} はAであり； X_{59} はNである。]；該DEループは、式： $G-R-G-$
 X_{60} で示されるアミノ酸配列を含み[式中、 X_{60} はVである]；該FGループは、式： $X_{61}-X_{62}-$
 $X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列を含む[式中、 X_{61} はVであ
 り； X_{62} はTであり； X_{63} はDであり； X_{64} はTであり； X_{65} はGであり； X_{66} はYであり； X_{67} はL
 であり； X_{68} はKであり； X_{69} はYであり；および X_{70} はKである。]。

20

【0033】

別の態様において、該ポリペプチド1は、配列番号273[PRD-1474]、配列番号118[3116_A06]
 、配列番号281[N末端伸張配列 (GVSDVPRDL)が先行し、C末端テール(EI)が続くPRD-1474
 および3116_A06のコアアドネクチン配列]または配列番号331[N末端リーダー配列またはC
 末端テールを含まないPRD-1474および3116_A06のコアアドネクチン配列]に記載のアミノ
 酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一
 なアミノ酸配列を含む。さらに別の態様において、該ポリペプチドは、配列番号118、273
 、281、または331の非BC、DE、およびFGループ領域と少なくとも80%、85%、90%、95%
 、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む。

30

【0034】

別の局面において、本発明は、ミオスタチン上の不連続アドネクチン結合部位と結合す
 るポリペプチドを提供する。ある態様において、該ポリペプチドは、ミオスタチン(配列
 番号3)のアミノ酸55-66内の領域と結合する。ある態様において、該ポリペプチドは、ミ
 オスタチン(配列番号3)のアミノ酸85-101内の領域と結合する。さらなる他の態様におい
 て、該ポリペプチドは、ミオスタチン(配列番号3)の2領域アミノ酸85-101および55-66内
 と結合する。

【0035】

ある態様において、本発明の該ポリペプチドは、ミオスタチンとActRIIBとの結合に競
 合しない。ある態様において、本発明の該ポリペプチドは、ミオスタチンとALK4および/
 またはALK5との結合に競合する。

40

【0036】

ある態様において、上記該ポリペプチドは、1またはそれ以上の薬物動態学的(PK)部分
 、例えばポリエチレングリコール、シアル酸、Fc、Fc断片、トランスフェリン、血清アル
 ブミン、血清アルブミン結合タンパク質、および血清免疫グロブリン結合タンパク質を含
 みうる。ある態様において、該PK部分は、例えばHSAと結合する¹⁰F_n3ドメインを含む血清
 アルブミン結合タンパク質である。別の態様において、該PK部分はFcであり、該ポリペ
 プチドのNまたはC末端上にあり、所望によりダイマーを形成することができる。さらなる他

50

の態様において、該PK部分はポリエチレングリコールである。ある態様において、該PK部分およびポリペプチドは少なくとも1のジスルフィド結合、ペプチド結合、ポリペプチド、ポリマー糖またはポリエチレングリコール部分を介して結合する。

【0037】

別の局面において、本発明は、所望によりエンドトキシン不含の、上記ポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。別の局面において、本発明は、上記ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、ヌクレオチド配列を含む発現ベクター、および該ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を提供する。別の局面において、本発明は、該細胞を培養することにより抗ミオスタチンポリペプチドを製造する方法を提供する。

【0038】

別の局面において、本発明は、有効量の該ポリペプチドまたは上記ポリペプチドを含む組成物を投与することにより対象のミオスタチン関連疾患または障害を軽減または阻害する方法を提供する。ある態様において、治療する疾患は、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、封入体筋炎 (IBM)、鬱血性閉塞性肺疾患、慢性心不全、癌、AIDs、腎不全、慢性腎疾患、尿毒症、リウマチ性関節炎、骨格筋減少症、長期安静による筋肉の消耗、脊髄損傷、卒中、骨折、老化、糖尿病、肥満、高血糖症、悪液質、変形性関節症、骨粗鬆症、心筋梗塞、または線維症である。

【0039】

別の局面において、本発明は、対象の筋肉の変性または消耗と関連する障害を軽減または阻害する方法を提供する。

【0040】

別の局面において、本発明は、対象の筋肉量を増加させ、筋肉細胞数を増加させ、筋肉細胞の大きさを増大させ、筋肉強度、身体能力および/または持久力を増大させるために該ポリペプチドを投与する方法を提供する。

【0041】

別の局面において、本発明は、対象の代謝障害を軽減または阻害する方法を提供する。ある態様において、該代謝障害は、糖尿病 (例えば、II型糖尿病)、高血糖症、高インスリン血症、高脂血症、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、リポジストロフィ、肥満、またはメタボリックシンドロームである。ある態様において、第2治療用組成物を投与することができる。他の態様において、該ポリペプチドの投与は、インスリン感受性の増加、細胞によるグルコース摂取の増加、血糖値の低下、および/または体脂肪の減少をもたらす。

【0042】

別の局面において、本発明は、有効量の上記ポリペプチドまたは組成物を投与することを含む対象の除脂肪筋肉量を増加させる方法を提供する。

【0043】

別の局面において、本発明は、有効量の上記ポリペプチドまたは組成物を投与することを含む対象の除脂肪筋肉量/脂肪比を増加する方法を提供する。

【0044】

別の局面において、本発明は、上記ポリペプチドまたは組成物および使用説明書を含むキットを提供する。

【0045】

別の局面において、本発明は、試料と上記ポリペプチドを接触させ、次いで該ポリペプチドとミオスタチンとの結合を検出または測定することを含む試料中のミオスタチンの検出または測定方法を提供する。

【0046】

別の局面において、本発明は、対象のミオスタチン関連疾患または障害を軽減または阻害し、筋肉の変性または消耗関連障害を軽減または阻害し、筋肉量を増加させ、筋肉細胞数を増加させ、筋肉細胞の大きさを増加させ、筋肉強度、身体能力および/または持久力を増加させ、代謝障害を軽減または阻害し、除脂肪筋肉量を増加させ、および/または除

10

20

30

40

50

脂肪筋肉量/脂肪比を増加させるのに用いる抗ミオスタチン結合アドネクチンに関する。ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、本明細書に記載のもの、例えば、配列番号80~123、228~239、および252~273に記載の抗ミオスタチンアドネクチンである。

【0047】

別の局面において、本発明は、対象のミオスタチン関連疾患または障害を軽減または阻害し、筋肉の変性または消耗と関連する障害を軽減または阻害し、筋肉量を増加させ、筋肉細胞数を増加させ、筋肉細胞の大きさを増加させ、筋肉強度、身体能力および/または持久力を増加させ、代謝障害を軽減または阻害し、除脂肪筋肉量を増加させ、および/または除脂肪筋肉量/脂肪比を増加させるための医薬を製造するための抗ミオスタチン結合アドネクチンの使用に関する。ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、本明細書に記載のもの、例えば、配列番号80~123、228~239、および252~273に記載の抗ミオスタチンアドネクチンである。

10

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】典型的抗ミオスタチンアドネクチンアミノ酸配列のアラインメントを示す。該BC、DE、およびFGループアミノ酸配列は、それぞれアンダーライン、イタリック体/アンダーラインまたは太字/アンダーラインにより示される。

【図2】1979_B06ファミリーの抗ミオスタチンアドネクチンの該BCループの種々の残基のWebLogoに基づく分析を示す。PRO融合中に変化するBCループの各位置のアミノ酸の頻度を示す。該画像は、WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A

20

配列 logo generator. Genome Research 2004; 14: 1188-1190)を用いて作成した。

【図3】1979_B06ファミリーの抗ミオスタチンアドネクチンの該DEループの種々の残基のWebLogoに基づく分析を示す。PRO融合中に変化する該DEループの各位置のアミノ酸の頻度を示す。

【図4】1979_B06ファミリーの抗ミオスタチンアドネクチンの該FGループの種々の残基のWebLogoに基づく分析を示す。PRO融合中に変化する該FGループの各位置のアミノ酸の頻度を示す。

【図5】2062_G02ファミリーの抗ミオスタチンアドネクチンの該BCループの種々の残基のWebLogoに基づく分析を示す。PRO融合中に変化するBCループの各位置のアミノ酸の頻度を示す。該画像は、WebLogo (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A

30

配列 logo generator. Genome Research 2004; 14: 1188-1190)を用いて作成した。

【図6】2062_G02ファミリーの抗ミオスタチンアドネクチンの該DEループの種々の残基のWebLogoに基づく分析を示す。PRO融合中に変化する該DEループの各位置のアミノ酸の頻度を示す。

【図7】2062_G02ファミリーの抗ミオスタチンアドネクチンの該FGループの種々の残基のWebLogoに基づく分析を示す。PRO融合中に変化する該FGループの各位置のアミノ酸の頻度を示す。

【図8】アドネクチン3116_A06の別々のアラニン突然変異体タンパク質の生化学的および細胞ベースのデータと配列位置によるディープミューテーションスキャンニングの相対的適合性との相関を示すグラフである。

40

【図9】アドネクチン3116_A06のアラニン突然変異体のNGSディープミューテーションスキャンニングから得たERnormとHTRFにより測定したIC50の相関を示すグラフである。ミオスタチンと結合するための好ましい、より好ましい、および最も好ましい単一部位突然変異のビン (Bin) を示す。

【図10】アドネクチンPRD-1285、PRD-1286、およびPRD-1288がActRIIb-Fcに対するミオスタチンの結合を阻害しないことを示す競合結合アッセイ (競合ELISA)のグラフである。ミオスタチンに対するActRIIb-Fcの結合の競合%を示す。予期したように、陽性コントロールのActRIIb-Fc構築物はミオスタチンに対するActRIIb-Fcの結合と競合した。

【図11】ARE-ルシフェラーゼアッセイにおけるミオスタチン活性に対する種々の濃度の

50

アドネクチンPRD-1285、PRD-1286、およびPRD-1288の効果を示すグラフである。実験条件を実施例3に記載する。PRD-1285、PRD-1286、およびPRD-1288はそれぞれミオスタチン誘導ARE-ルシフェラーゼ活性を100%阻害した。

【図12】本発明のアドネクチンがミオスタチン活性を阻害する作用機序を示す模式図である。天然シグナル伝達複合体を図12Aに示す。具体的には、ActRIIbに対するミオスタチンの結合に次いでアクチビンレセプター様キナーゼ4(ALK4)またはALK5のリクルートメントが生じ、ActRIIbおよびALK4/5はミオスタチンの異なる領域と結合する。本発明のアドネクチンは、ミオスタチンとALK4/5との結合を阻害し、ActRIIbとの結合を阻害しない(図12B)。

【図13】3116_A06とミオスタチンの複合体を示すコンピューターモデルを示す。図13Aは、ミオスタチン単独(灰色)の構造およびALK4結合部位およびActRIIB結合部位を示す。3116_A06がミオスタチンと結合する領域(すなわち、領域1および2)を実施例11に記載の実験で決定し、黒色で示す。図13Bは、実施例12に記載の結合プロトコールから得た3116_A06(黒色)およびミオスタチン(灰色)の好ましい複合体を示す。HDX-MS(実施例11)により示すミオスタチン領域1および2は、該分子片側のみ空間充填で示し、3116_A06の該BC、DE、およびFGループを三次元スティックで示す。本図は、2つのアドネクチン結合部位の1つと結合した1つのアドネクチンを示すが、個々のアドネクチン結合部位または両アドネクチン結合部位のいずれかが占有されることに注意すべきである。

【図14】コントロールマウスと比較した示した抗ミオスタチンアドネクチンで処置したマウスの第15日の体重増加パーセントを示す棒グラフである。B6 SCIDマウスに、実施例13に記載のごとく2週間または1週間に1回、14日間抗ミオスタチンアドネクチンを皮下注射した。体重を処置期間を通して測定し、第15日の理論変化値パーセンテージを示す(* = 各コントロール群との統計的差を示す; $p < 0.01$ t-検定)。

【図15】コントロールマウスと比較した示した抗ミオスタチンアドネクチンで処置したマウスの第15日の肢筋肉容量(cm^3)の増加を示す棒グラフである。B6 SCIDマウスに、実施例13に記載のごとく2週間または1週間に1回、14日間抗ミオスタチンアドネクチンを皮下注射した。体重を処置期間を通して測定し、第15日の理論変化値パーセンテージを示す(* = 各コントロール群との統計的差を示す; $p < 0.05$ t-検定)。

【図16】示した種々の容量のPRD-1474で処置したマウスの第28日の肢筋肉容量(cm^3)の増加を示す棒グラフである。B6 SCIDマウスに、実施例14に記載のごとく2週間または1週間に1回、28日間 PRD-1474を皮下注射した(* $p < 0.0001$; #群間に有意差なし)。

【0049】

(発明の詳細な説明)

(定義)

特記しない限り、本明細書で用いているすべての技術用語および科学用語は、当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または等価なあらゆる方法および組成物を本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法および組成物を本明細書に記載する。

【0050】

本明細書で用いている「完全長ミオスタチン」は、McPherron et al. (1997) (上記)に記載の完全長ポリペプチド配列およびアレル変異体および種間ホモログを含む関連完全長ポリペプチドを表す。

用語「ミオスタチン」または「成熟ミオスタチン」は、生物学的に活性な成熟ミオスタチン、およびアレル変異体、スプライス変異体、および融合ペプチドおよびポリペプチドを含む関連ポリペプチドを表す。成熟C末端タンパク質は、ヒト、マウス、ニワトリ、ブタ、シチメンチョウ、およびラットを含む多くの種間で100%の配列同一性を有すると報告されている(Lee et al., PNAS 2001; 98: 9306)。ヒトプレプロミオスタチンに対する配列は以下の通りである。

MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVRQL
LPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSKIQYNKVVKAQLWIYL

10

20

30

40

50

RPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTG|WQSIDVKTVLQNWLLKQPESNLG|EIKALDENGHDLAFT
 FPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWI|APKRYKANYCSGECEVFVLQK
 YPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSP|NMLYFNGKEQ|IYGK|PAMVVDRCGCS(配列番号1)

【0051】

ヒトプロミオスタチンの配列は以下の通りである。

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSR|EAIKIQILSKLRLETAPN|SKDV|RQLLPKAPPLREL|DQYDVQRDDSSD
 GSLEDDDYHATTET|ITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSK|IQYNKVVKAQLW|YLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDG
 TRYTGIRSLKLDMPGTG|WQSIDVKTVLQNWLLKQPESNLG|EIKALDENGHDLAFTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKR
 SRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWI|APKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHHTLVHQANPRGSAGPCCTPT
 KMSP|NMLYFNGKEQ|IYGK|PAMVVDRCGCS(配列番号2)

10

【0052】

成熟ミオスタチンの配列(ヒト、ネズミ、ラット、ニワトリ、シチメンチョウ、イヌ、
 ウマ、およびブタで保存されている)は以下の通りである。DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAF
 GWDWI|APKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHHTLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSP|NMLYFNGKEQ|IYGK|PAMVVDRCG
 CS(配列番号3)

【0053】

本明細書で用いている「ポリペプチド」は、長さ、翻訳後修飾、または機能に関わらず
 2またはそれ以上のアミノ酸のあらゆる配列を表す。「ポリペプチド」、「ペプチド」、
 および「タンパク質」は本明細書で互換性に用いられる。ポリペプチドには、例えば米国
 特許No. 6,559,126に記載の天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含むことができる(この
 内容は本明細書の一部を構成する)。ポリペプチドは、あらゆる種々の標準的な化学的方
 法で修飾することもできる(例えば、アミノ酸は保護基で修飾することができ、カルボキ
 シン末端アミノ酸を末端アミド基にすることができ、アミノ末端残基を例えば脂溶性を増強
 する基で修飾することができ、または該ポリペプチドを安定性またはin vivo半減期を増
 加させるために化学的にグリコシル化するかまたは他の方法で修飾することができる。)。
 ポリペプチド修飾は、該ポリペプチドに対する環状化合物または他の分子などの別の構造
 のアタッチメントを含むことができ、立体配置の異なる(すなわち、RまたはS、またはL
 またはD)1またはそれ以上のアミノ酸を含むポリペプチドも含むことができる。本発明の
 ペプチドは、ミオスタチンと結合するように修飾されたフィブロネクチンの第10 III型ド
 メイン由来のタンパク質であり、本明細書では「抗ミオスタチンアドネクチン」または「
 ミオスタチンアドネクチン」という。

20

30

【0054】

本明細書で用いている「ポリペプチド鎖」は、その各ドメインが非共有相互作用または
 ジスルフィド結合ではなくペプチド結合により他のドメインと結合しているポリペプチド
 を表す。

【0055】

「単離された」ポリペプチドは、その天然環境の成分から同定および分離されおよび/
 または回収されたものである。その天然環境の夾雑成分は、該ポリペプチドに対する診断
 的または治療的使用と干渉する物質であり、これには酵素、ホルモン、および他のタンパ
 ク質または非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい態様において、該ポリペプチドは
 、(1)Lowry法で測定してポリペプチドを95重量%以上、最も好ましくは99%以上に、(2)
 スピニングカップシークエネーターを用いてN末端または内部網にお産配列の少なくとも
 残基を得るのに十分な程度に、または(3)クマシーブルーまたは好ましくは銀染色を用い
 て還元または非還元条件下のSDS-PAGEで均質に精製される。単離されたポリペプチドは、
 該ポリペプチドの天然環境の少なくとも1の成分が存在しないため組換え細胞内にin situ
 で該ポリペプチドを含む。しかしながら、通常、単離されたポリペプチドは少なくとも1
 の精製工程により製造される。

40

【0056】

本明細書において「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、最大の配列同一性パーセ
 ントを達成するために必要であればギャップを導入し、配列同一性の部分としていかなる

50

保存的置換も考慮せずに配列をアラインメントした後の選択した配列中のアミノ酸残基と同一な候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、公に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegalign (DNASTAR (登録商標))ソフトウェアを用い、当該分野の技術内の種々の方法で達成することができる。当業者は、比較する配列の全長にわたり最大のアラインメントを達成するのに必要なあらゆるアルゴリズムを含むアラインメントを測定するための適切なパラメータを容易に決定することができる。例えば、特定アミノ酸配列Aの特定アミノ酸配列Bに対するアミノ酸配列同一性% (あるいは、あるアミノ酸配列Bに対する一定のアミノ酸配列同一性%を有するかまたは含む特定アミノ酸配列Aと表現することができる)は、以下のごとく計算される：100 × 分画X/Y (ここで、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2による該プログラムのAおよびBのアラインメント中の完全な一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、YはB中のアミノ酸残基の総数である。)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと同じでない場合は、AのBに対するアミノ酸配列同一性%はBのAに対するアミノ酸配列同一性%と同じではないと理解される。

10

【0057】

本明細書で用いている「保存的置換」は、限定されるものではないが、アミノ酸の同等の特性 (例えば、極性、水素結合能、酸性、塩基性、形、疎水性、芳香族など) を有するものによる置換を含むペプチドの全体的構造と機能を変化させずにアミノ酸残基を別のもので置換することを表す。同様の特性を有するアミノ酸は当該分野でよく知られている。例えば、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンは、親水性塩基性アミノ酸であり、互換性でありうる。同様に、疎水性アミノ酸のイソロイシンは、ロイシン、メチオニン、またはバリンで置換することができる。互いに置換することができる中性親水性アミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、およびトレオニンが含まれる。「置換された」または「修飾された」により、本発明は、天然アミノ酸から変化しまたは修飾されたアミノ酸を含む。したがって、本発明の文脈において、保存的置換は当該分野においてあるアミノ酸の同様の特性を有する別のアミノ酸への置換と認識されると理解すべきである。

20

【0058】

本明細書で用いている用語「アドネクチン結合部位」は、(例えば、エピトープは抗体により認識されるので) 特定のアドネクチンと相互作用または結合するタンパク質 (例えばミオスタチン) の部位または部分を表す。アドネクチン結合部位は、タンパク質の三次ホールディングにより並列した連続アミノ酸または非連続アミノ酸から形成することができる。連続アミノ酸により形成されたアドネクチン結合部位は、典型的には変性溶媒への暴露で保持されるが、三次ホールディングにより形成されたアドネクチン結合部位は典型的には変性溶媒の処理で失われる。

30

【0059】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンに対するアドネクチン結合部位は、限定されるものではないが、プロテアーゼマッピングおよび突然変異分析を含む抗体のエピトープマッピングに用いられる標準的技術を用いて決定することができる。あるいはまた、アドネクチン結合部位は、同じポリペプチド、例えばミオスタチンと結合する基準アドネクチンまたは抗体を用いる競合アッセイにより決定することができる (以下の「同じアドネクチン結合部位と結合する交差競合アドネクチンおよび/またはアドネクチン」の項にさらに記載する)。被験アドネクチンおよび基準分子 (例えば、別のアドネクチンまたは抗体) が競合する場合は、それらは、同じアドネクチン結合部位かまたはある分子の結合にその他が干渉するように充分近接したアドネクチン結合部位と結合する。

40

【0060】

本明細書で互換性に用いる用語「特異的に結合する」、「特異的結合」、「選択的結合」、および「選択的に結合する」は、ミオスタチンに対する親和性を有するが、限定されるものではないが、Scatchard分析および/または競合結合アッセイ (例えば、競合ELISA、BIAcoreアッセイ) などの当該分野で利用可能な技術を用いて測定される異なるポリペプチ

50

ドとは有意に結合しない（例えば約10%以下の結合）アドネクチンを表す。該用語は、例えば、本発明のアドネクチンの結合ドメインがミオスタチンに特異的である場合にも適用可能である。

【0061】

本明細書で用いている用語「選択的に結合する」は、本発明のアドネクチンが、例えば、限定されるものではないが、Scatchard分析および/または競合結合アッセイ（例えば、競合ELISA、BIACORE アッセイ）などの当該分野で利用可能な技術により測定される異なるポリペプチドと結合するより少なくとも約20%多くミオスタチンと結合する状況を表す。本明細書で用いている用語「交差反応性」は、同一またはきわめて同様のアドネクチン結合部位を有する2以上の異なるタンパク質と結合するアドネクチンを表す。

10

【0062】

本明細書で用いている用語「 K_D 」は、表面プラズモン共鳴アッセイまたは細胞結合アッセイを用いて測定した特定のアドネクチン-タンパク質（例えば、ミオスタチン）相互作用またはアドネクチンタンパク質（例えば、ミオスタチン）に対する親和性の解離平衡定数を表す。本明細書で用いている「望ましい K_D 」は、予期される目的に十分なアドネクチンの K_D を表す。例えば、望ましい K_D は、*in vitro*アッセイ、例えば細胞ベースのルシフェラーゼアッセイにおける機能的効果をもたらすのに必要なアドネクチンの K_D を表しうる。

【0063】

本明細書で用いている用語「 k_{ass} 」は、アドネクチンが結合してアドネクチン/タンパク質複合体となるための結合速度定数を表す。

20

【0064】

本明細書で用いている用語「 k_{diss} 」は、アドネクチン/タンパク質複合体からアドネクチンが解離するための解離速度定数を表す。

【0065】

本明細書で用いている用語「 IC_{50} 」は、*in vitro*または*in vivo* アッセイにおいて、最大阻害反応の50%、すなわち最大阻害反応と未処理反応の間の中間のレベルに反応を阻害するアドネクチンの濃度を表す。

【0066】

本明細書で用いている用語「ミオスタチン活性」は、活性ミオスタチンタンパク質のActRIIbへの結合、次いでAkt4またはAkt5のリクルートメントに関連する成長調節活性または形態発生活性の1またはそれ以上を表す。例えば、活性ミオスタチンは、骨格筋量の負の調節因子である。活性ミオスタチンは、筋肉特異的酵素（例えば、クレアチンキナーゼ）の産生を調節し、筋芽細胞増殖を刺激し、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化を調節することもできる。ミオスタチン活性は、当該分野で認識された方法、例えば本明細書に記載のものを用いて測定することができる。

30

【0067】

用語「ミオスタチン活性を阻害する」または「ミオスタチン活性に拮抗する」または「ミオスタチンに拮抗する」は、ミオスタチン*in vivo*または*in vitro*の活性を中和しまたは拮抗する本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの活性を表す。本発明のアドネクチンの活性について本明細書で用いている用語「阻害する」または「中和する」は、限定されるものではないが、生物活性または特性、疾患、または病状を含む阻害されるものの進行または重症度と実質的に拮抗し、阻害し、抑制し、制限し、遅くし、中断し、排除し、止め、減少させ、または逆転させる能力を意味する。阻害または中和は、好ましくは少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上である。

40

【0068】

例えば、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、脊椎動物対象に通常みられる生物学的に活性なミオスタチンの循環レベルを低下させ、ミオスタチンの循環レベルの上昇をもたらす障害を有する対象の生物学的に活性なミオスタチンの循環レベルを低下せしめる。ミオスタチン活性の低下は、例えば、本明細書に記載の結合アッセイを用いて測定するこ

50

とができる。あるいはまた、ミオスタチン活性の低下は、体重の増加、筋肉量の増加、筋肉強度の増加、筋肉/脂肪比の変化、無脂肪筋肉量の増加、筋肉細胞の大きさおよび/または数の増加、および/または体脂肪含有量の減少をもたらさう。

【0069】

用語「PK」は、「薬物動態」の頭字語であり、例えば、対象による吸収、分布、代謝、および排除を含む化合物の特性を含む。本明細書で用いている「PK調節タンパク質」または「PK部分」は、生物活性分子と融合または一緒に投与すると生物活性分子の薬物動態特性に影響を与えるあらゆるタンパク質、ペプチド、または部分を表す。PK調節タンパク質またはPK部分の例には、PEG、ヒト血清アルブミン(HSA)結合剤(米国公開公報No.2005/0287153、および2007/0003549、PCT公開公報WO 2009/083804、およびWO 2009/133208に記載の)、ヒト血清アルブミン、FcまたはFc断片、およびその変異体、および糖(例えばシアル酸)が含まれる。

10

【0070】

アミノ酸配列または化合物の「半減期」は、一般的に、例えば、配列または化合物の分解、および/または天然の機序による配列または化合物のクリアランスまたは隔離により *in vivo* で該ポリペプチドの血清濃度が50%低下する時間と定義することができる。半減期は、薬物動態学的分析などのあらゆる知られた方法により決定することができる。適切な技術は当業者に明らかであり、例えば、一般的に以下の工程を含みうる：適切な容量の本発明のアミノ酸配列または化合物を対象に適切に投与し、一定間隔で対象から血液試料または他の試料を採取し、該血液試料中の本発明のアミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度を測定し、得られたデータ(のプロット)から本発明のアミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度が投与した初期レベルに比べて50%低下するまでの時間を計算する。例えば、以下の標準的引き書を参照のこと：Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, および Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996)。Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 第2改訂版, Marcel Dekker (1982)も参照のこと。

20

【0071】

半減期は、 $t_{1/2-}$ 、 $t_{1/2-}$ 、 HL_{z} 、および曲線下面積(AUC)などのパラメーターを用いて表現することができる。本明細書において、「半減期の増加」は、これらパラメーターのいずれか1つ、これらパラメーターのいずれか2つ、これらパラメーターのいずれか3つ、またはこれらパラメーターの4つすべての増加を表す。具体的には「半減期の増加」は、 $t_{1/2-}$ および/またはAUCまたはその両方の増加を伴うかまたは伴わない $t_{1/2-}$ および/または HL_{z} の増加を表す。

30

【0072】

表記法「mpk」、「mg/kg」、または「mg per kg」は、ミリグラム/キログラムを表す。すべての表記法は、本開示全体で互換性に用いる。

【0073】

本明細書において互換性に用いる用語「個体」、「対象」、および「患者」は、動物、好ましくは哺乳動物(非霊長類および霊長類を含む)または鳥類を表し、限定されるものではないが、ネズミ、サル、ヒト、哺乳動物家畜(例えばウシ、ブタ、ヒツジ)、哺乳動物競技動物(例えばウマ)、および哺乳動物ペット(例えばイヌおよびネコ)を含む。好ましくは該用語はヒトを表す。該用語は、限定されるものではないがニワトリおよびシチメンチョウを含む鳥類も表す。ある態様において、対象、好ましくは哺乳動物、好ましくはヒトは、さらにミオスタチンのレベルの低下または生物活性の低下から利益を受ける疾患または障害または病状で特徴づけられる。別の態様において、対象、好ましくは哺乳動物、好ましくはヒトは、さらに、ミオスタチンのレベルの低下または生物活性の低下から利益を受ける疾患または障害または病状が発現するリスクがあることを特徴とする。

40

【0074】

用語「治療的有効量」は、対象に治療的利益をもたらすのに必要な物質の毒性用量より低い少なくとも最小用量を示す。例えば、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの治療的

50

有効量は、哺乳動物、好ましくはヒトに以下の1またはそれ以上をもたらす量である：筋肉体積および/または筋肉強度の増加、体脂肪の減少、インスリン感受性の増加、またはミオスタチンの存在が望ましくない病的効果をもたらすかまたは寄与するか、またはミオスタチンの低下が有益な治療効果をもたらす病状の治療。

【0075】

本明細書で用いている用語「虚弱な」または「虚弱」は、脆弱、体重減少、運動抑制、疲労、活動レベル低下、持久力低下、および知覚的きっかけに対する行動反応障害からの2またはそれ以上の症状により特徴付けられる病状を表す。

【0076】

本明細書で用いている用語「悪液質」は、種々の疾患から生じうる筋肉消耗の促進および除脂肪体重の減少の病状を表す。

【0077】

(概要)

本発明は、ミオスタチンと結合し、拮抗する新規ポリペプチドを提供する(本明細書では「抗ミオスタチンアドネクチン」という)。ミオスタチンアンタゴニストを同定するために、ミオスタチンをアドネクチンの大きな合成ライブラリーに提示した。ミオスタチンと結合したアドネクチンを、ミオスタチン結合、生物物理学的特性、およびミオスタチン阻害活性についてスクリーニングした。該抗ミオスタチンアドネクチンを突然変異させ、標的濃度を下げ、スローオフレート抗ミオスタチンアドネクチンを選択することによりさらに選択圧をかけた。この最適化プロセスから、アドネクチンのファミリーを、好ましい生化学的および生物物理学的活性を有するミオスタチン特異的阻害剤として同定した。本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンは、限定されるものではないが、筋肉消耗疾患、代謝障害、および活動しないことによる筋肉萎縮の治療を含む、ミオスタチン活性の阻害が有益であることが知られている障害、疾患、および病状を治療するのに有用である。Rebbapragada et al. (MCB 2003 ; 23 : 7230-42)に記載しているように、ミオスタチンシグナル伝達経路はミオスタチンのActRIIbとの結合、次いでアクチビンレセプター様キナーゼ4 (ALK4)またはALK5のリクルートメントを含む。ALKに対する結合は、Smad2/Smad3リン酸化、次いでTGF β 様シグナル伝達経路の活性化を誘導する(例えば、Rebbapragada et al., MCB 2003 ; 23 : 7230-42参照)。

【0078】

I. フィブロネクチンベースの足場

本願のある局面は、1またはそれ以上の溶媒接触可能ループがランダム化または突然変異したFn3ドメインを含む抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。ある態様において、該Fn3ドメインは、ヒトフィブロネクチンタイプIIIドメインの野生型第10モジュール(¹⁰Fn3) :

VSDVPRDLEVVAATPTSLLI SWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITVYAVTGRGD SPASSKPISINVRT (配列番号4) (BC、DE、およびFGループを下線で示す)

から誘導されるFn3ドメインである。

【0079】

他の態様において、¹⁰Fn3の非リガンド結合配列、すなわち「¹⁰Fn3足場」は、¹⁰Fn3がリガンド結合機能および/または構造安定性を保持するかぎり変化させることができる。種々の突然変異体¹⁰Fn3足場が報告されている。ある局面において、Asp 7、Glu 9、およびAsp 23の1またはそれ以上を、例えば非陰性荷電アミノ酸残基(例えば、Asn、Lysなど)などの別のアミノ酸で置換する。これら突然変異は、野生型に比べて中性pHで突然変異体¹⁰Fn3のより大きな安定性を促す効果を有することが報告されている(例えば、PCT公開公報WO 02/04523参照)。有益または中性である¹⁰Fn3足場における種々のさらなる変更が報告されている。例えば、Batori et al., Protein Eng., 15(12) : 1015-1020 (2002年12月) ; Koide et al., Biochemistry, 40(34) : 10326-10333 (2001年8月28日)参照のこと。

【0080】

変異体および野生型¹⁰Fn3タンパク質は共に、同じ構造、すなわち7鎖ドメイン配列A

10

20

30

40

50

~G、および該7鎖ドメイン配列を結合する6ループ領域 (ABループ、BCループ、CDループ、DEループ、EFループ、およびFGループ) を特徴とする。N-およびC-末端に最も近く位置する鎖は溶液中で様構造をとりうる。配列番号4において、ABループは残基 15~16に対応し、BCループは残基 21~30に対応し、CDループは残基 39~45に対応し、該DEループは残基 51~56に対応し、EFループは残基 60~66に対応し、FGループは残基 76~87に対応する (Xu et al., Chemistry & Biology, 9: 933-942, 2002)。

【0081】

したがって、ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号4に示すヒト¹⁰F_n3ドメインと少なくとも40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、または90%同一な¹⁰F_n3ポリペプチドである。変化の多くは、一般的には該ループの1またはそれ以上に生じるだろう。¹⁰F_n3ポリペプチドの鎖または様鎖のそれぞれが、該変化が生理学的条件下で該ポリペプチドの安定性を損なわない限り、実質的に、配列番号4の対応する鎖または様鎖の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%または100%同一なアミノ酸配列からなりうる。

10

【0082】

ある態様において、本発明は、第10フィブロネクチンタイプIII (¹⁰F_n3)ドメインを含む抗ミオスタチンアドネクチンであって、該¹⁰F_n3ドメインが、ループ、AB; ループ、BC; ループ、CD; ループ、DE; ループEF; およびループFGを含み、ヒト¹⁰F_n3ドメインの対応するループの配列に対して変化したアミノ酸配列を有するループBC、DE、およびFGから選ばれる少なくとも1のループを有する抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、BC、DE、およびFGから選ばれる少なくとも1のループが変化している配列番号4の非ループ領域と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む¹⁰F_n3ドメインを含む。ある態様において、該BCおよびFGループが変化し、ある態様において、該BC、DE、およびFGループが変化しており、¹⁰F_n3ドメインは非天然ループを含む。ある態様において、該AB、CDおよび/またはEFループが変化している。「変化している」は、テンプレート配列 (対応するヒトフィブロネクチンドメイン) に対して1またはそれ以上のアミノ酸配列の変化を意味し、アミノ酸の付加、欠失、置換、またはその組み合わせを含む。アミノ酸配列の変化は、一般的には核酸コーディング配列の意図的、盲目的、または自発的配列変化を通して達成することができ、例えば、PCR、変異性PCR、または化学的DNA合成などのあらゆる技術により生じさせることができる。

20

30

【0083】

ある態様において、BC、DE、およびFGから選ばれる1またはそれ以上のループは、対応するヒトフィブロネクチンループに比べて長さが伸張または短縮しうる。ある態様において、該ループの長さは、2~25アミノ酸伸張しうる。ある態様において、該ループの長さは、1~11アミノ酸短縮しうる。抗原結合を最適化するため、¹⁰F_n3のループの長さは、抗原結合における最大の可能な適応性と親和性を得るように長さと配列を変化させることができる。

【0084】

ある態様において、該ポリペプチドは、BC、DE、およびFGから選ばれる少なくとも1のループが変化している、配列番号4の非ループ領域と少なくとも80、85、90、95、98、99、または100%同一なアミノ酸配列を含むFn3ドメインを含む。ある態様において、該変化したBCループは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以下のアミノ酸置換、1、2、3、または4以下のアミノ酸欠失、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以下のアミノ酸挿入、またはそれらの組み合わせを有する。ある態様において、該変化したDEループは、1、2、3、4、5、または6以下のアミノ酸置換、1、2、3、または4以下のアミノ酸欠失、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13以下のアミノ酸挿入、またはそれらの組み合わせを有する。

40

【0085】

ある態様において、該FGループは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12以

50

下のアミノ酸置換、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11以下のアミノ酸欠失、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25以下のアミノ酸挿入、またはそれらの組み合わせを有する。

【0086】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、¹⁰Fn3足場に基づき、一般的には下記配列により定義される：

EVVAAT(Z)_aSLLI(Z)_xYYRITYGE(Z)_bQEFTV(Z)_yATI(Z)_cDYTITVYAV(Z)_zISINYRT(配列番号5)

[式中、ABループは(Z)_aで示され、CDループは(Z)_bで示され、EFループは(Z)_eで示され、BCループは(Z)_xで示され、該DEループは(Z)_yで示され、および該FGループは(Z)_zで示される。]。Zはあらゆるアミノ酸を表し、Z後の下付文字はアミノ酸の整数値を表す。具体的には、aは、1~15、2~15、1~10、2~10、1~8、2~8、1~5、2~5、1~4、2~4、1~3、2~3、または1~2アミノ酸で有り得、b、c、x、y、およびzは、それぞれ独立して2~20、2~15、2~10、2~8、5~20、5~15、5~10、5~8、6~20、6~15、6~10、6~8、2~7、5~7、または6~7アミノ酸であり得る。

【0087】

好ましい態様において、aは、2アミノ酸であり、bは7アミノ酸であり、cは7アミノ酸であり、xは11アミノ酸であり、yは6アミノ酸であり、zは12アミノ酸である。該鎖の配列は、配列番号4で示される対応するアミノ酸に比べてすべての7足場領域にわたり0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1の置換、欠失または付加を有しうる。ある態様において、該鎖の配列は、配列番号4で示される対応するアミノ酸に比べてすべての7足場領域にわたり0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1の保存的置換を有しうる。ある態様において、該コアアミノ酸残基は固定され、あらゆる置換、保存的置換、欠失、または付加は該コアアミノ酸残基以外の残基で生じる。

【0088】

あるいはまた、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、¹⁰Fn3足場に基づき、一般的に下記配列により定義される：

EVVAATPTSLLI(Z)_xYYRITYGETGGNSPVQEFTV(Z)_yATISGLKPGVDYTITVYAV(Z)_zISINYRT(配列番号6)

[式中、BCループは(Z)_xで示され、該DEループは(Z)_yで示され、および該FGループは(Z)_zで示される。]。Zはあらゆるアミノ酸を表し、Z後の下付文字はアミノ酸の整数値を表す。特に、x、y、およびzは、それぞれ独立して、2~20、2~15、2~10、2~8、5~20、5~15、5~10、5~8、6~20、6~15、6~10、6~8、2~7、5~7、または6~7アミノ酸であり得る。

【0089】

好ましい態様において、xは11アミノ酸であり、yは6アミノ酸であり、zは12アミノ酸である。該鎖の配列は、配列番号1で示される対応するアミノ酸に比べてすべての7足場領域にわたり0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1の置換、欠失または付加を有しうる。ある態様において、該鎖の配列は、配列番号4で示される対応するアミノ酸に比べてすべての7足場領域にわたり0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1の保存的置換を有しうる。ある態様において、該コアアミノ酸残基は固定され、あらゆる置換、保存的置換、欠失、または付加は、アミノ酸残基以外の残基に生じる。

【0090】

ある態様において、本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ(Z)_x、(Z)_y、および(Z)_zで示されるBC、DE、およびFGループの少なくとも1が変化している配列番号5または6に記載の配列を含みうる。上記のごとく、配列番号4の残基21~30、51~56、および76~87に対応するアミノ酸残基はそれぞれBC、DE、およびFGループを定義する。しかしながら、該ループ領域内のあらゆる残基を、目的とする標的(例えば、ミオスタチン)に対する強い親和性を有する¹⁰Fn3パイNDERを達成するために修飾する必要はないと理解すべきである。例えば、配列番号1に示すBCループの残基21(S)および22(W)をミオス

10

20

30

40

50

タチンと結合するために修飾する必要はない。すなわち、ミオスタチンと高親和性に結合する¹⁰F_n3ドメインは、配列番号4で示されるループBCの残基23～30のみを修飾することにより得ることができる。これは、下線部のみが修飾されることを示す表1に例示したBCループに示される。

【0091】

同様に、配列番号4に示すループDEの位置51(P)および56(T)はミオスタチンを結合するために修飾する必要はない。すなわち、ミオスタチンと高親和性に結合する¹⁰F_n3ドメインは、配列番号4で示されるループDEの残基52～55のみを修飾することにより得ることができる。これは、下線部にわたる残基のみが変化したことを示す表1に例示したDEループに示される。

【0092】

同様に、配列番号1に示す該FGループの位置76(T)および87(P)は、ミオスタチンを結合するために修飾する必要はない。すなわち、ミオスタチンと高親和性に結合する¹⁰F_n3ドメインは、配列番号4に示すループFGの残基77～86のみを修飾することにより得ることができる。これは、下線部にわたる残基のみが変化したことを示す表1に例示したFGループに示される。

【0093】

したがって、ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのBC、DE、およびFGループ領域は、コンセンサス配列にしたがって記載することができる。該コンセンサス配列は、WebLogo分析により決定される表1に示すBC、DE、およびFGループで例示される(図2～7)(Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. Genome Research 2004; 14: 1188-1190(この内容は本明細書の一部を構成する)。WebLogo分析は、BC、DE、またはFGループの各変化した位置のアミノ酸の頻度を反映するアミノ酸シグネチャーをもたらす。例えば、ある態様において、BCループ、(Z)_xは、コンセンサス配列: X₁-L-P-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇(式中、X₁はS、TまたはYであり; X₂はH、Y、N、R、F、G、SまたはTであり; X₃はA、P、Q、S、F、H、NまたはRであり; X₄はGまたはAであり; X₅はH、L、R、V、N、D、F、IまたはKであり; X₆はA、L、G、M、F、IまたはVであり; X₇はHまたはNである。)で定義される。ある好ましい態様において、BCループは、配列番号7、11～21、23～31、34、および36～38から選ばれるアミノ酸配列を含む。ある態様において、BCループは、配列番号34で示すアミノ酸を含む。

【0094】

ある態様において、該DEループ、(Z)_yは、コンセンサス配列: G-R-G-X₈(ここで、X₈はVまたはLである。)で定義される。ある好ましい態様において、該DEループは、配列番号39および42から選ばれるアミノ酸を含む。ある態様において、該DEループは、配列番号39に示すアミノ酸を含む。

【0095】

ある態様において、該FGループ、(Z)_zは、コンセンサス配列: X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈(式中、X₉はL、VまたはIであり; X₁₀はTまたはSであり; X₁₁はK、R、A、G、S、D、H、N、TまたはPであり; X₁₂はS、T、A、E、H、KまたはNであり; X₁₃はK、G、Q、D、E、N、TまたはSであり; X₁₄はV、I、F、L、M、P、TまたはYであり; X₁₅はI、LまたはYであり; X₁₆はH、I、V、K、L、R、F、G、SまたはTであり; X₁₇はYまたはHであり; X₁₈はK、M、L、RまたはVである。)で定義される。ある好ましい態様において、該FGループは、配列番号46、50～62、64～72、75～77、および79から選ばれるアミノ酸配列を含む。ある態様において、該FGループは、配列番号75で示すアミノ酸を含む。

【0096】

他の態様において、BCループ、(Z)_xは、コンセンサス配列: X₁₉-X₂₀-P-X₂₁-G-X₂₂-A(ここで、X₁₉はD、E、VまたはWであり; X₂₀はA、SまたはVであり; X₂₁はR、A、G、KまたはLであり; X₂₂はLまたはRである。)で定義される。ある好ましい態様において、該BCループは配列番号8～10、22、32、33、および35から選ばれるアミノ酸配列を含む。

【0097】

10

20

30

40

50

他の態様において、該DEループ、 $(Z)_y$ は、コンセンサス配列： X_{23} -G-R-G- X_{24} （式中、 X_{23} はV、P、F、IまたはLであり； X_{24} はS、NまたはTである。）で定義される。ある好ましい態様において、該DEループは、配列番号40、41、および43～45から選ばれるアミノ酸配列を含む。

【0098】

他の態様において、該FGループ、 $(Z)_z$ は、コンセンサス配列： X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{31} - X_{32} （式中、 X_{25} はIまたはVであり； X_{26} はF、DまたはYであり； X_{27} はDまたはTであり； X_{28} はP、M、VまたはTであり； X_{29} はV、L、N、RまたはSであり； X_{30} はH、T、L、N、QまたはSであり； X_{31} はF、W、Y、HまたはLであり； X_{32} はD、AまたはGである。）で定義される。ある好ましい態様において、該FGループは配列番号47～49、63、73、74、および78から選ばれるアミノ酸配列を含む。

10

【0099】

したがって、ある態様において、本発明は、上記の、配列： X_1 -L-P- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 を有するBCループ、 $(Z)_x$ 、および配列： G -R-G- X_8 を有するDEループ、 $(Z)_y$ を含む抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。ある態様において、該BCループは配列番号7、11～21、23～31、34、および36～38から選ばれるアミノ酸配列を含み、該DEループは配列番号39および42から選ばれるアミノ酸配列を含む。ある態様において、該BCおよびDEループは、それぞれ配列番号34および39に示すアミノ酸配列を含む。

【0100】

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、上記の、配列： X_1 -L-P- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 を有するBCループ、 $(Z)_x$ 、および配列： X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} を有するFGループ、 $(Z)_z$ を含む。ある態様において、該BCループは、配列番号7、11～21、23～31、34、および36～38から選ばれるアミノ酸配列を含み、および該FGループは、配列番号46、50～62、64～72、75～77、および79から選ばれるアミノ酸配列を含む。ある態様において、該BCおよびFGループは、それぞれ配列番号34および75に示すアミノ酸配列を含む。

20

【0101】

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、上記の、配列G-R-G- X_8 を有するDEループ、 $(Z)_y$ 、および配列： X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} を有するFGループ、 $(Z)_z$ を含む。ある態様において、該DEループは、配列番号39および42から選ばれるアミノ酸配列を含み、該FGループは、配列番号46、50～62、64～72、75～77、および79から選ばれるアミノ酸配列を含む。ある態様において、該DEおよびFGループは、それぞれ配列番号39および75に示すアミノ酸配列を含む。

30

【0102】

ある態様において、the 抗ミオスタチンアドネクチンは、上記の配列： X_1 -L-P- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 を有するBCループ、 $(Z)_x$ 、配列G-R-G- X_8 を有するDEループ、 $(Z)_y$ 、および配列： X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} を有するFGループ、 $(Z)_z$ を含む。ある態様において、該BCループは、配列番号7、11～21、23～31、34、および36～38から選ばれるアミノ酸配列を含み、該DEループは、配列番号39および42から選ばれるアミノ酸配列を含み、該FGループは、配列番号46、50～62、64～72、75～77、および79から選ばれるアミノ酸配列を含む。

40

【0103】

ある態様において、該BC、DE、およびFGループは、配列番号34、39、および75に示すアミノ酸配列を含む。

【0104】

他の態様において、本発明は、上記の、配列： X_{19} - X_{20} -P- X_{21} -G- X_{22} -Aを有するBCループ、 $(Z)_x$ 、および配列： X_{23} -G-R-G- X_{24} を有するDEループ、 $(Z)_y$ を含む抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。ある態様において、該BCループは、配列番号8～10、22、32、33、および35から選ばれるアミノ酸配列を含み、該DEループは、配列番号40、41、および43～45から選ばれるアミノ酸配列を含む。

50

【0105】

他の態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、上記の、配列： X_{19} - X_{20} -P- X_{21} -G- X_{22} -Aを有するBCループ、 $(Z)_x$ 、および配列： X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{30} - X_{32} を有するFGループ、 $(Z)_z$ を含む。ある態様において、該BCループは、配列番号8~10、22、32、33、および35から選ばれるアミノ酸配列を含み、該FGループは、配列番号47~49、63、73、74、および78から選ばれるアミノ酸配列を含む。

【0106】

他の態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、上記の、配列： X_{23} -G-R-G- X_{24} を有するDEループ、 $(Z)_y$ 、および配列： X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{30} - X_{32} を有するFGループ、 $(Z)_z$ を含む。ある態様において、該DEループは、配列番号40、41、および43~45から選ばれるアミノ酸配列を含み、該FGループは、配列番号47-49、63、73、74、および78から選ばれるアミノ酸配列を含む。

10

【0107】

他の態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、上記の、配列： X_{19} - X_{20} -P- X_{21} -G- X_{22} -Aを有するBCループ、 $(Z)_x$ 、および配列： X_{23} -G-R-G- X_{24} を有するDEループ、 $(Z)_y$ 、および配列： X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{30} - X_{32} を有するFGループ、 $(Z)_z$ を含む。ある態様において、該BCループは、配列番号8~10、22、32、33、および35から選ばれるアミノ酸配列を含み、該DEループは、配列番号40、41、および43~45から選ばれるアミノ酸配列を含み、該FGループは、配列番号47~49、63、73、74、および78から選ばれるアミノ酸配列を含む。

20

【0108】

ある好ましい態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号5または6に示す配列を含み、それぞれ $(Z)_x$ 、 $(Z)_y$ 、および $(Z)_z$ で示すBC、DE、およびFGループは、それぞれ配列番号7~38、39~45、および46~79のコンセンサス配列を有するBC、DE、およびFGループの各セットで置換される。

【0109】

他の好ましい態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号5または6に示す配列を含み、それぞれ $(Z)_x$ 、 $(Z)_y$ 、および $(Z)_z$ で示す該BC、DE、およびFGループは、表1に記載のBC、DEまたはFGループ配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一な配列を有するBC、DE、およびFGループの各セットで置換される。

30

【0110】

典型的態様において、本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号5で定義され、表1に記載のクローンのいずれかのBC、DE、およびFGループ配列の各セットを有する。例えば、表1のクローン1979_B06は、それぞれ配列番号7、39、および46に示すBC、DE、およびFGループを含む。したがって、これらループに基づく抗ミオスタチンアドネクチンは、 $(Z)_x$ が配列番号7を含み、 $(Z)_y$ が配列番号39を含み、 $(Z)_z$ が配列番号46を含む配列番号5または6を含みうる。同様の構築物では、表1中の他のクローンのBC、DE、およびFGループのセット、またはそれぞれ配列番号7~38、39~45、および46~79のコンセンサス配列を利用することが予期される。そのような抗ミオスタチンアドネクチンの足場領域は、配列番号4の足場アミノ酸残基と比べて0~20、0~15、0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1の置換、保存的置換、欠失または付加を含みうる。そのような足場の修飾は、抗ミオスタチンアドネクチンが望ましい K_D でミオスタチンと結合することができるかぎり行うことができる。

40

【0111】

好ましい態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのBCループは、以下からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む：SWSLPHAGHVN(配列番号7)、SWVSPRGRAR(配列番号8)、SWEVPRGLAR(配列番号9)、SWWAPLGLAR(配列番号10)、SWTLPHAGLAH(配列番号11)、SWYLPYPAHMN(配列番号12)、SWSLPFAGHLN(配列番号13)、SWSLPYSGLAN(配列番号14)、SWSLPHAGHAH(配列番号15)、SWTLPNFGLIN(配列番号16)、SWTLPHAGRAH(配列番号17)、SWSLPYAGHLN(

50

配列番号18)、SWSLPYAAHMN(配列番号19)、SWSLPYPGHLN(配列番号20)、SWSLPYAGHAH(配列番号21)、SWDAPGGLAR(配列番号22)、SWSLPTPGLAH(配列番号23)、SWSLPHRGVAN(配列番号24)、SWSLPSSGVAH(配列番号25)、SWSLPHHGFGH(配列番号26)、SWSLPHAGDAH(配列番号27)、SWSLPHNGVAH(配列番号28)、SWSLPRQGLAN(配列番号29)、SWSLPGPGHFH(配列番号30)、SWSLPHGLGH(配列番号31)、SWDAPRGLAR(配列番号32)、SWDAPAGLAR(配列番号33)、SWSLPHQGKAN(配列番号34)、SWDAPKGLAR(配列番号35)、SWSLPNPGIAH(配列番号36)、SWSLPRPGNAH(配列番号37)、およびSWSLPNPGNAH(配列番号38)。

【0112】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのBCループは、表1に示す配列番号7~38のいずれかの下線部分を含む。ある態様において、該BCループは配列番号34の下線部分を含む。

10

【0113】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのDEループは、以下からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む：PGRGVT(配列番号39)、PGRGST(配列番号40)、LGRGST(配列番号41)、PGRGLT(配列番号42)、IGRGST(配列番号43)、FGRGTT(配列番号44)、およびVGRGNT(配列番号45)。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのDEループは、表1に示す配列番号39~45の下線部分を含む。ある態様において、該DEループは配列番号39の下線部分を含む。

【0114】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの該FGループは、以下からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む：TLTKSQMIHYMP(配列番号46)、TIYRDGMSHHDP(配列番号47)、TVYRDGPLLLAP(配列番号48)、TIFRTGMVQYDP(配列番号49)、TLTNSEIILYKP(配列番号50)、TLTKSQILHHRP(配列番号51)、TLTRSKIHYMP(配列番号52)、TLTHSNIIRYVP(配列番号53)、TVSSTKVIIVYLP(配列番号54)、TITKSTIILYKP(配列番号55)、TVTTTSVILYKP(配列番号56)、TLTKSQLIHYMP(配列番号57)、TLTRSQVIHYMP(配列番号58)、TLTKSKIHYMP(配列番号59)、TVSSTKVIHYKP(配列番号60)、TLTKSKVIHYMP(配列番号61)、TVTTTKVIHYKP(配列番号62)、TIDRDGVNHFAP(配列番号63)、TVTHHGVIGYKP(配列番号64)、TLTGANVILYKP(配列番号65)、TVTNTGVILYKP(配列番号66)、TVTATGILYKP(配列番号67)、TVTRAGFYRYKP(配列番号68)、TVTR EEVISYKP(配列番号69)、TVTAAGVILYKP(配列番号70)、TVTANQPIILYKP(配列番号71)、TITPET IIVYKP(配列番号72)、TIDRDGTRSFDP(配列番号73)、TIFRDGPVTWDP(配列番号74)、TVTDTGYL KYKP(配列番号75)、TLTGSDTIFYKP(配列番号76)、TVTGKDVILYKP(配列番号77)、TIFRDGVVNY GP(配列番号78)、およびTVTDTGFITYKP(配列番号79)。

20

30

【0115】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのFGループは、表1に示す配列番号46~79のいずれかの下線部分を含む。ある態様において、該FGループは、配列番号75の下線部分を含む。

【0116】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号7~38を有するBCループ配列から選ばれる1BCループ配列、または表1に示す配列番号7~38のいずれかの下線部分；配列番号39~45を有する該DEループ配列から選ばれる1DEループ配列、または表1に示す配列番号39~45のいずれかの下線部分、および配列番号46~79を有する該FGループ配列から選ばれる1FGループ配列、または表1に示す配列番号46~79のいずれかの下線部分を含む。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号7~38、39~45、および46~79のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なBC、DE、およびFGループアミノ酸配列を含む。他の態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、表1に示すそれぞれ配列番号7~38、39~45、および46~79のいずれかの下線部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なBC、DE、およびFGループアミノ酸配列を含む。

40

【0117】

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号80~123、228~239、

50

および252～273のいずれかのアミノ酸配列(表2、5、および6の完全長配列)を含む。ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは配列番号273のアミノ酸配列を含む。

【0118】

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号80～123、228～239、および252～273のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む。他の態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号80～123、228～239、および252～273の非BC、DE、およびFGループ領域と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む。

【0119】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含む。別の態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号273[PRD-1474]、配列番号118[3116_A06]、配列番号281[N末端伸張配列(GVSDVPRDL)が先行し、C末端テール(EI)が続くPRD-1474、および3116_A06で共有されるコアアドネクチン配列]または配列番号331[N末端リーダー配列またはC末端テールを含まないPRD-1474および3116_A06のコアアドネクチン配列]に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む。PRD-1474および3116_A06のコアアドネクチン配列を以下に示す：

EVVAATPTSLLISWSLPHQGKANYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYITITVYAVTVTDTGYLKYKPLISINYRT(配列番号331)。

【0120】

さらに別の態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号118、273、281、または331の非BC、DE、およびFGループ領域と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む。

【0121】

ある態様において、本発明のおよび本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含む抗ミオスタチンアドネクチンとの関連で説明することができる。したがって、ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、BCループは1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を含む。したがって、ある態様において、BCループは、コンセンサス配列： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} (式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。)で定義される。

【0122】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、該DEループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を含む。したがって、ある態様において、該DEループは、コンセンサス配列G-R-G- X_{40} (ここで、 X_{40} はLである。)で定義される。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGループを含み、該FGループは、1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を含む。したがって、ある態様において、該FGループは、コンセンサス配列 X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} (式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。)で定義される。

【0123】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39

10

20

30

40

50

、および75に記載のBC、DE、およびFGグループを含み、該BCループは1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該DEループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCループは、式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} （式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。）で示されるアミノ酸配列を有し、該DEループは、式： G -R-G- X_{40} （ここで、 X_{40} はLである）で示されるアミノ酸配列を有する。

【0124】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGグループを含み、該BCループは1、2、3、4、5、または6のアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該FGループは1、2、3、4、5、6、7、または8のアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCループは、式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} （式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。）で示されるアミノ酸配列を含み、該FGループは、式： X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} （式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。）で示されるアミノ酸配列を含む。

【0125】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGグループを含み、該DEループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を含み、該FGループは1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を含む。ある態様において、該DEループは、式： G -R-G- X_{40} （ここで、 X_{40} はLである）で示されるアミノ酸配列を含み、該FGループは、式： X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} （式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。）で示されるアミノ酸配列を有する。

【0126】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75に記載のBC、DE、およびFGグループを含み、該BCループは、1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該DEループは1アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有し、該FGループは1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換を有する。ある態様において、該BCループは、式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39} （式中、 X_{33} はTまたはYであり； X_{34} はY、N、R、F、G、S、またはTであり； X_{35} はA、P、S、F、H、N、またはRであり； X_{36} はAであり； X_{37} はH、L、R、V、N、D、F、またはIであり； X_{38} はL、G、M、F、I、またはVであり； X_{39} はHである。）で示されるアミノ酸配列を含み；該DEループは式： G -R-G- X_{40} （ここで、 X_{40} はLである。）で示されるアミノ酸配列を含み；該FGループは、式： X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50} （式中、 X_{41} はLまたはIであり； X_{42} はSであり； X_{43} はK、R、A、G、S、H、N、T、またはPであり； X_{44} はS、A、E、H、K、またはNであり； X_{45} はK、Q、D、E、N、T、またはSであり； X_{46} はV、I、F、L、M、P、またはTであり； X_{47} はIまたはYであり； X_{48} はH、I、V、L、R、F、G、S、またはTであり； X_{49} はHであり； X_{50} はM、L、R、またはVである。）で示されるアミノ酸配列を有する。

【0127】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、それぞれ配列番号34、39、および75で示されるBC、DE、およびFGループを含み、抗ミオスタチンアドネクチンがミオスタチンとの結合を維持することができるBC、DE、およびFGループ中のアミノ酸配置を有する。そのようなアミノ酸置換は、例えば、実施例8に記載のディープミューテーションスキャンニングにより決定することができる。

【0128】

したがって、ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、式： X_{51} - X_{52} - X_{53} - X_{54} - X_{55} - X_{56} - X_{57} - X_{58} - X_{59} で示されるアミノ酸配列を含むBCループを含む（式中、 X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる； X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる； X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{58} は、A、C、G、L、M、S、およびTからなる群から選ばれる； X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYからなる群から選ばれる。）。好ましい態様において、 X_{51} は、C、F、I、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{52} は、Lからなる群から選ばれ； X_{53} は、Pからなる群から選ばれ； X_{54} は、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{56} は、Gからなる群から選ばれ； X_{57} は、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{58} は、A、G、L、M、およびSからなる群から選ばれ； X_{59} は、C、H、N、Q、S、およびYからなる群から選ばれる。より好ましい態様において、 X_{51} は、F、S、およびWからなる群から選ばれ； X_{52} は、Lからなる群から選ばれ； X_{53} は、Pからなる群から選ばれ； X_{54} は、からなる群から選ばれ；C、F、G、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{55} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれ； X_{56} は、Gからなる群から選ばれ； X_{57} は、A、C、H、K、L、M、N、R、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{58} は、A、G、およびLからなる群から選ばれる；および X_{59} は、H、N、およびQからなる群から選ばれる。

10

20

30

【0129】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、式： G - R - G - X_{60} （ここで、 X_{60} はA、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVである。）で示されるアミノ酸配列を含むDEループを含む。好ましい態様において、 X_{60} はC、E、I、L、M、Q、T、およびVである。より好ましい態様において、 X_{60} はC、E、I、L、M、およびVである。

【0130】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、式： X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} で示されるアミノ酸配列を含むFGループを含む（式中、 X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。）。好ましい態様において、 X_{61} は、A、C、I、L、M、およびVからなる群から選ばれ； X_{62} は、C、F、H、I、L、M、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、S、T

40

50

、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{65} は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{66} は、C、F、I、L、M、P、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{67} は、C、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{68} は、A、C、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれ；および X_{70} は、A、C、D、E、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、およびVからなる群から選ばれる。より好ましい態様において、 X_{61} は、IおよびVからなる群から選ばれ； X_{62} は、C、F、I、L、M、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれ； X_{64} は、A、C、D、F、G、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{65} は、A、G、S、T、およびWからなる群から選ばれ； X_{66} は、F、I、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{67} は、F、H、I、L、M、V、W、およびYからなる群から選ばれ； X_{68} は、A、C、F、G、I、K、L、M、T、V、およびWからなる群から選ばれ； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれ； X_{70} は、A、G、K、L、M、P、Q、およびRからなる群から選ばれる。

10

【0131】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、BC、DE、およびFGグループを含み、該BCループ式： X_{51} - X_{52} - X_{53} - X_{54} - X_{55} - X_{56} - X_{57} - X_{58} - X_{59} で示されるアミノ酸配列を含み（式中、 X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる； X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる； X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{58} は、A、C、G、L、M、S、およびTである；および X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYである。）；該DEループ式： G - R - G - X_{60} で示されるアミノ酸配列を含み（ここで、 X_{60} は、A、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる。）；該FGループは、式： X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} で示されるアミノ酸配列を含む（式中、 X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。）。

20

30

【0132】

好ましい態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、BC、DE、およびFGグループを含み、該BCループは、式： X_{51} - X_{52} - X_{53} - X_{54} - X_{55} - X_{56} - X_{57} - X_{58} - X_{59} で示されるアミノ酸配列を含み（式中、 X_{51} は、C、F、I、S、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{52} はLである； X_{53} はPである； X_{54} は、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} はGである； X_{57} は、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{58} は、A、G、L、M、およびSからなる群から選ばれる； X_{59} は、C、H、N、Q、S、およびYからなる群から選ばれる。）；該DEループは、式： G - R - G - X_{60} で示されるアミノ酸配列を含み（ここで、 X_{60} は、C、E、I、L、M、Q、T、およびVからなる群から選ばれる。）；該FGループは、式：

40

50

X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} で示されるアミノ酸配列を含む(式中、 X_{61} は、A、C、I、L、M、およびVからなる群から選ばれる； X_{62} は、C、F、H、I、L、M、Q、R、S、T、V、W、およびYである； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{66} は、C、F、I、L、M、P、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、C、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。)。

10

【0133】

より好ましい態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、BC、DE、およびFGループを含み、該BCループは、式： X_{51} - X_{52} - X_{53} - X_{54} - X_{55} - X_{56} - X_{57} - X_{58} - X_{59} で示されるアミノ酸配列を含み(式中、 X_{51} は、F、S、およびWからなる群から選ばれる； X_{52} はLである； X_{53} はPであり； X_{54} は、C、F、G、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{55} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる； X_{56} はGであり； X_{57} は、A、C、H、K、L、M、N、R、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{58} は、A、G、およびLからなる群から選ばれる；および X_{59} は、H、N、およびQからなる群から選ばれる。)、該DEループは、式： G - R - G - X_{60} で示されるアミノ酸配列を含み(式中、 X_{60} は、C、E、I、L、M、およびVからなる群から選ばれる。)、該FGループは、式： X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} で示されるアミノ酸配列を含む(式中、 X_{61} は、IおよびVからなる群から選ばれる； X_{62} は、C、F、I、L、M、T、V、W、およびYである； X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる； X_{64} は、A、C、D、F、G、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{65} は、A、G、S、T、およびWからなる群から選ばれる； X_{66} は、F、I、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{67} は、F、H、I、L、M、V、W、およびYからなる群から選ばれる； X_{68} は、A、C、F、G、I、K、L、M、T、V、およびWからなる群から選ばれる； X_{69} は、WおよびYからなる群から選ばれる；および X_{70} は、A、G、K、L、M、P、Q、およびRからなる群から選ばれる。)。

20

30

【0134】

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号124~167、240~251、および284~305(表2、5、および6の完全長配列)のいずれかに記載の核酸配列によりコードされる。ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、配列番号124~167、240~251、および284~305のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一な核酸配列によりコードされる。

【0135】

フィブロネクチンは、そのインテグリン結合モチーフの「アルギニン-グリシン-アスパラギン酸」(RGD)を介してある種のインテグリンと天然に結合する。ある態様において、該ポリペプチドは、(RGD)インテグリン結合モチーフを欠く¹⁰Fn3ドメインを含む。インテグリン結合ドメインは、アミノ酸置換、欠失、または挿入によりRGD配列を変化させることにより除去することができる。

40

【0136】

ある態様において、表1に示すそれぞれ配列番号7~38、39~45、および46~79のいずれかの下線部分と同一なBC、DEおよび/またはFGループアミノ酸配列を非¹⁰Fn3ドメインタンパク質足場中にグラフトする。例えば、1またはそれ以上のループアミノ酸配列を、抗体重鎖もしくは軽鎖またはその断片の1またはそれ以上のCDRループと置換するかまたはその中に挿入する。他の態様において、1またはそれ以上のアミノ酸ループ配列が置換または挿入される該タンパク質ドメインには、限定されるものではないが以下のものが含まれる：コンセンサスFn3ドメイン(Centocor、US)、アンキリン反復タンパク質(Molecular Par

50

tners AG、Zurich Switzerland)、ドメイン抗体(Domantis、Ltd、Cambridge、MA)、単一ドメインラクダナノボディ(Ablynx、Belgium)、Lipocalins (リポカリン) (例えば、アンチカリン; Pieris Proteolab AG、Freising、Germany)、Avimers (アビマー) (Amgen、CA)、アフィボディ(Affibody AG、Sweden)、ユビキチン(例えば、アフィリン; Scil Proteins GmbH、Halle、Germany)、タンパク質エピトープ模倣物(Polyphor Ltd、Allschwil、Switzerland)、ヘリックス束足場(例えば、アルファボディ、Complix、Belgium)、Fyn SH3ドメイン(Covagen AG、Switzerland)、またはアトリマー(Anaphor、Inc.、CA)。

本発明の典型的抗ミオスタチンアドネクチンのBC、DE、およびFGループの配列番号を表1に示す。

【0137】

表1

【表1】

抗ミオスタチンアドネクチンBC、DE、およびFGループ						
クローン	ループ配列					
	BCループ	配列番号 :	DEループ	配列番号 :	FGループ	配列番号 :
1979_B06	SWSLPHAGHVN	7	PGRGVT	39	TLTKSQMIHYMP	46
2062_G02	SWVSPRGRAR	8	PGRGST	40	TIYRDGMSHHP	47
2522_C09	SWEVPRGLAR	9	LGRGST	41	TVYRDGPLLLAP	48
2523_G06	SWWAPLGLAR	10	PGRGST	40	TIERTGMVQYDP	49
2524_C11	SWTLPHAGLAH	11	PGRGVT	39	TLTNSEIILYKP	50
2524_D09	SWYLPYPAHMN	12	PGRGLT	42	TLTKSQLLHHRP	51
2524_E10	SWSLPFAGHLN	13	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2524_H05	SWSLPYSGLAN	14	PGRGVT	39	TLTHSNIIRYVP	53
2524_H11	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TVSSTKVIYVLP	54
2525_B01	SWTLPNFGLIN	16	PGRGVT	39	TIITKSTIIYKP	55
2525_D02	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVTTTTSVILYKP	56
2525_D05	SWSLPYAGHLN	18	PGRGVT	39	TLTKSQLIHYMP	57
2525_F07	SWSLPYAAHMN	19	PGRGVT	39	TLTRSQVIHYMP	58
2987_A06	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_B04	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_B09	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_C02	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTKSKIIHYMP	59
2987_D05	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_E03	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_E08	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVSSTKVIHYKP	60
2987_F01	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTRSKIIHYMP	52
2987_F06	SWSLPHAGHAH	15	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_G04	SWSLPYPGHLN	20	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_G09	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVSSTKVIYVLP	54
2987_H02	SWSLPYAGHAH	21	PGRGVT	39	TLTKSKVIHYMP	61
2987_H07	SWTLPHAGRAH	17	PGRGVT	39	TVTTTKVIHYKP	62
3006_A10	SWDAPGGLAR	22	IIRGST	43	TIDRDGVNHFAP	63
3007_B08	SWSLPTPGLAH	23	PGRGVT	39	TVTHHGVIGYKP	64

10

20

30

40

【表 2】

3007_C09	<u>SWSLPHRGVAN</u>	24	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTGANVIIYKP</u>	65
3007_C10	<u>SWSLPSSGVAH</u>	25	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTNTGVIIYKP</u>	66
3008_A03	<u>SWSLPHHGFH</u>	26	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTATGIIYKP</u>	67
3008_B08	<u>SWSLPHAGDAH</u>	27	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTRAGFYRYKP</u>	68
3008_D04	<u>SWSLPHNGVAH</u>	28	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTREEVISYKP</u>	69
3008_F01	<u>SWSLPRQGLAN</u>	29	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTAAGVIIYKP</u>	70
3008_G01	<u>SWSLPGPGHFH</u>	30	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTANQPIIYKP</u>	71
3008_G03	<u>SWSLPHPLGH</u>	31	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TITPETIIVYKP</u>	72
3115_D04	<u>SWDAPRGLAR</u>	32	<u>FGRGVT</u>	44	<u>TIDRDGTRSFDP</u>	73
3115_E06	<u>SWDAPAGLAR</u>	33	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGPVTWDP</u>	74
3116_A06	<u>SWSLPHQGAN</u>	34	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTDTGYLKYKP</u>	75
3116_A07	<u>SWDAPKGLAR</u>	35	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGPVTWDP</u>	74
3116_C01	<u>SWSLPNPGIAH</u>	36	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TLTGSDTIFYKP</u>	76
3116_C06	<u>SWSLPRPGNAH</u>	37	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTGDVVIKYKP</u>	77
3116_H06	<u>SWDAPAGLAR</u>	33	<u>VGRGNT</u>	45	<u>TIFRDGVVNYGP</u>	78
3146_A08	<u>SWSLPNPGNAH</u>	38	<u>PGRGVT</u>	39	<u>TVTDTGFITYKP</u>	79

10

【 0 1 3 8 】

本発明の典型的抗ミオスタチンモノアドネクチンの配列番号を表2に示す。

20

【 0 1 3 9 】

表2

抗ミオスタチンモノアドネクチン

【表 3】

抗ミオスタチンモノアドネクチン		
	配列	
	アミノ酸配列	核酸配列
1979_B06 (本明細書ではATI-1133ともいう) (His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア1配列)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL</u> <u>PHAGHVNYRITYGETGGNSPVQEFT</u> <u>VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV</u> <u>TLTKSQMIHYMPISINYRT</u> <i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号80)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGATGCTGGTCATGTGAACAT TACCGCATCACTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTAAATCTCAGATGATCCATTACATGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号124)
2062_G02 (本明細書ではATI-1134ともいう) (His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア2配列)	<u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVS</u> <u>PRGRARYRITYGETGGNSPVQEFTV</u> <u>PGRGSTATISGLKPGVDYITIVYAVT</u> <u>IYRDGMSHHPISINYRT</u> <i>EIDKPSQ</i> HHHHH (配列番号81)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGTTTCTCCGCGTGGTCGTGCTCGATATTAC CGCATCACTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGGTTC TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT ACCGTGACGGTATGTCTCATCATGACCAATTTTC CATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号125)

30

40

50

【表4】

<p>2522_C09</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア3配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWEV PRGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV LGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVT VYRDGPLLLAPISINYRT<i>EIDKPSQH</i> HHHHH (配列番号82)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGAAGTGCCGCGTGGCCTAGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCTTGGTCGTGGTTC TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGTGT ACCGTGACGGGCGTGTCTCTTGCCTCAATTC CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号126)</p>	10
<p>2523_G06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア4配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWWA PLGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGSTATISGLKPGVDYTITVYAVT IFRTGMVQYDPISINYRT<i>EIDKPSQH</i> HHHHH (配列番号83)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTGGGCCCCGCTGGTCTTGTCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCTTGGTCGGGGCTC TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT TCCGTACGGGCATGGTTCAATATGACCAATTC CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号127)</p>	20
<p>2524_C11</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア5配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWTL PHAGLAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAV TLTNSEIILYKPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号84)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGACTCTGCCGATGCTGGTCTTGGCGACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCTTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTAATTCTGAGATTATCCTTTACAAGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 128)</p>	30
<p>2524_D09</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア6配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWYL PYPAHMNYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGLTATISGLKPGVDYTITVYAV TLTKSQILHHRPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号85)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTACCTCCCGTATCCTGCGCATATGAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCTTGGGCGGGG TCTGACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACAAAATCTCAGATTCTCCATCATAGGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 129)</p>	40

【表 5】

<p>2524_E10</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア7配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PFAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TLTRSKIHYMPISINYRTEIDKPSQ HHHHHHH (配列番号86)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCATTGCCGTTTGGTGGTCATTTGAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTCGCTCTAAGATTATTCATTATATGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 130)</p>	10
<p>2524_H05</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア8配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PYSGLANYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TLTHSNIIRYVPIISINYRTEIDKPSQ HHHHHHH (配列番号87)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCTTATTCTGGCCTTGCGAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG GGTTACAGCTACTATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTCACTCTAATATAATTGATACGTGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 131)</p>	20
<p>2524_H11</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア9配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TVSSTKVIVYLPISINYRTEIDKPSQ HHHHHHH (配列番号88)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCCCTACCGCATGCGGGTCATGCGCACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG AGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TGTCTAGTACAAAGGTGATAGTTTACCTGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 132)</p>	30
<p>2525_B01</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア10配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWTL PNFGLINYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TITKSTIIHYKPIISINYRTEIDKPSQ HHHHHHH (配列番号89)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGACTTTGCCGAATTTCCGGTCTTATTAATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTA TCACCAAATCTACTATCATCATTTACAAGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 133)</p>	40

【表 6】

<p>2525_D02</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア11配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLE<u>V</u>VAAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TVTTTTSVILYKPIISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号90)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGACTTTGCCGCATGCTGGTCGTGCCACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGGCGGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TGACGACAACCTCGGTGATCCTTTACAAGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 134)</p>	10
<p>2525_D05</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア12配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLE<u>V</u>VAAATPTSLLISWSL PYAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TLTKSQLIHYPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号91)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTTCTTATGCTGGTCATCTAAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCGTGG TGTGACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTAAGTCTCAGCTGATACATTACATGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 135)</p>	20
<p>2525_F07</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア13配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLE<u>V</u>VAAATPTSLLISWSL PYAAHMNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TLTRSQVIHYPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号92)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGATGCTGCTCACATGAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTT TGACTAGATCACAGGTGATTCATTACATGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 136)</p>	30
<p>2987_A06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア14配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLE<u>V</u>VAAATPTSLLISWSL PHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTTITVYAV TLTKSKIIHYPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号93)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGCATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCCGGGTCTGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACAAAAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCACCATCAT (配列番号 137)</p>	40

【表 7】

<p>2987_B04</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア15配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSKIIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号94)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATCCGGGTCATCTGAATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCAAAAAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCAGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号 138)</p>	10
<p>2987_B09</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア16配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTRSKIIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号95)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGACCCTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCAGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号 139)</p>	20
<p>2987_C02</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア17配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PYAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSKIIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号96)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCAAAAAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCAGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号 140)</p>	30
<p>2987_D05</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア18配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTRSKIIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号97)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGCATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCAGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号 141)</p>	40

【表 8】

<p>2987_E03</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア19配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLRSKIIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHHH (配列番号98)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATCCGGGTCATCTGAATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCACCATCAT (配列番号 142)</p>	10
<p>2987_E08</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア20配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVSSTKVIHYKPIISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHHH (配列番号99)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGACCCTGCCGTATGCAGGTCGTGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCG TTAGCAGCACCAAAGTGATTCATTATAAACCGAT TAGCATTAAATTATCGACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCACCATCAT (配列番号 143)</p>	20
<p>2987_F01</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア21配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PYAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLRSKIIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHHH (配列番号100)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCCGCAGCAAAATTATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCACCATCAT (配列番号 144)</p>	30
<p>2987_F06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア22配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PHAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSKVIHYMPISINYRT<i>EIDKPSQ</i> HHHHHHH (配列番号101)</p>	<p>ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCCGGGTCGTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCAAAAGCAAAGTGATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCACCATCAT (配列番号 145)</p>	40

【表 9】

2987_G04 (His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア23配列)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLLISWSL PYPGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSKVIHYMPISINYRT <i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号102)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATCCGGGTCATCTGAATTAT TATCGTATTACCTATGGTAAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGG TGTACC GCAACCATTAGCGGTCTGAAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCAAAAAGCAAAGTGATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号146)	10
2987_G09 (His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア24配列)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVSSTKVIVLPIISINYRT <i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号103)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGACCCTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTAAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGG TGTACC GCAACCATTAGCGGTCTGAAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCG TTAGCAGCACCAAAGTTATTGTTTATCTGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号147)	20
2987_H02 (His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア25配列)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLLISWSL PYAGHAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSKVIHYMPISINYRT <i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号104)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGTCACTGCCGTATGCAGGTCATGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTAAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGG TGTACC GCAACCATTAGCGGTCTGAAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCC TGACCAAAAAGCAAAGTGATTCATTATATGCCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号148)	30
2987_H07 (His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア26配列)	<u>MGVSDVPRDLE</u> VVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTTTKVIHYKPIISINYRT <i>EIDKPSQ</i> HHHHHH (配列番号105)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGACCCTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTAAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGGTCGTGG TGTACC GCAACCATTAGCGGTCTGAAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCG TTACCACCACCAAAGTGATTCATTATAAACCGAT TAGCATTAAATTATCGCACCGAAATTGATAAACCG AGCCAGCATCATCATCACCATCAT (配列番号149)	40

【表 10】

<p>3006_A10</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア27配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWDA PGGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV IGRGSTATISGLKPGVDYITIVYAVT IDRDGVNHFAPISINYRTEIDKPSQH HHHHHH (配列番号106)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGGGTGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCCTGATCGGTCGTGGTAG CACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCG ACCGTGACGGTGTCAACCACTTCGCCCAATTC CATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号150)</p>	10
<p>3007_B08</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア28配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSL PTPGLAHYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTHHGVIGYKPIISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号107)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGACTCCAGGTCTCGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGATCGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TCACTCATCAGCGGTCATCGGCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号151)</p>	20
<p>3007_C09</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア29配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSL PHRGVANYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTGANVIIYKPIISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号108)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGACCGTGGTGTGCGCAATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGATCGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TCACTGGAGCGAACGTCATCATCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号152)</p>	30
<p>3007_C10</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア30配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSL PSSGVAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTNTGVIIYKPIISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号109)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGAGCAGCGGTGTGCGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGATCGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TCACTAACACTGGTGTATCATCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号153)</p>	40

【表 1 1】

<p>3008_A03</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア31配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PHHGFGHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTATGIIYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号110)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCATCACGGTTTCGGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TCACTGCTACGGGGATCATCATCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 154)</p>	10
<p>3008_B08</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア32配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PHAGDAHYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTRAGFYRYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号111)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCACGCCGGTGACGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TACTAGAGCGGGTTTCTACCGCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 155)</p>	20
<p>3008_D04</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア33配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PHNGVAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTREEVISYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号112)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCATAATGGTGTGCGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TCACTCGGGAGGAAGTCATCAGCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 156)</p>	30
<p>3008_F01</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア34配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PRQGLANYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTAAGVIIYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号113)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCCGTCAGGGTCTCGCCAATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TCACTGCTGCTGGGGTCATCATCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 157)</p>	40

【表 1 2】

<p>3008_G01</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア35配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PGPGHFHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTANQPIIYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号114)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGGGACCGGTCACCTCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TCACTGCTAACCAGCCCATCATCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 158)</p>	10
<p>3008_G03</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア36配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWSL PHPGLGHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TITPETIIVYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号115)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGACCCCGGTCCTCGGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTA TCACTCCGGAACGATCATCGTCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 159)</p>	20
<p>3115_D04</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア37配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWDA PRGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV FGRGTTATISGLKPGVDYITIVYAVT IDRDGTRSFDPISINYRTEIDKPSQH HHHHH (配列番号116)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGAGAGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCACCTGTGTTCCGGTCGTGGTAC CACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCG ACCGTGACGGTACCCGCAGCTTCGACCCAATTTTC CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号160)</p>	30
<p>3115_E06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア38配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRD</u>LEVVAATPTSLLISWDA PAGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV VGRGNTATISGLKPGVDYITIVYAVT IFRDGPVTWDPISINYRTEIDKPSQH HHHHH (配列番号117)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGGCTGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCACCTGTGGTCGGTCGTGGTAA CACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATTTTC CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号161)</p>	40

【表 1 3】

<p>3116_A06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア39配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL</u> PHQGKANYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAV TVTDTGYLKYPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号118)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCACCAAGGTAAGCCAATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TTAAGTATACAGGGTACCTCAAGTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 162)</p>	10
<p>3116_A07</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア40配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDA</u> PKGLARYRITYGETGGNSPVQEFTV VGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVT IFRDGPVTWDPISINYRTEIDKPSQH HHHHHH (配列番号119)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGAAGGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCAGTGTGGTCTGGTAA CACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTCCCGTACCTGGGACCCAATTTCC CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号163)</p>	20
<p>3116_C01</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア41配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL</u> PNPGLAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAV TLTGSDTIFYKYPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号120)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGAATCCCGGTATCGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TCACTGGCAGTGACACCATCTTCTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号1 64)</p>	30
<p>3116_C06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア42配列)</p>	<p><u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL</u> PRPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAV TVTGKDVIKYPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号121)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCGGCGGGTAACGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCAGTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TTAAGTATACAGGGTACCTCAAGTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 165)</p>	40

【表 1 4】

<p>3116_H06</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア43配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSL LISWDA PAGLARYYRITYGETGGNSPVQEFTV VGRGNTATISGLKPGVDYTITVYAVT IFRDGVVNYGPISINYRTEIDKPSQH HHHHH (配列番号122)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGGCTGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCCTGTGGTCTGGTCTGGTAA CACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTGTCTCAACTACGGCCCAATTC CATTAAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCC CAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号166)</p>	10
<p>3146_A08</p> <p>(His6タグを有するAdNT1(下線)およびAdCT1(イタリック体)末端配列を有するアドネクチンコア44配列)</p>	<p>MGVSDVPRDLEVVAATPTSL LISWSL PNPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYTITVYAV TVTDTGFITYKPISINYRTEIDKPSQ HHHHHH (配列番号123)</p>	<p>ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGAATCCGGGTAACGCCCAATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCTGGT TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TTACTGACACAGGTTTCATCACGTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCA TCCCAGCACCATCACCACCACCAC (配列番号 167)</p>	20

【0140】

同じアドネクチン結合部位と結合する交差競合アドネクチンおよび/またはアドネクチン

ある態様において、本発明のアドネクチンは、ミオスタチンと本明細書に記載の特定の抗ミオスタチンアドネクチンとの結合に競合する(例えば、交差競合する)。そのような競合アドネクチンは、標準的ミオスタチン結合アッセイを用い、本明細書に記載のアドネクチンのミオスタチンとの結合を競合的に阻害する能力に基づいて同定することができる。例えば、組換えミオスタチンタンパク質をプレートに固定化し、該アドネクチンの1つを蛍光標識し、次いで、非標識アドネクチンの標識アドネクチンの結合と競合する能力を評価する標準的ELISAアッセイを用いることができる。

30

【0141】

ある態様において、競合ELISAフォーマットを実施し、2つの抗ミオスタチンアドネクチンがミオスタチン上の重複アドネクチン結合部位と結合するか否かを決定することができる。あるフォーマットにおいて、アドネクチン#1をプレート上にコートし、次いでブロックし、洗浄する。このプレートに、ミオスタチンのみまたは飽和濃度のアドネクチン#2と予めインキュベーションしたミオスタチンを加える。適切なインキュベーション期間後、プレートを洗浄し、ポリクローナル抗ミオスタチン抗体、例えばビオチン化ヤギ抗ミオスタチンポリクローナル抗体(R&D Systems)でプローブし、次いで、ストレプトアビジン-HRP コンジュゲートおよび標準的テトラメチルベンジジン発生法を用いて検出する。アドネクチン#2と予備インキュベーションするかまたはしないODシグナルが同じであれば、2つのアドネクチンは独立して互いに結合し、そのアドネクチン結合部位は重複しない。しかしながら、ミオスタチン/アドネクチン#2混合物を入れたウェルのODシグナルが、ミオスタチンのみを入れたものより低ければ、アドネクチン#2の結合は、アドネクチン#1のミオスタチンとの結合を阻害すると確認される。あるいはまた、同じ実験を表面プラズモン共鳴(SPR、例えば、BIAcore)により行う。アドネクチン#1をSPRチップ表面上に固定し、次いでミオスタチンのみまたは飽和濃度のアドネクチン#2と予備インキュベーションしたミオスタチンを注入する。ミオスタチン/アドネクチン#2混合物の結合シグナルがミオスタチン単独と同じかまたはそれより高い場合は、2つのアドネクチンは、独

40

50

立して互いに結合し、それらのアドネクチン結合部位は重複しない。しかしながら、ミオスタチン/アドネクチン#2混合物の結合シグナルがミオスタチン単独の結合シグナルより低い場合は、アドネクチン#2の結合はアドネクチン#1のミオスタチンとの結合を阻害することが確認される。これらの実験の特徴は、飽和濃度のアドネクチン#2を使用することである。ミオスタチンをアドネクチン#2で飽和すると、上記結論は適用できない。同じ実験を用いて、あらゆる2つのミオスタチン結合タンパク質が重複アドネクチン結合部位と結合するか否かを決定することができる。

上記両アッセイは、アドネクチン#2を固定し、ミオスタチン - アドネクチン#1をプレートに加える逆の順序で行うこともできる。あるいはまた、アドネクチン#1および/または#2は、モノクローナル抗体および/または可溶性レセプター - Fc融合タンパク質で置換することができる。

【0142】

別の態様において、競合は、実施例4に記載のHTRFサンドイッチアッセイを用いて決定することができる。他の態様において、競合アドネクチンは、本明細書に記載の特定の抗ミオスタチンアドネクチンとミオスタチン上の同じアドネクチン結合部位と結合するアドネクチンである。標準的マッピング技術、例えばプロテアーゼマッピング、突然変異分析、X線結晶学、および二次元核磁気共鳴を用い、アドネクチンが基準アドネクチンと同じアドネクチン結合部位と結合するか否かを決定することができる(例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996) 参照)。

【0143】

候補競合抗ミオスタチンアドネクチンは、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンとミオスタチンとの結合を少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%阻害することができる。該競合%は、上記方法を用いて決定することができる。

【0144】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンと競合する分子は、アドネクチンである必要はないが、限定されるものではないが、抗体、小分子、ペプチドなどのミオスタチンと結合するあらゆる種類の分子でありうる。

【0145】

ある態様において、本発明のアドネクチンは、ミオスタチン上の不連続アドネクチン結合部位と結合する。ある態様において、該ポリペプチドは、ミオスタチン(配列番号3)のアミノ酸55~66内の領域と結合する。ある態様において、該ポリペプチドは、ミオスタチン(配列番号3)のアミノ酸85~101内の領域と結合する。

【0146】

さらなる他の態様において、該ポリペプチドは、ミオスタチン(配列番号3)のアミノ酸85~101および55~66の2領域内と結合する。

【0147】

ある態様において、本発明の該ポリペプチドは、ミオスタチンとActRIIBとの結合に競合しない。ある態様において、本発明の該ポリペプチドは、ミオスタチンとALK4および/またはALK5との結合に競合する。

【0148】

II. 伸張配列

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチン分子は、N末端伸張配列および/またはC末端の伸張を含むよう修飾することができる。例えば、MG配列を配列番号4に記載の¹⁰Fn3のN末端に置くことができる。通常、Mは開裂除去され、GがN末端に残る。あるいはまた、表2に示す抗ミオスタチンアドネクチンの最初の10アミノ酸を、表7に示す別のN末端配列(本明細書においてN末端伸張という)と置換することができる。さらに、M、GまたはMGは、表7に示すN末端伸張のいずれかに対してN末端に置くこともできる。本明

10

20

30

40

50

細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンは、別のC末端テール配列（本明細書ではC末端伸張配列という）も含みうる。例えば、表2に示す抗ミオスタチンアドネクチン配列は、配列番号4のT94に対応するトレオニンで切断されうる（すなわち、該配列のINVRT(配列番号168)部分の後で切断）。そのような切断バージョンを切断形の治療的分子として用いるか、または別のC末端伸張をトレオニン残基後に付加することができる。典型的C末端伸張配列を表7に示す。C末端伸張配列を含む典型的抗ミオスタチンアドネクチンを表2に配列番号80～123として示す。例えば、配列番号80(クローン1979_B06)は、天然C末端伸張EIDKPSQ(配列番号211)とその後His6タグ(配列番号328)を含む。しかしながら、His6タグは完全に所望によると理解すべきである。

【0149】

ある態様において、C末端伸張配列（「テール」ともいう）は、EおよびD残基を含み、長さが8～50、10～30、10～20、5～10、および2～4アミノ酸でありうる。ある態様において、テール配列は、EDのタンデムリピートを含むEDベースのリンカーを含む。典型的態様において、該テール配列は、2～10、2～7、2～5、3～10、3～7、3～5、3、4または5 EDリピートを含む。ある態様において、該EDベースのテール配列は、例えば、EI、EID、ES、EC、EGS、およびEGCなどのさらなるアミノ酸残基も含みうる。そのような配列は、一部、残基DおよびKが除去された既知のアドネクチンテール配列、例えばEIDKPSQ(配列番号211)に基づく。典型的態様において、該EDベースのテールはEDリピートの前にE、IまたはEI残基を含む。

【0150】

他の態様において、該N-またはC末端配列は、抗ミオスタチンアドネクチン融合分子を設計する時は必要に応じて既知リンカー配列（例えば、表4の配列番号181～227）と結合することができる。ある態様において、薬物動態的部分の連結を促進するために該¹⁰F_n3ドメインのC末端に配列を置くことができる。例えば、システインを含むリンカー、例えばSGC(配列番号189)をC末端に付加し、システイン残基の部位指向性PEG化を促進することができる。システインを含むリンカーを含む典型的抗ミオスタチンアドネクチンを表5の配列番号228～239に示す。

【0151】

III. 薬物動態学的部分

ある局面において、本願は、さらに薬物動態学的(PK)部分を含む抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。改善された薬物動態は、認識された治療的要求に応じて評価することができる。おそらくタンパク質が投与後に血清中で利用可能のままである時間を増加することによりバイオアベイラビリティを増加し、および/または投与間の時間を増加することが望ましいことが多い。場合により、経時的なタンパク質の血清濃度の連続性を改善することが望ましい（例えば、投与直後と次の投与直前のタンパク質の血清濃度の差の減少）。該抗ミオスタチンアドネクチンは、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、またはヒト)における該ポリペプチドのクリアランス速度が、非修飾抗ミオスタチンアドネクチンに比べて2倍以上、3倍以上、4倍以上、または5倍以上低下する部分と結合することができる。改善された薬物動態の他の尺度には血清半減期を含めることができ、これは相と相に分けられることが多い。いずれかの相または両相は、適切な部分を加えることにより顕著に改善されうる。例えば、PK部分は該ポリペプチドの血清半減期をFn3のみに比べて5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、200、400、600、800、1000%またはそれ以上増加させうる。

【0152】

血清由来タンパク質のクリアランスを遅くする部分（本明細書では「PK部分」という）は、ポリオキシアルキレン部分(例えばポリエチレングリコール)、糖(例えばシアル酸)、および耐容性の良好なタンパク質部分(例えばFcおよび断片、およびその変異体、トランスフェリン、または血清アルブミン)を含む。該抗ミオスタチンアドネクチンは、アルブミンまたは米国公開公報No. 2007/0048282に記載のアルブミンの断片(部分)または変異体と融合させるか、または本明細書に記載の1またはそれ以上の血清アルブミン結合アド

10

20

30

40

50

ネクチンと融合させることができる。

【0153】

本発明に用いることができる他のPK部分には、Kontermann et al., (Current Opinion in Biotechnology 2011; 22: 868-76)に記載のものが含まれる(この内容は本明細書の一部を構成する)。そのようなPK部分には、限定されるものではないが、ヒト血清アルブミン融合、ヒト血清アルブミンコンジュゲート、ヒト血清アルブミンバインダー(例えば、アドネクチンPKE、AlbudAb、ABD)、XTEN融合、PAS融合(すなわち、3アミノ酸のプロリン、アラニン、およびセリンに基づく組換えPEG模倣物)、炭水化物コンジュゲート(例えば、ヒドロキシエチルデンブレン(HES))、グリコシル化、ポリシアル酸コンジュゲート、および脂肪酸コンジュゲートが含まれる。したがって、ある態様において、本発明は、ポリマー糖であるPK部分と融合した抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。ある態様において、該PK部分は、ポリエチレングリコール部分またはFc領域である。ある態様において、該PK部分は、例えば米国公開公報No.2007/0178082および2007/0269422に記載の血清アルブミン結合タンパク質である。ある態様において、該PK部分はヒト血清アルブミンである。ある態様において、該PK部分はトランスフェリンである。

10

【0154】

ポリエチレングリコール

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンはポリエチレングリコール(PEG)を含む。PEGは、よく知られた水溶性ポリマーであり、市販されているかまたは当該分野でよく知られた方法に従ってエチレングリコールの開環重合により製造することができる(SandlerおよびKaro, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, p.138-161)。用語「PEG」は、大きさまたは該PEG末端の修飾に関わらずあらゆるポリエチレングリコール分子を含むために広く用いられ、式： $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$ (ここで、nは20~2300であり、XはHまたは末端修飾、例えば、 C_{1-4} アルキルである。)で表すことができる。PEGは、さらに該分子の化学合成から生じる結合反応に必要であるかまたは該分子の部分が最適距離をとるためのスペーサーとして働く化学基を含むことができる。さらに、そのようなPEGは、互いに連結する1またはそれ以上のPEG側鎖からなりうる。2以上のPEG鎖を含むPEGを分岐または分枝PEGと呼ぶ。分岐PEGは、例えば欧州出願公開公報No.473084Aおよび米国特許No.5,932,462に記載されている。

20

【0155】

1またはそれ以上のPEG分子を該タンパク質の異なる部位に結合させることができ、そのような結合は、アミン、チオールまたは他の適切な反応基と反応させることにより達成することができる。該アミン部分は、例えば、ポリペプチドのN末端に見られる1級アミン、またはリジンまたはアルギニンなどのアミノ酸に存在するアミン基でありうる。ある態様において、該PEG部分は、以下からなる群から選ばれる該ポリペプチド上の位置に結合する：a)N末端；b)N末端と最N末端鎖または鎖間；c)標的結合部位と反対側の該ポリペプチドの面に位置するループ；d)C末端と最C末端鎖または鎖間；およびe)C末端。

30

【0156】

PEG化は、PEG化が選択的に生じる部位を作成するためにタンパク質内に適切な活性基を導入する部位指向性PEG化により達成することができる。ある態様において、該タンパク質は、望む位置にシステイン残基を導入するよう修飾され、該システイン残基の部位指向性PEG化を可能にする。システイン残基を生じるようにタンパク質をコードする配列内に突然変異を導入することができる。これは、例えば1またはそれ以上のアミノ酸残基をシステインに突然変異させることにより達成されよう。システイン残基に突然変異させる好ましいアミノ酸には、セリン、トレオニン、アラニン、および他の親水性残基が含まれる。好ましくは、一次配列またはタンパク質に基づく残基の表面接近可能性を予測するためのアルゴリズムは当該分野でよく知られている。あるいはまた、結合ポリペプチドを設計し、得ることに基づいてフレームワークの結晶構造が解析されていれば(Himanen et al., Nature 2001; 414: 933-8参照)、表面残基を結合ポリペプチドのアミノ酸配列を比較す

40

50

ることにより予測し、表面に露出した残基を同定することができる。システイン残基のPEG化は、例えば、PEG-マレイミド、PEG-ビニルスルホン、PEG-ヨードアセトアミド、またはPEG-オルソピリジルジスルフィドを用いて実施することができる。該PEGは、典型的には、該ポリペプチドの望む部位に結合するのに適した適切な活性基を用いて達成される。PEG化方法は当該分野でよく知られており、さらにZalipsky, S., et al., 「Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides」 in Polyethylene Glycol Chemistry : Biotechnical、およびBiomedical Applications、J. M. Harris、Plenus Press、New York (1992)、およびZalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16 : 157-182に記載されている。

【 0 1 5 7 】

PEGは、分子量が大きく異なり、分枝または直鎖状でありうる。典型的には、PEGの重量 - 平均分子量は、約100ダルトン～約150,000ダルトンである。PEGの典型的重量 - 平均分子量は、約20,000ダルトン、約40,000ダルトン、約60,000ダルトン、および約80,000ダルトンを含む。ある態様において、PEGの分子量は40,000ダルトンである。前記のあらゆる全分子量を有するPEGの分岐形も用いることができる。ある態様において、PEGは2つの分岐を有する。他の態様において、PEGは4つの分岐を有する。別の態様において、PEGは2つのアドネクチンがコンジュゲートしているビス-PEG(NOF Corporation、DE-200MA)である(例えば、実施例1および表5のATI-1341参照)。

【 0 1 5 8 】

当該分野で知られている常套的分離精製技術、例えばサイズ排除(例えば、ゲルろ過)およびイオン交換クロマトグラフィを、PEG化抗ミオスタチンアドネクチンを精製するのに用いることができる。生成物を、SDS-PAGEを用いて分離することもできる。分離することができる生成物には、モノ - 、ジ - 、トリ - 、ポリPEG化、および非PEG化アドネクチン、および遊離PEGが含まれる。モノ-PEGコンジュゲートのパーセンテージは、組成物中のモノ-PEGのパーセンテージを増加させるために溶出ピーク周辺の広い分画をプールすることにより調節することができる。約90%モノ-PEGコンジュゲートは、収量と活性のよいバランスを示す。

【 0 1 5 9 】

ある態様において、PEG化抗ミオスタチンアドネクチンは、非修飾抗ミオスタチンアドネクチンの生物活性の少なくとも約25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%を保持することが好ましい。

【 0 1 6 0 】

ある態様において、生物活性は、 K_D 、 k_{on} 、または k_{off} により評価したミオスタチンの結合能力を表す。ある態様において、該PEG化抗ミオスタチンアドネクチンは、非PEG化抗ミオスタチンアドネクチンに比べてミオスタチンに対する結合の増加を示す。典型的PEG修飾抗ミオスタチンアドネクチンを表5に示す。

【 0 1 6 1 】

免疫グロブリンFcドメイン(および断片)

ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、免疫グロブリンFcドメイン、またはその断片または変異体と融合する。本明細書で用いている「機能的Fc領域」は、FcRnと結合する能力を保持するFcドメインまたはその断片である。ある態様において、機能的Fc領域は、FcRnと結合するが、エフェクター機能を持たない。Fc領域またはその断片のFcRnと結合能力は、当該分野で知られた標準的結合アッセイにより決定することができる。他の態様において、Fc領域またはその断片はFcRnと結合し、天然Fc領域の少なくとも1の「エフェクター機能」を有する。典型的「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞毒性(CDC)；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞性細胞毒性(ADCC)；食作用；細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター；BCR)の下流調節などが含まれる。そのようなエフェクター機能は、一般的には、Fc領域が結合ドメインと結合することを必要とし(例えば、抗ミオスタチンアドネクチン)、そのような抗体のエフェクター機能を評価するための当該分野で知られた種々のアッセイを用いて評価することができる。

10

20

30

40

50

【0162】

「天然配列Fc領域」は、天然に見られるFc領域のアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を含む。「変異体Fc領域」は、少なくとも1のアミノ酸修飾による天然配列Fc領域のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、該変異体Fc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比べて天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域中に少なくとも1のアミノ酸置換、例えば約1～約10アミノ酸置換、好ましくは約1～約5アミノ酸置換を有する。本明細書において変異体Fc領域は、好ましくは天然配列Fc領域および/または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の配列同一性、最も好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の配列同一性を有する。

【0163】

典型的態様において、該FcドメインはIgG1サブクラス由来であるが、他のサブクラス(例えば、IgG2、IgG3、およびIgG4)も用いることができる。以下にヒトIgG1免疫グロブリンFcドメインの配列を示す：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号169)

コアヒンジ配列に下線を付し、CH2およびCH3領域を通常の文字で示す。C末端リジンは任意であると理解すべきである。

【0164】

該融合は、Fc分子、すなわち、Fc-抗ミオスタチンアドネクチンまたは抗ミオスタチンアドネクチン-Fc配置のいずれかの末端に抗ミオスタチンアドネクチンを結合することにより形成することができる。ある態様において、Fcおよび抗ミオスタチンアドネクチンをリンカーを介して融合する。典型的リンカー配列には以下のものが含まれる：GAGGGGSG(配列番号181)、EPKSSD(配列番号182)、D、ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA(配列番号183)、ELQLEESAAEAQDGELD(配列番号184)、GQPDEPGGS(配列番号185)、GGSGSGSGSGSGS(配列番号186)、ELQLEESAAEAQEGELE(配列番号187)、GSGSG(配列番号188)、GSGC(配列番号189)、AGGGGSG(配列番号190)、GSGS(配列番号191)、QPDEPGGS(配列番号192)、GSGSGS(配列番号193)、TVAAPS(配列番号194)、KAGGGGSG(配列番号195)、KSGSGSGSGSGS(配列番号196)、KQPDEPGGS(配列番号197)、KELQLEESAAEAQDGELD(配列番号198)、KTVAAPS(配列番号199)、KAGGGGSGG(配列番号200)、KSGSGSGSGSGSGS(配列番号201)、KQPDEPGGSG(配列番号202)、KELQLEESAAEAQDGELDG(配列番号203)、KTVAAPSG(配列番号204) AGGGGSGG(配列番号205)、AGGGGSG(配列番号206)、GSGSGSGSGSGS(配列番号207)、QPDEPGGSG(配列番号208)、およびTVAAPSG(配列番号209)。

【0165】

ある態様において、抗ミオスタチンアドネクチン融合に用いるFc領域は、Fc分子のヒンジ領域を含む。本明細書で用いている「ヒンジ」領域は、IgG1 Fc領域の配列番号169(DKTHTCPPCPAPELLG；配列番号170)の1～16位にわたるコアヒンジ残基を含む。ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチン-Fc融合は、一部、ヒンジ領域内の配列番号169の6および9位のシステイン残基によりマルチマー構造(例えばダイマー)をとる。他の態様において、本明細書で用いているヒンジ領域は、さらに配列番号169に示すコアヒンジ配列に隣接したCH1およびCH2領域由来の残基を含む。さらなる他の態様において、該ヒンジ配列はGSTHTCPPCPAPELLG(すなわち、PRD-932のヒンジ配列；配列番号180)である。ある態様において、該ヒンジ配列は、望ましい薬物動態、生物物理学的、および/または生物学的特性を与える置換を含みうる。典型的ヒンジ配列には以下のものが含まれる：EPKSSDKTHTCPPCPAPELLG(配列番号171；コアヒンジ領域、下線部)、EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS(配列番号172；コアヒンジ領域、下線部)、EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS(配列番号173；コアヒンジ領域、下線部)、DKTHTCPPCPAPELLG(配列番号174；コアヒンジ領域、下線部)、およびDKTHTCPPCPAPELLGGSS(配列番号175；コアヒンジ領域、下線部)。ある態様において、配列番号169の18位の残基Pは、Fcエフェクター機能を除去するためにSで置換されてお

10

20

30

40

50

り、この置換は、配列番号172、173、および175のいずれかを有するヒンジに例示される。別の態様において、配列番号169の1～2位の残基DKは、潜在的なクリップ部位を除去するためにGSで置換されており、この置換は配列番号173に例示される。別の態様において、ヒトIgG1の重鎖定常領域(すなわち、ドメインCH1～CH3)に対応する配列番号176の103位のCは軽鎖を欠く場合に不適切なシステイン結合形成を抑制するためにSで置換されており、この置換は配列番号171～173に例示される。

【0166】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK(配列番号176)

10

【0167】

ある態様において、抗ミオスタチンアドネクチン-Fc融合は以下の配置を有しうる：1) 抗ミオスタチンアドネクチン-ヒンジ-Fc、または2)ヒンジ-Fc-抗ミオスタチンアドネクチン。したがって、本発明のあらゆる抗ミオスタチンアドネクチンをこれら配置のヒンジ配列を含むFc領域と融合させることができる。ある態様において、リンカーは、抗ミオスタチンアドネクチンとヒンジ-Fc部分を結合するのに用いることができ、例えば、典型的融合タンパク質は、抗ミオスタチンアドネクチン-リンカー-ヒンジ-Fcまたはヒンジ-Fc-リンカー-抗ミオスタチンアドネクチンの配置を有しうる。さらに、該融合ポリペプチドを生成する系に応じて、リーダー配列を該融合ポリペプチドのN末端に置くことができる。例えば、該融合が哺乳動物系で生成される場合は、リーダー配列、例えばMETDTLLLWVLLLWVPGSTG(配列番号177)を該融合分子のN末端に付加することができる。該融合をE. coli中で生成する場合は、該融合配列にメチオニンが先立つだろう。

20

【0168】

下記配列は、抗ミオスタチンアドネクチン-ヒンジ-Fc構築物を例示する：GVSDVPRDLEVV
AATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPGRGVTATISGLKPGVDYITVYAVTVTTTKVIHYKPI
SINYRTEIEPKSSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(PRD-1171；配列番号253)。リーダー配列は太字であり、抗ミオスタチンアドネクチン配列はイタリック体であり、ヒンジ領域に下線を付す。C末端リジンは任意であると理解すべきである。

30

【0169】

ここで、該Fcドメインは以下のごとくヒトIgG1 CH2、およびCH3領域：VFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号178)およびヒンジ配列DKHTHTCPPCPAPELLG
(配列番号170)を含む。

40

【0170】

下記配列はFc-抗ミオスタチンアドネクチン構築物を例示する：
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号170)お
よびヒンジ配列DKHTHTCPPCPAPELLG(配列番号170)を含む。

【0171】

ここで、該Fcドメインは以下のヒトIgG1 CH2、およびCH3領域：VFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

50

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHAEALHNHYTQKSLSLSP (配列番号179)およびヒンジ配列DKTHTCPPCPAPELLG(配列番号
170)を含む。

【0172】

典型的抗ミオスタチンアドネクチン-Fc融合およびFc-抗ミオスタチンアドネクチン融合
を表6に示す(配列番号252~273)。すべての配列はメチオニンまたは哺乳動物リーダー配
列(例えば、配列番号177)で始まる。

【0173】

アドネクチン

ある態様において、該PK部分は、US 2012/0094909に記載の血清タンパク質(例えば、
ヒト血清アルブミン)に特異的な別のアドネクチンである(この内容は本明細書の一部を構
成する)。本発明のアドネクチンと共に用いることができる他のPK部分は、上記Konterm
n et al. (Current Opinion in Biotechnology 2011; 22: 868-76)に記載されている。例
として、そのようなアドネクチンベースのPK部分は抗ミオスタチンアドネクチンとポリペ
プチドリンカーを介して直接または間接的に結合しうる。Fn3ドメインを結合するための
適切なリンカーは、分離したドメインが互いに独立してフォールドされ、標的分子との高
親和性の結合を可能にする三次元構造を形成するものである。典型的ポリペプチドリンカー
には、PSTSTST(配列番号210)、EIDKPSQ(配列番号211)、およびGSリンカー、例えばGSGS
GSGSGS(配列番号213)およびそのマルチマーが含まれる。ある態様において、該リンカー
はグリシン-セリンベースのリンカーである。これらのリンカーは、グリシンおよびセリン
残基を含み、長さが8~50、10~30、および10~20アミノ酸でありうる。例には、アミ
ノ酸配列(GS)7(配列番号215)、G(GS)6(配列番号216)、およびG(GS)7G(配列番号217)を有
するリンカーが含まれる。他のリンカーは、グルタミン酸を含み、例えば、(GSE)5(配列
番号218)およびGGSEGGSE(配列番号219)を含む。他の典型的グリシン-セリンリンカーには
、(GS)4(配列番号212)、(GGGS)7(配列番号220)、(GGGS)5(配列番号221)、および(GGGGS
)3G(配列番号222)が含まれる。ある態様において、該リンカーはグリシン-プロリンベー
スのリンカーである。これらのリンカーは、グリシンおよびプロリン残基を含み、長さが
3~30、10~30、および3~20アミノ酸でありうる。例には、アミノ酸配列(GP)3G(配列番
号223)、(GP)5G(配列番号224)、およびGPGを有するリンカーが含まれる。他の態様におい
て、該リンカーは、長さ3~30、10~30、および3~20アミノ酸のプロリン-アラニンベー
スのリンカーでありうる。プロリンアラニンベースのリンカーには、例えば、(PA)3(配列
番号225)、(PA)6(配列番号226)および(PA)9(配列番号227)が含まれる。最適なリンカー長
およびアミノ酸組成物は、本明細書の開示に基づいて日常の実験により決定することがで
きる。ある態様では、抗ミオスタチンアドネクチンを、例えば、血液または標的組織中の
プロテアーゼにより開裂することができるプロテアーゼ部位を有するポリペプチドリンカー
を介して抗HSAアドネクチンと結合する。そのような態様を用いて、よりよい送達または
治療特性またはより効率的な製造のために抗ミオスタチンアドネクチンを放出すること
ができる。

【0174】

さらなるリンカーまたはスペーサーを、Fn3ドメインと該ポリペプチドリンカーの間のF
n3ドメインのN末端またはC末端に導入することができる。

【0175】

ある態様において、抗ミオスタチンアドネクチンを、ポリマーリンカーを介して抗HSA
アドネクチンと直接または間接的に結合することができる。ポリマーリンカーを用い、下
記特性の1またはそれ以上を有するタンパク質融合を生成するために該融合の各成分間の
距離を最適に変化させることができる：1)目的タンパク質と結合するときに1またはそれ
以上のタンパク質ドメインの結合の立体障害の減少または増加、2)タンパク質安定性また
は可溶性の増加、3)タンパク質凝集の減少、および4)該タンパク質の全体的結合力または
親和性の増加。

【0176】

10

20

30

40

50

ある態様では、抗ミオスタチンアドネクチンを、例えば、ポリマー糖などの生体適合性ポリマーを介して抗HSAアドネクチンと結合する。該ポリマー糖は、血液または標的組織中の酵素により開裂することができる酵素的開裂部位を含むことができる。そのような態様を用いて、よりよい相対または治療的特性またはより効率的製造のために抗ミオスタチンアドネクチンを放出することができる。モノアドネクチンおよびその対応するPK部分修飾形(例えば、PEG化およびFc融合)のまとめを表3に示す。

【0177】

表3

【表15】

モノアドネクチン ^a	システイン突然変異体[修飾] ^b	X-リンカー-Fc ^c	Fc-リンカー-X ^d
1979_B06(配列番号80)	ATI-1107(配列番号229)[40k 2-br]		
2062_G02(配列番号81)	ATI-1106(配列番号228)[40k 2-br]		
2522_C09(配列番号82)			
2523_G06(配列番号83)			
2524_C11(配列番号84)			
2524_D09(配列番号85)	ATI-1275(配列番号231)[NEM]; ATI-1276(配列番号231)[40k 2-br]		
2524_E10(配列番号86)			
2524_H05(配列番号87)			
2524_H11(配列番号88)			
2525_B01(配列番号89)			
2525_D02(配列番号90)	ATI-1267(配列番号230)[NEM]; ATI-1266(配列番号230)[40k 2-br]		
2525_D05(配列番号91)	ATI-1277(配列番号232)[NEM]; ATI-1278(配列番号232)[40k 2-br]		PRD-932[L1](配列番号252)
2525_F07(配列番号92)			
2987_A06(配列番号93)			
2987_B04(配列番号94)			
2987_B09(配列番号95)			
2987_C02(配列番号96)			
2987_D05(配列番号97)			
2987_E03(配列番号98)			
2987_E08(配列番号99)			
2987_F01(配列番号100)			
2987_F06(配列番号101)			

10

20

30

40

50

【表 16】

2987_G04(配 列番号102)			
2987_G09(配 列番号103)			
2987_H02(配 列番号104)			
2987_H07(配 列番号105)	ATI-1310(配列番号233)[なし]; ATI-1340(配列番号233)[NEM]; ATI-1338(配列番号233)[40k 2-br]; ATI-1359(配列番号233)[Hisなし、40k 2-br]; ATI-1339(配列番号233)[40k 4-br]; ATI-1341(配列番号233)[20k bis-PEG]	PRD-1171[L2](配 列番号253); PR D-1173[L3](配列 番号254); PRD- 1174[L4](配列番 号255)	PRD-1175[L1](配 列番号256); PR D-1177[L5](配列 番号257); PRD- 1178[L6](配列番 号258); PRD-11 80[L7](配列番号 259); PRD-1471 [L8](配列番号27 0)
3006_A10(配 列番号106)			
3007_B08(配 列番号107)			
3007_C09(配 列番号108)			
3007_C10(配 列番号109)			
3008_A03(配 列番号110)			
3008_B08(配 列番号111)			
3008_D04(配 列番号112)			
3008_F01(配 列番号113)			
3008_G01(配 列番号114)			
3008_G03(配 列番号115)			
3115_D04(配 列番号116)	ATI-1375(配列番号235)[40k 2-br]	PRD-1301[L2](配 列番号265)	PRD-1284[L5](配 列番号260)
3115_E06(配 列番号117)	ATI-1376(配列番号236)[40k 2-br]	PRD-1302[L2](配 列番号266)	PRD-1285[L5](配 列番号261); PR D-1472[L8](配列 番号271)
3116_A06(配 列番号118)	ATI-1379(配列番号239)[40k 2-br]; ATI-1523(配列番号239)[NEM]	PRD-1305[L2](配 列番号269)	PRD-1288[L5](配 列番号264); PR D-1474[L8](配列 番号273)
3116_A07(配 列番号119)	ATI-1377(配列番号237)[40k 2-br]	PRD-1303[L2](配 列番号267)	PRD-1286[L5](配 列番号262); PR D-1473[L8](配列 番号272)
3116_C01(配 列番号120)			
3116_C06(配 列番号121)			
3116_H06(配 列番号122)			
3146_A08(配 列番号123)	ATI-1378(配列番号238)[40k 2-br]	PRD-1304[L2](配 列番号268)	PRD-1287[L5](配 列番号263)

10

20

30

40

50

【 0 1 7 8 】

^a 非修飾モノアドネクチンは、表2に示すようにN末端伸張配列(MGVSDVPRDL；配列番号306)が先立ち、C末端テール(EIDKPSQHSHHHH；配列番号325)が続くコアアドネクチン配列を有する。該コアアドネクチン配列は、N末端伸張およびC末端テール配列を各モノアドネクチン配列に対応する。

^b シス테인突然変異体を有するアドネクチンは、第1欄のモノアドネクチンのコアアドネクチン配列を有し、表5に示すようにN末端伸張配列(MGVSDVPRDL；配列番号306)が先立ち、C末端テール(GSGC[修飾]HHHHHH；配列番号326またはEGSGC[修飾]HHHHHH；配列番号327)が続く。

^c C末端にFc部分を有するアドネクチンは、第1欄のモノアドネクチンのコアアドネクチン配列を有し、表6に示すようにN末端伸張配列(GVSDVPRDL；配列番号307)が先立ち、C末端テール(EI)が続き、それにリンカー配列(表4)およびFc領域配列が続く。

^d N末端にFc部分を有するアドネクチンは、表6に示すようにN末端ヒンジ配列が先立ち、リンカー(表4)が続くFc領域配列、およびN末端伸張配列(GVSDVPRDL；配列番号307)が先立ち、C末端テール(EI)が続く第1欄のモノアドネクチンのコアアドネクチン配列を有する。

【 0 1 7 9 】

化合物の典型的リンカーの配列番号を表4に示す。

表4

【表 17】

配列 番号	リンカー	配列
181	L1	GAGGGGSG
182	L2	EPKSSD
---	L3	D
183	L4	ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA
184	L5	ELQLEESAAEAQDGELD
185	L6	GQPDEPGGS
186	L7	GGSGSGSGSGSGS
187	L8	ELQLEESAAEAQEGELE
さらなる典型的リンカー		
188	L9	GSGSG
189	L10	GSGC
190	L11	AGGGGSG
191	L12	GSGS
192	L13	QPDEPGGS
193	L14	GSGSGS
194	L15	TVAAPS
195	L16	KAGGGGSG
196	L17	KGSGSGSGSGSGS
197	L18	KQPDEPGGS
198	L19	KELQLEESAAEAQDGELD
199	L20	KTVAAPS
200	L21	KAGGGGSGG
201	L22	KGSGSGSGSGSGSG
202	L23	KQPDEPGGSG
203	L24	KELQLEESAAEAQDGELDG
204	L25	KTVAAPSG
205	L26	AGGGGSGG
206	L27	AGGGGSG

10

20

30

【表 1 8】

207	L28	GSGSGSGSGSGSG
208	L29	QPDEPPGSG
209	L30	TVAAPSG
210	L31	PSTSTST
211	L32	EIDKPSQ
212	L33	GSGSGSGS
213	L34	GSGSGSGSGS
214	L35	GSGSGSGSGSGS
215	L36	GSGSGSGSGSGSGS
216	L37	GGSGSGSGSGSGS
217	L38	GGSGSGSGSGSGSGSG
218	L39	GSEGSEGSEGSEGSE
219	L40	GGSEGGSE
220	L41	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
221	L42	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
222	L43	GGGGSGGGSGGGSGG
223	L44	GPGPGPG
224	L45	GPGPGPGPGPG
---	L46	GPG
225	L47	PAPAPA
226	L48	PAPAPAPAPAPA
227	L49	PAPAPAPAPAPAPAPA

10

20

【 0 1 8 0】

本発明の典型的なPEG化抗ミオスタチンアドネクチン配列番号を表5に示す。

表5

PEG化抗ミオスタチンアドネクチン

【表 1 9】

PEG化抗ミオスタチンアドネクチン		
クローン	配列	
	アミノ酸配列	核酸配列
ATI-1106 [40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVS PRGRARYRITYGETGGNSPVQEFTV PGRGSTATISGLKPGVDYTTITVYAVT IYRDGMSHHDPIISINYRTGSGC [修 飾]HHHHHH (配列番号228)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGTTTCTCCGCGTGGTCGTGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCACTGTGCCTGGTCGTGGTTC TACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT ACCGTGACGGTATGTCTCATCATGACCCAATTTTC CATTAAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCACCAT CACCACCATCAC (配列番号240)

30

40

【表 20】

ATI-1107[40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PHAGHVNYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSQMIHYMPISINYRTGSGC[修 飾]HHHHHH (配列番号229)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCATGCTGGTCATGTAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTAAATCTCAGATGATCCATTACATGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGGTAGCGGTTGCCAC CATCACCACCATCAC (配列番号241)	10
ATI-1266[40K 2 -分岐PEG] ATI-1267[N-エ チルマレイミド]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTTTSVILYKPISINYRTEGSGC[修飾]HHHHHH (配列番号230)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGACTTTGCCGCATGCTGGTCGTGCCACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGCGGGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TGACGACAACTTCGGTGATCCTTACAAGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (配列番号242)	20
ATI-1275[N-エ チルマレイミド] ATI-1276[40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYL PYPAHMNYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGLTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSQILHHRPISINYRTEGSGC[修飾]HHHHHH (配列番号231)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTACCTCCCGTATCCTGCGCATATGAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGCGGGG TCTGACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACAAAACTCAGATTCTCCATCATAGGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (配列番号243)	30
ATI-1277[N-エ チルマレイミド] ATI-1278[40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PYAGHLNYYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TLTKSQLIHYMPISINYRTEGSGC[修飾]HHHHHH (配列番号232)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTTCTTATGCTGGTCATCTAACTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTC TGACTAAGTCTCAGCTGATACATTACATGCCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (配列番号244)	40
ATI-1310[遊離C ys] ATI-1338[40K 2 -分岐PEG] ATI-1339[40K 4 -分岐PEG] ATI-1340[N-エ チルマレイミド] ATI-1341[20K B is-PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTTTKVIHYKPISINYRTEGSGC[修飾]HHHHHH (配列番号233)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGACCCTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTGAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCTGG TGTTACCGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCG TTACCACCACAAAGTGATTATTATAAACCGAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (配列番号245)	

【表 2 1】

ATI-1359 [40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTL PHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTTTKVIHYKPISINYRTEGSGC [修飾] HHHHHH (配列番号234)	ATGGGTGTTAGTGATGTTCCGCGTGATCTGGAAG TTGTTGCAGCAACCCCGACCAGCCTGCTGATTAG CTGGACCCTGCCGCATGCAGGTCGTGCACATTAT TATCGTATTACCTATGGTAAACCGGTGGTAATA GTCCGGTTCAGGAATTCACCGTTCGGGTCTGTT TGTACCAGCAACCATTAGCGGTCTGAAACCGGGT GTTGATTACACCATTACCGTTTATGCAGTTACCG TTACCACCACAAAGTGATTCATTATAAACCGAT TTCCATTAATTACCGAACAGAAGGTAGCGGTTGC (配列番号246)	10
ATI-1375 [40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDA PRGLARYYRITYGETGGNSPVQEFTV FGRGTTATISGLKPGVDYITIVYAVT IDRDGTRSFDPI SINYRTEGSGC [修飾] HHHHHH (配列番号235)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGAGAGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCCTGTGTTCCGGTCTGGTAC CACAGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCG ACCGTGACGGTACCCGCAGCTTCGACCCAATTC CATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGCCAC CATCACCACCATCAC (配列番号247)	20
ATI-1376 [40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDA PAGLARYYRITYGETGGNSPVQEFTV VGRGNTATISGLKPGVDYITIVYAVT IFRDGPVTWDPISINYRTEGSGC [修飾] HHHHHH (配列番号236)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGGCTGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCCTGTGTTCCGGTCTGGTAA CACAGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATTC CATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGCCAC CATCACCACCATCAC (配列番号248)	30
ATI-1377 [40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDA PKGLARYYRITYGETGGNSPVQEFTV VGRGNTATISGLKPGVDYITIVYAVT IFRDGPVTWDPISINYRTEGSGC [修飾] HHHHHH (配列番号237)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGGACGCTCCGAAGGTCTGGCTCGATATTAC CGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATAGCC CTGTCCAGGAGTTCCTGTGTTCCGGTCTGGTAA CACAGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCT TCCGTGACGGTCCCGTCACCTGGGACCCAATTC CATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGCCAC CATCACCACCATCAC (配列番号249)	40
ATI-1378 [40K 2 -分岐PEG]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PNPGNAHYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTDTGFITYKPISINYRTEGSGC [修飾] HHHHHH (配列番号238)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGAATCCGGGTAACGCCATTAT TACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCCTGTGCCTGGTCTGG TGTACAGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TTACTGACACAGGTTTCATCACGTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (配列番号250)	50

【表 2 2】

ATI-1379[40K 2 -分岐PEG] ATI-1523[N-エ チルマレイミド]	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSL PHQGKANYRITYGETGGNSPVQEFT VPGRGVTATISGLKPGVDYITIVYAV TVTDTGYLKYKPISINYRTEGSGC[修飾]HHHHHH (配列番号239)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAG TGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAG CTGGTCTCTGCCGCACCAAGGTAAGCCAATTAT TACCGCATCACTACGGCGAAACAGGAGGCAATA GCCCTGTCCAGGAGTTCACCTGTGCCTGGTCGTGG TGTTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATAACCATCACTGTGTATGCTGTCACTG TACTGATACAGGGTACCTCAAGTACAAACCAAT TTCCATTAATTACCGCACAGAAGGTAGCGGTTGC CACCATCACCACCATCAC (配列番号251)
---	---	---

10

【0181】

本発明の典型的なFc融合抗ミオスタチンアドネクチンの配列番号を表6に示す。

表6

Fc融合抗ミオスタチンアドネクチン

【表 2 3】

Fc融合抗ミオスタチンアドネクチン						
配列						
クローン	アミノ酸配列	N末端ドメイン	リンカー	C末端ドメイン	核酸配列	
PRD-932	EPKSSGSTHT	EPKSSGSTHTC	GAGGGGSG (配列番号 181)	GVSDVPRDLEVV	GAGCCCAAATCTAGCGGG	10
	CPPCPAPELL	PPCPAPELLGG		AATPTSLLISWS	TCGACTCACACATGCCCA	
	GGSSVFLFPP	SSVFLFPPKPK		LPYAGHLNYRI	CCGTGCCCAGCACCTGAA	
	KFKDTLMISR	DTLMISRTPPEV		TYGETGGNSPVQ	CTCCTGGGGGGAAGCTCA	
	TPEVTCVVVD	TCVVVDVSHED		EFTVPGRGVTAT	GTCTTCCTCTTCCCCCA	
	VSHEDPEVKF	PEVKFNWYVDG		ISGLKPGVDYTI	AAACCCAAGGACACCCTC	
	NWYVDGVEVH	VEVHNAKTKPR		TVYAVTLTKSQL	ATGATCTCCCGGACCCCT	
	NAKTKPREEQ	EEQYNSTYRVV		IHYMPISINYRT	GAGGTCACATGCGTGGTG	
	YNSTYRVVSV	SVLTVLHQDWL		EI (配列番号2 82)	GTGGACGTGAGCCACGAA	
	LTVLHQDWLN	NGKEYKCKVSN			GACCTGAGGTCAAGTTC	
	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT I			AACTGGTACGTGGACGGC	
	KALPAPIEKT	SKAKGQPREPQ			GTGGAGGTGCATAATGCC	
	ISKAKGQPRE	VYTLPPSRDEL			AAGACAAAGCCGCGGGAG	
	PQVYTLPPSR	TKNQVSLTCLV			GAGCAGTACAACAGCAGC	
	DELTKNQVSL	KGFYPSDIAVE			TACCGTGTGGTCAGCGTC	
	TCLVKGFYPS	WESNGQPENNY			CTCACCGTCCTGCACCAG	
	DIAVEWESNG	KTTTPVLDSGD			GACTGGCTGAATGGCAAG	
	QPENNYKTTTP	SFFLYSKLTV D			GAGTACAAGTGCAAGGTC	
	PVLDSDGSEFF	KSRWQQGNVFS			TCCAACAAGCCCTCCCA	
	LYSKLTVDKS	CSVMHEALHNNH			GCCCCATCGAGAAAACC	
	RWQQGNVFSC	YTQKSLSLSP (ATCTCCAAGCCAAAGGG	
	SVMHEALHNNH	配列番号274)			CAGCCCCGAGAACCACAG	
	YTQKSLSLSP				GTGTACACCCTGCCCCCA	
	GAGGGGSGGV				TCCCGGGATGAGCTGACC	
	SDVPRDLEVV				AAGAACCAGGTGAGCCCTG	
	AATPTSLLIS				ACCTGCCTGGTCAAAGGC	
	WSLPYAGHLN				TTCTATCCCAGCGACATC	
	YYRITYGETG				GCCGTGGAGTGGGAGAGC	
	GNSPVQEFTV				AATGGGCAGCCGGAGAAC	
	PGRGVTATIS				AACTACAAGACCACGCCT	
	GLKPGVDYTI				CCCGTGCCTGGACTCCGAC	
	TVYAVTLTKS				GGCTCCTTCTTCTCTAC	
	QLIHYMPISI				AGCAAGCTCACCGTGGAC	
	NYRTEI (配 列番号252)				AAGAGCAGGTGGCAGCAG	
					GGGAACGTCTTCTCATGC	
					TCCGTGATGCATGAGGCT	
					CTGCACAACCACTACACG	
					CAGAAGAGCCTCTCCCTG	
					TCTCCCGGCGCCGGAGGC	
					GGCGGATCCGGTGGAGTT	
					TCTGATGTGCCGCGGAC	
			CTGGAAGTGGTTGCTGCC			
			ACCCCCACCAGCCTGCTG			
			ATCAGCTGGTCTCTTCCT			
			TATGCTGGTCATCTAAAC			
			TATTACCGCATCACTTAC			
			GGCGAAACAGGAGGCAAT			
			AGCCCTGTCCAGGAGTTC			
			ACTGTGCCTGGTCGTGGT			
			GTGACAGCTACCATCAGC			
			GGCCTTAAACCTGGCGTT			
			GATTATACCATCACTGTG			
			TATGCTGTCACTCTGACT			
			AAGTCTCAGCTGATACAT			
			TACATGCCAATTTCCATT			
			AATTACCGGACCGAAATC (配列番号284)			
				20		
				30		
				40		

【表 2 4】

PRD- 1171	GVSDVPRDLE VVAATPTSLL ISWTLPHAGR AHYYRITYGE TGGNSPVQEF TVPGRGVAT ISGLKPGVDY TITVYAVTVT TTKVIHYKPI SINYRTEIEP KSSDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTQVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGEFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号253)	GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (配列番号275))	EPKSSD (配列番号182)	KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTP EVTQVVVDVSHE DPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号283)	GCGGTGAGCGACGTGCC CGGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCTCCTGGACA CTGCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAATT ACCTACGGGGAGACAGGC GGGAACCTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTGGA AGGGGCGTGACTGCCACC ATCAGTGGGCTGAAGCCA GGAGTGGACTACACAATT ACCGTGTACGCTGTGACT GTGACCACAATAAAGTG ATCCACTACAACCCATC TCTATTAATTATCGGACC GAAATTGAGCCTAAGAGC TCCGACAAAACCCACACA TGCCACCTTGTCCAGCC CCCGAACTGCTGGGCGGC CCTTCAGTCTTCTCTTC CCCCAAAACCCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCCTGAGGT AAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCACCGTCTCTG CACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCGT CCCCCATCCCGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGT AGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAATAACAAGACC ACGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCCGGAAA (配列番号285)
--------------	---	--	------------------	---	--

10

20

30

40

【表 25】

<p>PRD- 1173</p>	<p>GVSDVPRDLE VVAATPTSLL ISWTLPHAGR AHYYRITYGE TGGNSPVQEF TVPGRGVAT ISGLKFGVDY TITVYAVTVT TTKVIHYKPI SINYRTEIDK THTCPPCPAP ELGGPSVFL FPFKPDKTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPFVLDSGD SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列 番号254)</p>	<p>GVSDVPRDLE VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (配列番号275)</p>	<p>D</p>	<p>KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHE DFEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGIFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列 番号283)</p>	<p>GGCGTGAGCGACGTGCC CGGGATCTAGAAGTGCTG GCTGCTACCCCAACAAGC TTGCTGATCTCCTGGACA CTGCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAAAT ACCTACGGGGAGACAGGC GGGAACTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTGGA AGGGGCGTGACTGCCACC ATCAGTGGGCTGAAGCCA GGAGTGGACTACACAATT ACCGTGTACGCTGTGACT GTGACCACAACAAAGTG ATCCACTACAAACCCATC TCTATTAATTATCGGACC GAAATGACAAGACCCAC ACATGCCACCTGTCCA GCCCCGAGCTCCTCGGC GGCCCTTCAGTCTTCCTC TTCCCCCAAAACCCAAAG GACACCCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGTG GACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCCGGG AAA (配列番号286)</p>
----------------------	--	---	----------	--	---

10

20

30

40

【表 2 6】

<p>PRD- 1174</p>	<p>GVSDVPRDLE VVAATPTSLL ISWTLPHAGR AHYYRITYGE TGGNSPVQEF TVPGRGVAT ISGLKPGVDY TITVYAVTVT TTKVIHYKPI SINYRTEIES PKAQASSVPT AQPQAEGlak THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列 番号255)</p>	<p>GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WTLPHAGRAHY YRITYGETGGN SPVQEFTVPGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTTTKVIHYK PISINYRTEI (配列番号275)</p>	<p>ESPKAQAS SVPTAQPO AEGLA (配 列番号183)</p>	<p>KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTF EVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLFP SRDELTKNQVSL TCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSD GSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配 列番号283)</p>	<p>GGCGTGAGCGACGTGCC CGGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCTCCTGGACA CTGCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAATT ACCTACGGGGAGACAGGC GGAACTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTGGA AGGGCGGTGACTGCCACC ATCAGTGGGCTGAAGCCA GGAGTGGACTACACAATT ACCGTGTACGCTGTGACT GTGACCACAACATAAGTG ATCCACTACAAACCCATC TCTATTAATTATCGGACC GAAATTGAGTCTCAAAG GCTCAGGCCAGCTCCGTG CCTACCGCTCAGCCACAG GCTGAGGGCCTGGCTAAG ACCCACACATGCCCCCT TGTCCAGCTCCCGAAGTG CTGGGCGGGCCTTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCAGTAC CGTGTGGTCCAGCCTCCTC ACCGTCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTGAGCCTGACC TGCTTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTG CACAACTACTACAGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGAAA (配列番号 287)</p>
----------------------	--	--	--	--	---

10

20

30

40

【表 27】

<p>PRD- 1175</p> <p>DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK QPREPQVYV LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGAGGG GSGGVSDVPR DLEVVAATPT SLLISWTLPH AGRAHYRIT YGETGGNSPV QEFTVPGRGV TATISGLKPG VDYITITVYAV TVTTTKVIHY KPISINYRTE I (配列番号 256)</p>	<p>DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYVTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYF SDIAVEWESNG QPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>GAGGGGSG (配列番号 181)</p>	<p>GVSDVPRDLEVV AATPTSLLISWT LPHAGRAHYRIT TYGETGGNSPVQ EFTVPGRGV ISGLKPGVDYTI TVYAVTVTTTKV IHYKPISINYRT EI (配列番号2 75)</p>	<p>GACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTTGCAC GAAGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCTTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGCGCCGGA GGCGGCGGATCCGGTGGC GTGTCCGACGTGCCCGG GATCTAGAAGTGGTGGCT GCTACCCCAACAAGCTTG CTGATCTCCTGGACACTG CCTCACGCTGGCCGGGCT CATTACTATAGAATTACC TACGGGGAGACAGGCGGG AACTCTCCCGTGCAGGAA TTCACCGTGCTGGAAGG GGCGTGACTGCCACCATC AGTGGGCTGAAGCCAGGA GTGGACTACACAATTACC GTGTACGCTGTGACTGTG ACCACAATAAAGTGATC CACTACAAACCCATCTCT ATTAATTATCGGACCGAA ATC (配列番号288)</p>
--	--	------------------------------------	---	---

10

20

30

40

【表 28】

A X L U

PRD- 1177	DKTHTCPPCP APPELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK QPREPQVYTL GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFP SDIAVEWESNG QPENNYKTPP VLDSGSEFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFCSSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)	ELQLEESA AEAQDDEL D (配列番 号184)	GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWT LPHAGRAHYRI TYGETGGNSPVQ EFTVPGRGVTAT ISGLKPGVDYTI TVYAVTVTTKV IHYKPISINYRT EI (配列番号2 75)	GACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCT GAACCTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAACCCAAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCCTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAAG GTCCTCACCGTCTGCAC GAGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCTGCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCAGC CCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCCTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCCGCT GAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCTCC TGGACACTGCCTCAGCT GGCCGGGCTCATTACTAT AGAATTACCTACGGGGAG ACAGGCGGGAACCTCTCC GTGCAGGAATTCACCGTG CCTGGAAGGGGGCGTACT GCCACCATCAGTGGGCTG AAGCCAGGAGTGGACTAC ACAATTACCGTGTACGCT GTGACTGTGACCACAAC AAAGTGATCCACTACAAA CCCATCTCTATTAATTAT CGGACCGAAATT (配列 番号289)
--------------	--	---	---	---	--

10

20

30

40

【表 29】

<p>PRD-1178</p>	<p>DKTHTCPCFP APELLGGPSV FLFPKPKDST LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGQPDE PGGSGVSDVP RDLEVVAATP TSLISWTLP HAGRAHYRY TYGETGGNSP VQEFVPGRG VTATISGLKP GVDYITVYA VTVTTTKVIH YKPISINYRT EI (配列番号258)</p>	<p>DKTHTCPCCPA PELLGGPSVFL FFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTIISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTTP VLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSMSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列番号276)</p>	<p>GQDEPPGS (配列番号185)</p>	<p>GVSDVPRDLEVV AATPTSLLISWT LPHAGRAHYRY TYGETGGNSPVQ EFTVPGRGVTAT ISGLKPGVDYTI TVYAVTVTTTKV IHYKPISINYRT EI (配列番号275)</p>	<p>GACAAAACACACATGC CCACCGTGCCAGCACCT GAACCTCTGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCOCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCCTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACACAAGACCACG CCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGCCAGCCC GACGAGCCTGGCGGGAGC GGCCTGAGCGACGTGCCA CGGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCTCCTGGACA CTGCCTCACGCTGGCCGG GCTCATTACTATAGAATT ACCTACGGGGAGACAGGC GGGAACCTCTCCCGTGCAG GAATTCACCGTGCCTGGA AGGGGCGTACTGCCACC ATCAGTGGGCTGAAGCCA GGAGTGGACTACACAATT ACCGTGTACGCTGTGACT GTGACCACAACATAAGTG ATCCACTACAAACCCATC TCTATTAATTATCGGACC GAAATT (配列番号290)</p>
-----------------	---	--	---------------------------	--	--

10

20

30

40

【表 3 1】

PRD- 1284	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTP EVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPELQLE ESAAEAQDGE LDGVS DVPRD LEVVAATPTS LLISWDAPRG LARYYRITYG ETGGNSPVQE FTVFRGTTA TISGLKPGVD YTITVYAVTI DRDGT RSFDP ISINYRTEI (配列番号260)	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFPY SDIAVEWESNG QPENNYKTTPP VLDS DGSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)	ELQLEESA AEAQD GEL D (配列番 号184)	GVSDVPRDLEV AATPTSL LISWD APRGLARYYRIT YGETGGNSPVQE FTVFRGTTATI SGLKPGVDYIT VYAVTIDRDGTR SFDPI SINYRTE I (配列番号277)	GACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGACCGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGT CAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACACTACAAGACCAG CCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCCTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCCGCT GAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCAGC TGGGACGCTCCGAGAGGT CTGGCTCGATATTACCGC ATCACTTACGGCGAAAACA GGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCACTGTGTTC GGTCGTGGTACCACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACC ATCACTGTGTATGCTGTG ACTATCGACCGTGACGGT ACCCGACGCTTCGACCCA ATTTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (配列番号 292)
--------------	--	---	--	--	---

10

20

30

40

【表 3 2】

<p>PRD- 1285</p>	<p>DKTHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTEVVT CVVVDVSHED PEVKENWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDNLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK QQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>DKTHTCPCPCP PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NRYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDNLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFY SDIAVEWESNG QPENNYKTTP VLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSVSMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>ELQLEESA AEAQDDEL D (配列番 号184)</p>	<p>GVSDVPRDLEVV AATPTSLLISWD APAGLARYRIT YGETGGNSPVQE FTVVGRGNTATI SGLKPGVDYIT VYAVTIFRDGPV TWDPIISINRTE I (配列番号27 8)</p>	<p>GACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCGAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCAG CCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCCGCT GAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCAGC TGGGACGCTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGC ATCACTTACGGCGAAACA GGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCCTGTGGTC GGTCGTGGTAACACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACC ATCACTGTGTATGCTGTC ACTATCTTCCGTGACGGT CCCCTCACCTGGGACCCA ATTTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (配列番号 293)</p>
----------------------	---	---	---	---	--

10

20

30

40

【表 3 3】

<p>PRD- 1286</p> <p>DKTHTCPPCP APPELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p> <p>ESAAEAQDGE LDGVSDVPRD LEVVAATPTS LLISWDAPKG LARYYRITYG ETGGNSPVQE FTVVGRGNTA TISGLKPGVD YTITVYAVTI FRDGPVTWDP ISINYRTEI (配列番号26 2)</p>	<p>DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTTP VLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>ELQLEESA AEAQDGE D (配列番 号184)</p>	<p>GVSDVPRDLEVV AATPTSLISWD APKGLARYYRIT YGETGGNSPVQE FTVVGRGNTATI SGLKPGVDYIT VYAVTIFRDGPV TWDPIISINYRTE I (配列番号27 9)</p>	<p>GACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGACCG TCAGTCTTCCCTCTCCCC CCAAAACCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAA GGCGAGCCCCGAGAACC CAGGTGTACACCCTGCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCAG CCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCCGCT GAGGCTCAGGACGGAGAA CTGGATGGCGTGAGCGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCAGC TGGGACGCTCCGAAGGT CTGGCTCGATATTACCGC ATCACTTACGGCGAAACA GGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCCTGTGGTTC GGTCGTGGTAACACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAA CCTGGCGTTGATTATACC ATCACTGTGTATGCTGTC ACTATCTCCGTGACGGT CCCCTCACCTGGGACCCA ATTTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (配列番号 294)</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	--	--	---	---

【表 3 5】

1 2 3 4 5

PRD- 1288	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK FREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK QPREPQVYTL PSRDELTKNQV LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276) ESAAEAQDGE LDGVS DVPRD LEVVAATPTS LLISWSLPHQ GKANYRITY GETGGNSPVQ EFTVPGRGVT ATISGLKPGV DYTITVYAVT VTDTGYLKYK PISINRYRTEI (配列番号2 64)	DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDEPKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTL PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTPP VLDS DGSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)	ELQLEESA AEAQD GEL D (配列番 号184)	GVSDVPRDLEV V AATPTSLLI SWS LPHQGK ANYYRI TY GETGGNSPV Q EFTVPGR GVTAT ISGL KPGVDYTI TVYAVTVDT GY LKYKPI SINRYRT EI (配列番 号281)	GACAAACTCAC ACATGCCAC CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGAC CCGTCACTCT CCTTCCCCC CCAAACCCAA GAGACACC CTGATGATCT CCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGGTG GTGGTGGAC GAGCCAC GAAGACCCCT GAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGAC GGCGTGGAG GTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGG GAGGAGCAG TACAACAGC ACGTACCGT GTGGTCAAG CAGC GTCCTCACCG TCCCTGCAC CAGGACTGG CTGAATGGC AAGGACTACA AGTGC AAG GTCTCCAACA AAAAGCCCT C CCAGCCCC ATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCC CCATCCCGG GATGAGCTG ACCAAGAACC AAGTCAAGC CTGACCTGC CTGGTCAAA GGCTTCTAT CCCAGCGAC ATCGCCGTG GAGTGGGAG AGCAATGGG CAGCCGGAG AACAACTACA AAGACCGC G CCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTC TACAGCAAG CTACCGGTG GACAAGAGC AAGTGGCAG CAGGGGAAC GCTTCTCA TGCTCCGTG ATGATGATG AAG GCTCTG CACAACCACT A CCGCAGA AAGAGCCTC TCC CTGTCT CCGAGCTGC AAGCTGGAG GAAAGCGCC GCTGAGGAA GCGCCGCT GTGGATGGC GTGAGCGAC GTGCCACGG GATCTAGAA GTGGTGGCT GCTACCCCC ACAAGCTTG CTGATCAGC TGGTCTCTG CCGCACCAA GGTAAGCCA ATTATTAC CGCATCACT TACGGCGAA ACAGGAGGCA ATAGCCCT GTCCAGGAGT TCACTGTG CCTGGTCGT GGTGTTACA GCTACCATC AAGCGCCTT AAACCTGGC GTTGATTAT ACCATCACT GTGSTATGCT GTCACGTTA CTGATACA GGGTACCTCA AGTACAAA CCAATTTCCA TTAATTAC CGGACCGAAA TT (配列 番号296)
--------------	--	---	--	--	---

10

20

30

40

【表 3 7】

<p>PRD-1302</p> <p>GVSDVPRDLE VVAATPTSLL ISWDAPAGLA RYYRITYGET GGNSPVQEFT VVGRGNTATI SGLKFGVDYT ITVYAVTIFR DGPVTWDPIS INRYRTEIEPK SSDKTHTCPP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPFVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (配列番号266)</p>	<p>GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPAGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVVGRG NTATISGLKPG VDYTITVYAVT IFRDGPVTWDP ISINRYRTEI (配列番号278)</p>	<p>EPKSSD (配列番号182)</p>	<p>KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSH DPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号283)</p>	<p>GGCGTGAGCGACGTGCC CGGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCCACAAGC TTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGGTCTGGCT CGATATTACCGCATCACT TACGGCGAAACAGGAGGC AATAGCCCTGTCCAGGAG TTCCTGTGGTCGGTCGT GGTAACACAGCTACCATC AGCGGCCTTAAACCTGGC GTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTATC TTCCGTGACGGTCCCGTC ACCTGGGACCCAATTTCC ATTAATTACCGGACCGAA ATTGAGCCTAAGAGCTCC GACAAAACCCACACATGC CCACCTTGTCCAGCCCCC GAACTGCTGGGCGGCCCT TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCTCTACCGTCTTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCAGC CCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGAAA (配列番号298)</p>
--	---	-------------------------	--	---

10

20

30

40

【表 38】

【表 38】

<p>PRD- 1303</p>	<p>GVSDVPRDLE VVAATPTSLL ISWDAPKGLA RYYRITYGET GGNSPVQEFT VVGRGNTATI SGLKPGVDYT ITVYAVTIFR DGPVTWDPIS INRTEIEPK SSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (配列番号267)</p>	<p>GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WDAPKGLARYY RITYGETGGNS PVQEFTVVGRG NTATISGLKPG VDYTITVYAVT IFRDGPVTWDP ISINRTEI (配列番号279)</p>	<p>EPKSSD (配列番号182)</p>	<p>KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号283)</p>	<p>GGCGTGAGCGACGTGCCCGGGATCTAGAAGTGGTGCTGTGATACCCCCACAAGCTTGTGATCAGCTGGGACGCTCCGAAGGGTCTGGCTCGATATTACCGCATCACTTACGGCGAAACAGGAGGC AATAGCCCTGTCCAGGAGTTCACTGTGGTCCGGTCGTGGTAACACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTATCTTCCGTGACGGTCCCCTCACCTGGGACCCAATTTCCATTAATTACCGGACCGAAATTGAGCTAAGAGCTCCGACAAAACCCACACATGCCACCTTGTCCAGCCCCCGAACTGCTGGGCGGCCCTTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA (配列番号299)</p>
----------------------	---	---	-------------------------	---	---

10

20

30

40

【表 40】

<p>PRD- 1305</p>	<p>GVSDVPRDLE VVAATPTSLL ISWSLPHQ GK ANYRITYGE TGCNSPVQEF TVEGRGV TAT ISGLKPGVDY TITVYAVT VT DTGYLKYKPI SIN YRTEIEP KSSDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVT CVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFS CSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号2 69)</p>	<p>GVSDVPRDLEV VAATPTSLLIS WSLPHQ GKANY YRITYGETGGN SPVQEF T V PGR GVTATISGLKP GVDYTITVYAV TVTDTGYLKYK PISIN YRTEI (配列番号281)</p>	<p>EPKSSD (配列番号1 82)</p>	<p>KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTP EVT CVVDVVSHE DPEVKFNWYVDG VEVHNAKT KPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKARG QPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQ PEN NYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFS C SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号283)</p>	<p>GGCGTGAGCGACGTGCC CGGGATCTAGAAGTGGTG GCTGCTACCCCAACAAGC TTGCTGATCAGCTGGTCT CTGCCGCACCAAGGTAAA GCCAATTATTACCGCATC ACTTACGGCGAAACAGGA GGCAATAGCCCTGTCCAG GAGTTCCTGTGCCTGGT CGTGGTGT TACAGCTACC ATCAGCGGCCTTAAACCT GGCGTTGATTATACCATC ACTGTGTATGCTGTCACT GTTACTGATACAGGGTAC CTCAAGTACAAACCAATT TCCATTAATTACCGGACC GAAATTGAGCCTAAGAGC TCCGACAAAACCCACACA TGCCACCTGTCCAGCC CCCGAACTGCTGGGCGGC CCTTCAGTCTTCCCTTTC CCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCCTGAGGT AAGTTC AACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCACCGTCTGT CACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGT AGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACA ACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCCGGAAA (配列番号301)</p>
----------------------	--	---	------------------------------	--	--

10

20

30

40

【表 4 1】

<p>PRD- 1471</p> <p>DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号 276)</p> <p>DKTHTCPPCP PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKE NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTLF PSRDELTKNQV SLTCLVKGFP SDIAVEWESNG QPENNYKTTTP VLDS DGSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNV FSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号 276)</p> <p>ELQLEESA AEAQEGEL E (配列番 号 187)</p> <p>GVSDVPRDLEVV AATPTSLLISWT LPHAGRAHYRI TYGETGGNSPVQ EFTVPGRGVTAT ISGLKPGVDYTI TVYAVTVTTTKV IHYKPISINYRT EI (配列番号 2 75)</p> <p>GACAAAACACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAA GGGACGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCCT TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCCGCT GAGGCTCAGGAAGGAGAA CTGGAAGGCGTGAGCGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCTCC TGGACACTGCCTCACGCT GGCCGGGCTCATTACTAT AGAATTACCTACGGGGAG ACAGGCGGGAACCTCTCC GTGCAGGAATTCACCGTG CCTGGAAGGGGCGTGACT GCCACCATCAGTGGGCTG AAGCCAGGAGTGGACTAC ACAATTACCGTGTACGCT GTGACTGTGACCACAAC AAAGTGATCCACTACAAA CCCATCTCTATTAATTAT CGGACCGAAATT (配列 番号 302)</p>
--

10

20

30

40

【表 4 2】

<p>PRD- 1472</p>	<p>DKTHTCPCPCF APPELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQGG NVFSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>DKTHTCPCPCF PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTLF PSRDELTKNQV SLTCLVKGFYP SDIAVEWESNG QPENNYKTTTP VLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>ELQLEESA AEAQEGEL E (配列番 号187)</p>	<p>GVSDVPRDLEV AATPTSLLISW APAGLARYYRIT YGETGGNSPVQE FTVVGRGNTATI SGLKPGVDYIT VYAVTIFRDGPV TWDPIISINYRTE I (配列番号27 8)</p>	<p>GACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACA CAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACATAAGACCAGC CCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCGCT GAGGCTCAGGAAGGAGAA CTGGAAGGCGTGAGCGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCAGC TGGGACGCTCCGGCTGGT CTGGCTCGATATTACCGC ATCACTTACGGCGAAACA GGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCAGTGTGGTC GGTCTGGTAAACACAGCT ACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACC ATCACTGTGTATGCTGTC ACTATCTTCCGTGACGGT CCCGTCACCTGGGACCCA ATTTCCATTAATTACCGG ACCGAAATT (配列番号 303)</p>
----------------------	---	---	---	---	--

10

20

30

40

【表 4 3】

<p>PRD- 1473</p>	<p>DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK QPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>DKTHTCPPCPA PELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEY KCKVSNKALPA PIEKTISKAKG QPREPQVYTLF PSRDELTKNQV SLTCLVKGFPY SDIAVEWESNG QPENNYKTTTP VLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSP (配列 番号276)</p>	<p>ELQLEESA AEAQEGEL E (配列番 号187)</p>	<p>GVSDVPRDLEV AATPTSLLISWD APKGLARYRIT YGETGGNSPVQE FTVVGRGNTATI SGLKPGVDYTI VYAVTIFRDGPV TWDPI SINRTE I (配列番号27 9)</p>	<p>GACAAAACACACATGC CCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAA GGGCAGCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCC CCATCCCGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCAGCGAG ATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAG ACAACACTACAAGACCAGC CCTCCCGTGTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCCTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGAGCTGCAG CTGGAGGAAAGCGCCGCT GAGGCTCAGGAAGGAGAA CTGGAAGGCGTGGAGGAC GTGCCACGGGATCTAGAA GTGGTGGCTGCTACCCCC ACAAGCTTGCTGATCAGC TGGGACGCTCCGAAGGGT CTGGCTCGATATTACCGC ATCACTTACGGCGAAACA GGAGGCAATAGCCCTGTC CAGGAGTTCAGTGGGTC GGTCGTGGTAACACAGCT ACCATCAGCGGCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACC ATCACTGTGTATGCTGTC ACTATCTTCCGTGACGGT CCCGTCACCTGGGACCCA ATTTCCATTAATFACCGG ACCGAAATT (配列番号 304)</p>
----------------------	--	---	---	--	--

10

20

30

40

【表 4 5】

典型的配列の要約			
配列番号	説明	名前	配列
306	典型的リーダー	AdNT1	MGVSDVPRDL
307	典型的リーダー	AdNT2	GVSDVPRDL
308	典型的リーダー	AdNT3	VSDVPRDL
309	典型的リーダー	AdNT4	SDVPRDL
310	典型的リーダー	AdNT5	DVPRDL
311	典型的リーダー	AdNT6	VPRDL
312	典型的リーダー	AdNT7	PRDL
---	典型的リーダー	AdNT8	RDL
---	典型的リーダー	AdNT9	DL
211	典型的テール	AdCT1	EIDKPSQ
---	典型的テール	AdCT2	EI
313	典型的テール	AdCT3	EIEPKSS
314	典型的テール	AdCT4	EIDKPC
315	典型的テール	AdCT5	EIDKP
316	典型的テール	AdCT6	EIDK
317	典型的テール	AdCT7	EIDKPS
318	典型的テール	AdCT8	EIEKPSQ
319	典型的テール	AdCT9	EIDKPSQLE
320	典型的テール	AdCT10	EIEDEDEDED
321	典型的テール	AdCT11	EGSGS
322	典型的テール	AdCT12	EIDKPCQ
189	典型的テール	AdCT13	GSGC
323	典型的テール	AdCT14	EGSGC
324	典型的テール	AdCT15	EIDKPCQLE
325	典型的テール	AdCT16	EIDKPSQHSHHHH
326	典型的テール	AdCT17	GSGCHSHHHHH
327	典型的テール	AdCT18	EGSGCHSHHHHH
328	タグ	T1	HHHHHH

10

20

30

【 0 1 8 3 】

IV. 核酸-タンパク質融合技術

ある局面において、本発明は、ミオスタチンと結合するフィブロネクチンタイプIIIドメインを含むアドネクチンを提供する。特定の結合特性を有するFn3ドメインを速やかに製造し試験する方法には、Adnexus、a Bristol-Myers Squibb R&D Companyの核酸-タンパク質融合技術がある。この開示は、*in vitro*発現およびタグ化技術、タンパク質との結合に重要な新規ポリペプチドおよびアミノ酸モチーフを同定するために核酸-タンパク質融合(RNA-およびDNA-タンパク質融合)を用いるいわゆる「PRO融合」を利用する。核酸-タンパク質融合技術はタンパク質とそれをコードする遺伝情報を共有結合する技術である。RNA-タンパク質融合技術およびフィブロネクチンベースの足場タンパク質ライブラリースクリーニング方法の詳細な説明については以下を参照のこと：Szostak et al., 米国特許No. 6,258,558、6,261,804、6,214,553、6,281,344、6,207,446、6,518,018、および6,818,418；Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1997；94：12297-12302；および Kurz et al., Molecules, 2000；5：1259-64(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。

40

【 0 1 8 4 】

V. ベクターおよびポリヌクレオチド

本明細書に記載の種々のタンパク質またはポリペプチドのいずれかをコードする核酸は

50

化学合成することができる。細胞における発現を改善するためにコドン使用を選択することができる。そのようなコドン使用は、選択する細胞種に依存する。専門的なコドン使用パターンが*E. coli*および他の細菌、ならびに哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞、および昆虫細胞について開発されている。例えば、Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2) : 438-442 (1月21日、2003) ; Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1) : 96-105 (10月、2002) ; Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12(5) : 446-449 (10月、2001) ; Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3) : 512-538 (9月、1996) ; および Sharp et al., Yeast, 7(7) : 657-678 (10月、1991)。

【0185】

一般的核酸操作方法は、例えば以下に記載されている : Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第2版、Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、または Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) および 定期更新 (これらの内容は本明細書の一部を構成する)。一般的には、該ポリペプチドをコードするDNAを、哺乳動物、ウイルス、または昆虫遺伝子由来の適切な転写または翻訳調節エレメントと操作可能に結合する。そのような調節エレメントには、転写プロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、および転写および翻訳の終了を調節する配列が含まれる。通常、複製起点によりもたらされる宿主中で複製する能力、および形質転換体の認識を促すための選択遺伝子をさらに組み込む。

【0186】

本明細書に記載のタンパク質は、直接、ならびに好ましくは、シグナル配列または成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的開裂部位を有する他のポリペプチドであるヘテロロガスなポリペプチドとの融合ポリペプチドとして組換え的に製造することができる。好ましい選択したヘテロロガスなシグナル配列は、宿主細胞により認識およびプロセッシング (すなわち、シグナルペプチダーゼにより開裂) されるものである。哺乳動物系でポリペプチドを製造するための典型的N末端リーダー配列は、METDTLLLWLLLWVPGSTG (配列番号177) であり、発現後に宿主細胞により除去される。

【0187】

天然シグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核宿主細胞では、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1pp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーから選ばれる原核性シグナル配列で置換される。

【0188】

酵母で分泌させるには、天然シグナル配列を、例えば、酵母インペルターゼリーダー、ファクターリーダー (Saccharomyces および Kluyveromyces ファクターリーダーを含む)、または酸ホスファターゼリーダー、*C. albicans* グルコアミラーゼリーダー、または米国特許No. 5,631,144に記載のシグナル配列で置換することができる。哺乳動物細胞での発現には、哺乳動物シグナル配列およびウイルス分泌リーダー、例えば、ヘルペスシンプレックスgDシグナルが利用可能である。そのような前駆体領域のDNAを該タンパク質をコードするDNAとリーディングフレーム中で連結することができる。

【0189】

発現およびクローニングベクターはいずれも、該ベクターが1またはそれ以上の選択した宿主細胞中で複製するのを可能にする核酸配列を含む。一般的には、クローニングベクターにおいて、この配列は、該ベクターが宿主染色体DNAと無関係に複製するのを可能にし、複製起点または自己複製配列を含むものである。そのような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスでよく知られている。プラスミドpBR322由来の複製起点がほとんどのグラム陰性細菌に適しており、2マイクロプラスミド起源のものが酵母に適しており、種々のウイルス起源のもの (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、またはBPV) が、哺乳動物細胞のクローニングベクターに有用である。一般的には、複製成分の起点は、哺乳動物発現ベクターには必要でない (SV40起点は早期プロモーターを含むため、典型的にはSV40起点のみを用いることができる。)。

10

20

30

40

50

【0190】

発現およびクローニングベクターは、選択遺伝子（選択可能マーカーともいう）を含みうる。典型的選択遺伝子は、(a)抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリンに対する抵抗性をもたらし、(b)栄養要求性欠損を補い、または(c)複合培地から利用できない必須栄養素を供給するタンパク質をコードする（例えば、桿菌のD-アラニンラセメートをコードする遺伝子）。

【0191】

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識され、本発明のタンパク質（例えば、フィブロネクチンベースの足場タンパク質）をコードする核酸と操作可能に連結するプロモーターを含む。原核性宿主で用いるのに適したプロモーターには、phoAプロモーター、 γ -ラクタマーゼ、およびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、およびハイブリッドプロモーター、例えばtanプロモーターが含まれる。しかしながら、他の知られた細菌プロモーターが適している。細菌系で用いるプロモーターは、本発明のタンパク質をコードするDNAと操作可能に連結したShine-Dalgarno(S.D.)配列も含むだろう。真核生物のためのプロモーター配列が知られている。実質的に、すべての真核生物遺伝子は、転写が開始される部位の約25~30塩基上流に位置するATに富む領域を有する。多くの遺伝子の転写開始点から70~80塩基上流にみられる別の配列にCNCAAT領域（ここで、Nはあらゆるヌクレオチドでありうる）がある。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端にコーディング配列の3'末端にポリAテールを付加するためのシグナルであり得るAATAAA配列がある。これら配列はすべて真核生物発現ベクター中に適切に挿入される。

【0192】

酵母宿主で用いるための適切なプロモーター配列の例には、3-ホスホグリセレートキナーゼまたは他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グルセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのためのプロモーターが含まれる。

【0193】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの転写は、宿主細胞系と適合性であるかぎり、例えば、ウイルス、例えばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えばアデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)のゲノムから得られるプロモーター、ヘテロローガスな哺乳動物プロモーター（例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター）、熱ショックプロモーターにより調節することができる。

【0194】

高等真核生物による本発明のタンパク質をコードするDNAの転写は、該ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより増加することが多い。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン）。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるだろう。例には、複製起点（bp100~270）の後側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、該複製起点の後側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化の増強エレメントについてはYaniv、Nature、297:17-18(1982)も参照のこと。該エンハンサーは、該ベクターのペプチドコーディング配列の5'または3'の位置に挿入することができるが、該プロモーターから5'の部位に位置することが好ましい。

【0195】

真核性宿主細胞（例えば、酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞）に用いる発現ベクターは、転写終了およびmRNAの安定化のために必要

10

20

30

40

50

な配列も含むだろう。該配列は、通常、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'および時に3'の非翻訳領域から利用可能である。これら領域は、本発明のタンパク質をコードするmRNAの該非翻訳部分のポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチド断片を含む。有用な転写終止成分の一つにウシ成長ホルモンポリアデニル化領域がある。WO 94/11026およびその中に記載の発現ベクター参照。

【0196】

組換えDNAは、タンパク質を精製するのに有用なあらゆる種類のタンパク質タグ配列も含むことができる。タンパク質タグの例には、限定されるものではないが、ヒスチジンタグ、FLAGタグ、mycタグ、HAタグ、またはGSTタグが含まれる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主で用いるための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Cloning Vectors: A Laboratory Manual、(Elsevier、New York (1985)) (その中の関連する開示は本明細書の一部を構成する)に記載されている。

【0197】

発現構築物は、当業者に明らかな宿主細胞に適した方法を用いて宿主細胞に導入される。限定されるものではないが、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、または他の物質を用いるトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染(ここで、ベクターは感染性物質である。)を含む、宿主細胞に核酸を導入するための種々の方法が当該分野で知られている。

【0198】

適切な宿主細胞には、原核細胞、酵母、哺乳動物細胞、または細菌細胞が含まれる。適切な細菌には、グラム陰性菌またはグラム陽性菌、例えば、E. coliまたはBacillus sppが含まれる。好ましくはSaccharomyces種由来の酵母、例えばS. cerevisiaeもポリペプチドの製造に用いることができる。種々の哺乳動物または昆虫細胞培養系も組換えタンパク質の発現に用いることができる。昆虫細胞中でヘテロローガスなタンパク質を製造するためのバクテリオウイルス系がLuckow et al.(Bio/Technology、6:47 (1988))に記載されている。適切な哺乳動物宿主細胞系の例には、内皮細胞、COS-7サル腎細胞、CV-1、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、ヒト胎児腎細胞(ceil)、HeLa、293、293T、およびBHK細胞株が含まれる。精製ポリペプチドは、組換えタンパク質を発現するための適切な宿主/ベクター系を培養することにより製造される。多くの応用において本明細書に記載の小さなサイズの多くのポリペプチドは、好ましい発現方法としてE. coli中で発現するだろう。次に、該タンパク質を培地または細胞抽出物から精製する。

【0199】

VI. タンパク質の製造

本発明は、抗ミオスタチンアドネクチンまたはその融合ポリペプチドを発現する細胞株も指向する。抗ミオスタチンアドネクチンを製造する細胞株の作製および単離は、例えば本明細書に記載の当該分野で知られた標準的技術を用いて達成することができる。

【0200】

宿主細胞を、タンパク質産生のために本明細書に記載の発現またはクローニングベクターを用いて形質転換し、次いで、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または目的とする配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾した常套的培養液中で培養する。本明細書に示す実施例において、ハイスルーブットタンパク質製造(HTPP)および中規模製造に用いる宿主細胞はHMS174-細菌株由来である。

【0201】

本発明のアドネクチンは、例えば、原核細胞(例えば、E. coli)中でアドネクチンを産生することにより脱グリコシル化型で得ることもできる。特に、本発明のアドネクチンの脱グリコシル化型はin vitroで試験するとグリコシル化アドネクチンと同じ親和性、効力、および作用機序を示す。

【0202】

本発明のタンパク質を製造するのに用いる宿主細胞は種々の培地で培養することができる。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地((MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダ

10

20

30

40

50

ルベッコ変法イーグル培地((DMEM)、Sigma))などの市販培地が宿主細胞の培養に適している。さらに、Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979)、Barites et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980)、米国特許No. 4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655、5,122,469、6,048,728、5,672,502、または米国特許No. RE 30,985に記載の多くの培地を該宿主細胞の培養液として用いることができる。これら培地には、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の成長因子(例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子)、塩(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびホスフェート)、緩衝剤(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えば、アデノシンおよびチミジン)、抗生物質(例えばゲンタマイシン剤)、微量元素(通常、マイクログラムの範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される)、およびグルコースまたは等価なエネルギー源を補充することができる。あらゆる他の必要な補助剤を、当業者に知られた適切な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等は、発現のために選択した宿主細胞に先に用いたものであり、当業者に明らかであろう。

10

【0203】

本明細書に記載のタンパク質は、細胞-翻訳系を用いて製造することもできる。そのために、該ポリペプチドをコードする核酸を、mRNAのin vitroでの転写を可能にし、利用する特定の無細胞系(無真核生物(例えば無哺乳動物または無酵母細胞)翻訳系、または無原核生物(例えば無細菌細胞)翻訳系)においてmRNAの無細胞翻訳を可能にするように修飾する必要がある。

20

【0204】

本発明のタンパク質は、化学合成により(例えば、Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)に記載の方法により)製造することもできる。該タンパク質の修飾も化学合成により製造することができる。

【0205】

本発明のタンパク質は、タンパク質化学の分野で一般的に知られているタンパク質の単離/精製方法により精製することができる。非限定的例には以下のものが含まれる:抽出、再結晶、塩析(例えば硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムを用いる)、遠心分離、透析、超遠心分離、吸着クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性クロマトグラフィ、順相クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、ゲルろ過、ゲル浸透クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、電気泳動、向流分配、またはそれらのあらゆる組み合わせ。精製後、ポリペプチドを、限定されるものではないがろ過および透析を含む当該分野で知られた種々の方法のいずれかにより種々の緩衝液中で交換および/または濃縮することができる。

30

【0206】

精製したポリペプチドの純度は、好ましくは少なくとも85%、または好ましくは少なくとも95%、および最も好ましくは少なくとも98%である。純度の正確な数値に関わらず、該ポリペプチドの純度は医薬品として充分である。

【0207】

VII. 生物物理学的および生化学的特性

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの標的分子(例えばミオスタチン)との結合は、平衡定数(例えば、解離、 K_D)および動力学定数(例えば、オンレート定数 k_{on} およびオフレート定数 k_{off})について評価することができる。アドネクチンは、一般的には、500nM、100nM、10nM、1nM、500pM、200pM、または100pM以下の K_D で標的分子と結合するが、 k_{off} が充分低いかまたは k_{on} が充分高い場合はより高い K_D 値が許容されよう。

40

【0208】

結合親和性のIn vitroアッセイ

ミオスタチンと結合および拮抗する抗ミオスタチンアドネクチンは、種々のin vitroアッセイを用いて同定することができる。好ましくは、該アッセイは、複数の候補アドネクチンを同時にスクリーニングすることができるハイスループットアッセイである。ある態様において、in vitroアッセイを飽和条件下で行う場合は、ミオスタチンと90%のアミノ

50

酸同一性を有するBMP-11をミオスタチンの代用物として用いることができる。特に、Fcドメインと融合した抗ミオスタチンアドネクチンはミオスタチンとBMP-11の両方と結合することができるが、モノアドネクチンはミオスタチンと選択的に結合する。理論に縛られることなく、これは、一価アドネクチンに比べて二価Fc融合アドネクチンの結合力の増加を反映するかもしれない。BMP11に対する同様の結合増加が、20kDa PEG部分の2末端と融合したアドネクチンを含む二価PEG化アドネクチン、例えばATI-1341でみられた。抗ミオスタチンアドネクチンの結合親和性を測定する典型的アッセイは、下記実施例に記載されており、これには、限定されるものではないが、溶液相法、例えば動力学論的排除アッセイ(KinExA) (Blake et al., JBC 1996 ; 271 : 27677-85 ; Drake et al., Anal Biochem 2004 ; 328 : 35-43)、Biacoreシステム(Uppsala, Sweden)による表面プラズモン共鳴(SPR) (Wellford et al., Opt. Quant. Elect 1991 ; 23 : 1 ; MortonおよびMyszka, Methods in Enzymology 1998 ; 295 : 268)およびホモジニアス時間分解蛍光測定 (HTRF) アッセイ(Newton et al., J Biomol Screen 2008 ; 13 : 674-82 ; Patel et al., Assay Drug Dev Technol 2008 ; 6 : 55-68)が含まれる。

10

20

30

40

50

【0209】

ある態様において、生体分子相互作用は、最大300nm離れた表面の屈折率の変化によるガラス支持体上の薄金膜表面における光の共鳴角の変化を検出するSPRを用いるBiacoreシステムによりリアルタイムでモニターすることができる。Biacore分析は、結合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、および親和性定数をもたらす。結合親和性は、Biacore表面プラズモン共鳴システム(Biacore, Inc.)を用いて結合および解離速度定数を評価することにより得られる。バイオセンサーチップを活性化し、標的を共有結合する。次に、該標的を希釈し、該チップ上に注入し、固定物質の反応単位のシグナルを得る。共鳴単位(RU)のシグナルは固定物質の量に比例するので、これはマトリックス上の固定標的密度の範囲を表す。結合および解離データを同時に大域分析に適合させて1:1の二分子相互作用について正味の発現を解き、 k_{on} 、 k_{off} 、および R_{max} (飽和時の最大反応)に対する最も良い適合値を得る。結合に対する平衡解離定数 K_D をSPR測定値から k_{off}/k_{on} として計算する。

【0210】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、実施例6に記載のSPR親和性アッセイで以下の K_D を示す：500nMまたはそれ以下、400nMまたはそれ以下、300nMまたはそれ以下、200nMまたはそれ以下、150nMまたはそれ以下、100nMまたはそれ以下、90nMまたはそれ以下、80nMまたはそれ以下、70nMまたはそれ以下、60nMまたはそれ以下、50nMまたはそれ以下、40nMまたはそれ以下、30nMまたはそれ以下、20nMまたはそれ以下、15nMまたはそれ以下、10nMまたはそれ以下、5nMまたはそれ以下、または1nMまたはそれ以下。好ましくは該 K_D は15nMまたはそれ以下である。より好ましくは、該 K_D は2.0nMまたはそれ以下である。

【0211】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、実施例4に記載のHTRFアッセイにおいて以下の IC_{50} を示す：5nMまたはそれ以下、4nMまたはそれ以下、3nMまたはそれ以下、2.5nMまたはそれ以下、2nMまたはそれ以下、1.5nMまたはそれ以下、1nMまたはそれ以下、0.5nMまたはそれ以下、0.2nMまたはそれ以下、または0.1nMまたはそれ以下。好ましくは、該 IC_{50} は1.5nMまたはそれ以下である。より好ましくは、該 IC_{50} は0.5nMまたはそれ以下である。

【0212】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、実施例7に記載の動力学論的排除アッセイにおいて以下の K_D を示す：2nMまたはそれ以下、1.5nMまたはそれ以下、1nMまたはそれ以下、900pMまたはそれ以下、850pMまたはそれ以下、800pMまたはそれ以下、750pMまたはそれ以下、700pMまたはそれ以下、650pMまたはそれ以下、600pMまたはそれ以下、550pMまたはそれ以下、500pMまたはそれ以下、450pMまたはそれ以下、400pMまたはそれ以下、350pMまたはそれ以下、340pMまたはそれ以下、330pMまたはそれ以下、300pMまた

はそれ以下、250pMまたはそれ以下、200pMまたはそれ以下、150pMまたはそれ以下、または100pMまたはそれ以下。好ましくは該 K_D は850pMまたはそれ以下である。

【0213】

上記本明細書に記載のアッセイは例示であり、タンパク質間の結合親和性を決定するための当該分野で知られたあらゆる方法(例えば、蛍光ベースの移行(FRET)、酵素免疫測定法、および競合結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ))を用いて本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの結合親和性を評価することができるものと理解すべきである。

【0214】

アンタゴニスト活性のin vitroアッセイ

ミオスタチン活性と拮抗する抗ミオスタチンアドネクチンの能力は、種々のin vitroアッセイを用いて容易に測定することができる。好ましくは、該アッセイは、複数の候補アドネクチンを同時にスクリーニングすることができるハイスループットアッセイである。ある態様において、抗ミオスタチンアドネクチンのミオスタチン活性に対するアンタゴニスト作用は、実施例3に記載の細胞ベースのアクチビン反応性エレメント (ARE)ルシフェラーゼレポーターアッセイで測定することができる。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、ミオスタチンを抗ミオスタチンアドネクチンと一緒にインキュベーションし、次いで該混合物で細胞を刺激すると、ミオスタチン誘導ARE-ルシフェラーゼ活性をコントロールに比べて少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれ以上低下させる。典型的コントロール反応は、細胞をミオスタチンのみか、または過剰の基準ミオスタチン阻害剤、例えば、ヒトアクチビンRIIB Fc Chimer a (R&D Systems)またはMorrison et al. (Experimental Neurology 2009 ; 217 : 258-68)に記載のActRIIb-Fcでプレインキュベーションしたミオスタチンで処理することを含む。他の態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、実施例3に記載のごとくAREルシフェラーゼレポーター活性を以下のIC50で阻害する：500nMまたはそれ以下、400nMまたはそれ以下、300nMまたはそれ以下、200nMまたはそれ以下、100nMまたはそれ以下、50nMまたはそれ以下、10nMまたはそれ以下、5nMまたはそれ以下、1nM、0.5nMまたはそれ以下、0.4nMまたはそれ以下、0.3nMまたはそれ以下、0.2nMまたはそれ以下、または0.10nMまたはそれ以下。

【0215】

他の態様において、抗ミオスタチンアドネクチンのミオスタチン活性に対するアンタゴニスト効果は、実施例5に記載のごとくミオスタチン処理細胞におけるSMADリン酸化の程度を測定することにより決定することができる。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、ミオスタチンと抗ミオスタチンアドネクチンを同時にインキュベーションし、次いで該混合物で細胞を刺激すると、ミオスタチン誘導SMADリン酸化をコントロールに比べて少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%またはそれ以上減少させる。典型的コントロール反応は、細胞をミオスタチンのみか、または過剰の基準ミオスタチン阻害剤、例えばヒトアクチビンRIIB Fcキメラ(R&D Systems)またはMorrison et al. (Experimental Neurology 2009 ; 217 : 258-68)に記載のActRIIb-Fcとプレインキュベーションしたミオスタチンで処理することを含む。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、実施例5に記載のごとく12点または4点阻害反応においてSMADリン酸化を以下のIC50で阻害する：1nMまたはそれ以下、0.8nMまたはそれ以下、0.6nMまたはそれ以下、0.4nMまたはそれ以下、0.3nMまたはそれ以下、0.2nMまたはそれ以下、または0.1nMまたはそれ以下。他の態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは10nMで、実施例5に記載のようにミオスタチンによるSMADリン酸化を以下のごとく阻害する：少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、または少なくとも98%またはそれ以上。

10

20

30

40

50

【0216】

さらに、運動ニューロン疾患を研究するための、細胞、組織培養、および組織学的方法を用いる種々の *in vitro* モデル系が知られている。例えば、ラット脊髄器官切片のグルタミン酸興奮毒性は、運動ニューロン変性の抑制における抗ミオスタチンアドネクチンの有効性を試験するためのモデル系として有用である。Corse et al., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6 : 335 346。ALSの研究に用いる *in vitro* 系の考察は、例えば、Bar, P. R., *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 405 : 285 295 ; Silani et al., *J. Neurol.* (2000) 247 Suppl 1 : 12 8 36 ; Martin et al., *Int. J. Mol. Med.* (2000) 5 : 3 13 参照のこと。本明細書に記載のアッセイは例示であり、ミオスタチン活性を示すのに用いることができる当該分野で知られたあらゆる方法が本発明の抗ミオスタチンアドネクチンのミオスタチンに対するアンタゴニスト効果を試験するのに適していると理解すべきである(例えば、SMAD標的遺伝子のmRNAまたはARE含有遺伝子のmRNAのリアルタイムRT-PCR(例えば、Smad 7 ; Ciarmela et al., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011 ; 96 ; 755-65))。

10

【0217】

*in vivo*モデル

例えば、筋肉、神経筋、神経学、および代謝障害に関連する筋肉消耗に関連する疾患、障害、および病状の症状を再現する種々の当該分野で認められた動物モデルが存在する。これらのモデルを用いて本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの有効性を試験することができる。

【0218】

例えば、そのような動物モデルの非限定的例には、例えば以下のものが含まれる : X-関連筋ジストロフィーマウス(mdx)モデル(US2011/0008375、Gehrig et al., *Nature* 2012 ; 484 : 394-8) (さらなる4系統のmdxマウス - mdx2cv、mdx3cv、mdx4cv、またはmdx5cvマウスを含む(Phelps et al., *Human Molecular Genetics.* 1996 ; 5(8) : 1149-1153))、ジストロフィンホモログのウトロフィンをさらに除去したmdxマウス(mdx/utr-/-)(Deconinck et al., *Cell.* 1997 ; 90(4) : 717-727)、-SG-ヌルC57BL/6 マウス (Duclos et al. (1998) *J. Cell Biol.* 142、1461 ~ 1471)、およびNakamura et al. (*J Biomed Biotechnol.* 2011 ; Article ID No : 184393)に最近記載のもの、例えばネズミDMD遺伝子のエクソン52が欠失したmdx52マウス、ゴールドンレトリバー筋ジストロフィー(GRMD)モデル、イヌX-関連筋ジストロフィー(CXMDJ)モデル、および肥大性ネコ筋ジストロフィー(HFMD)モデル(例えば、Shelton et al., *Neuromuscular Disorders.* 2005 ; 15(2) : 127-138)。

20

30

【0219】

運動ニューロン障害(例えばALS)を試験するための動物モデルにはALS関連突然変異体Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)遺伝子(mSOD1G93Aおよび/またはmSOD1G37R)を有するトランスジェニックマウスがある。該マウスは、家族性ALSの多くの臨床的および病的特徴を有する優性遺伝性成人発症麻痺障害を発現する。(例えば、Gurney et al., *Science* (1994) 264 : 1772 1775 ; Nagano et al., *Life Sci* (2002) 72 : 541 548)。他の動物モデルには、進行性運動ニューロパシー(pmn)およびかんしゃく(wobbler)の天然マウスモデルがある(HaeggeliおよびKato, *Neurosci. Lett.* (2002) 335 : 39 43)。ALSなどの運動ニューロン疾患の研究に用いる種々の動物モデルの総説は、Jankowsky et al., *Curr Neurol Neurosci. Rep.* (2002) 2 : 457 464 ; Elliott, J. L., *Neurobiol. Dis.* (1999) 6 : 310 20 ; およびBorchelt et al., *Brain Pathol.* (1998) 8 : 735 757などを参照のこと。

40

【0220】

ALSに加えて他の神経変性性疾患または神経病理学的疾患の動物モデルには、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)を評価するためのトランスジェニックマウスモデル(Katsuno et al., *Neuron* (2002) 35 : 843 854)、ヒトまひ性灰白髄炎の動物モデル(Ford et al., *Microb. Pathog.* (2002) 33 : 97 107)、脊髄性筋萎縮症の動物モデル(Schmid et al., *J. Child Neurol.* 22、1004-1012、2007)、末梢性ミオパシーおよび遺伝性封入体ミオパシーの動物モデル(Malicdan et al., *Acta Myol.* 2007 December ; 26(3) : 171-175)、遺伝性脱髄疾患の

50

ネズミモデル(Suzuki et al., *Microsc. Res. Tech.* 1995 ; 32 : 204-214)、およびMeyer ZuHoerste et al. (*Curr. Opin. Neurol.* 2006 ; 19 : 464-473)に記載のものが含まれる。

【 0 2 2 1 】

アτροφイおよび/または不活発による筋肉容量の減少に対する本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの効果を試験するための動物モデルには、限定されるものではないが以下のものが含まれる：一側性運動抑制の動物モデル(Madaro et al., *Basic Applied Myology* 2008 ; 18 : 149-153)、アキレス腱断裂(腱切除)(Bialek et al., *Physiol Genomics* 2011 ; 43 : 1075-86)、およびPowers et al. (*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 ; 288 : R337-44)に記載のもの(例えば、動物の後肢懸垂、肢(脚)運動抑制、および調節機械換気)が含まれる。

10

【 0 2 2 2 】

代謝障害の治療における本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの有効性を試験するための関連動物モデルには、限定されるものではないが以下のものが含まれる：Ramaro et al. (*Indian J Med Res* 2007 ; 125 : 451-472)およびKennedy et al. (*Disease Models & Mechanisms* 2010 ; 3 : 156-166)に記載のものが含まれる(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。そのような動物モデルの非限定的例には、Lepob/obマウス、Leprdbマウス、Kuo Kondoマウス、KK/Ayマウス、ニュージーランド肥満(NZO)マウス、NONcNZO10マウス、Tsumara Suzuki肥満糖尿病(TSOD)およびTsumara Suzuki非肥満(TSNO)マウス、M16マウス、Zucker肥満ラット、Zucker糖尿病肥満ラット、SHR/N-cpラット、JCR/LA-cpラット、Otsuka Long Evans Tokushima肥満ラット、肥満アカゲザル、Cohen糖尿病ラット、Goto-Kakizakiラット、および非肥満突然変異体C57 BL/6(Akita)マウス。2型糖尿病は、食餌により、例えば、非肥満、非糖尿病C57BL6マウス(Surwit et al., *Diabetes* 1988 ; 37 : 1163-7)に高脂肪食を与えることにより誘導することもできる。2型糖尿病は、例えば、金チオグルコース(Le Marchand Brustel et al., *Am J Physiol* 1978 ; 234 : E348-58)またはストレプトゾトシンを用いて化学的に誘導するか、または外科的に誘導することもできる(例えば、部分膵臓切除糖尿病動物)(McNeil JH., *Experimental models of diabetes*. Florida, US : CRC Press LLC ; 1999 ; Sasaki et al., *In Vivo* 2000 ; 14 : 535-41)。多くの遺伝的動物モデルが、例えばKennedy et al., 2010 (上記)に記載の代謝障害の症状および表現型を再現することも知られている。

20

【 0 2 2 3 】

ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの筋肉量または容量の増加効果は、実施例9に記載のマウスの皮下注射により試験することができる。ミオスタチンの阻害が筋肉量を増加させるならば、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、アドネクチンの能力を決定するのに用いることができる程度に体重および筋肉量を増加させると予期される。

30

【 0 2 2 4 】

ある態様において、特に抗ミオスタチンアドネクチンがマウスに免疫原性であり(例えば、ヒトフィブロネクチンタイプIIIドメインの使用による)、慢性処置が望ましい場合に、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンを細胞性または液性免疫応答を起こすことができないSCIDマウスに投与することができる。ある態様において、SCIDマウスは、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンによる慢性処置に適した免疫不全マウスモデルを開発するために他の遺伝的モデル、例えば本明細書に記載のもの(例えば糖尿病マウス)と交配することができる。

40

【 0 2 2 5 】

VIII. 治療的応用

ある局面において、本発明は、ミオスタチン関連疾患または障害、例えば、筋肉消耗障害、筋萎縮症、代謝障害、および骨変性障害の治療に有用な抗ミオスタチンアドネクチンを提供する。したがって、ある態様において、本発明は、有効量のミオスタチン結合ポリペプチド(すなわち、抗ミオスタチンアドネクチン)を対象に投与することを含む対象のミオスタチン関連疾患または障害を軽減または阻害する方法を提供する。ある態様におい

50

て、該対象はヒトである。ある態様において、該抗ミオスタチンアドネクチンは、哺乳動物、特にヒトに医薬的に許容される。「医薬的に許容される」ポリペプチドは、著しい有害な医学的結果を生じることなく動物に投与される、例えば実質的にエンドトキシン不含または非常に低いエンドトキシンレベルのポリペプチドをいう。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、治療する特定の障害または疾患に有用な当該分野で知られた物質と組み合わせて（同時にまたは分離して）対象に投与される。

【0226】

ある態様において、抗ミオスタチンアドネクチン療法が標的とする患者のポピュレーションは、例えば、年齢、既存病状、遺伝的性質、および/または併存疾患により治療する疾患、障害、または病状の標準的療法に適さないものである。本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、実質的な副作用（例えば、生殖行動）または安全性の心配を伴う既存療法に対する代わりとなることができる。本発明の抗ミオスタチンアドネクチンが有用な典型的疾患、障害、および病状を以下により詳細に説明する。

10

【0227】

筋肉、神経学的、および代謝疾患および障害

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、筋肉消耗および/または筋萎縮症に関連する筋肉、神経学的、および代謝障害を治療するのに用いることができる。例えば、*in vivo* のミオスタチン過剰発現は悪液質に特徴的な兆候および症状を誘導し、ミオスタチン結合物質は、ミオスタチンの筋肉消耗作用を部分的に解決することができる (Zimmers et al., Science 2002 ; 296 : 1486-8)。AIDS患者もAIDSでない患者または体重減少を示さないAIDS患者に比べてミオスタチン免疫反応性物質の血清レベルの増加を示す (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS 1998 ; 95 : 14938-43)。ミオスタチンの心特異的排除は心不全のマウスにおける骨格筋萎縮を減少させ、逆に、特に心臓におけるミオスタチンの過剰発現は筋肉消耗を誘発するのに充分であることもわかっている (Breitbart et al., AJP-Heart ; 2011 ; 300 : H1973-82)。反対に、ミオスタチンノックアウトマウスは、対応する野生型に比べて筋肉量の増加と、年齢依存性の脂肪蓄積の減少を示す (McPherron et al., J. Clin. Invest. 2002 ; 109 : 595-601)。

20

【0228】

本発明の方法にしたがって治療することができる典型的障害には、ミオパシーおよびニューロパシー（例えば、運動ニューロン疾患、神経筋および神経学的障害を含む）が含まれる。

30

【0229】

例えば抗ミオスタチンアドネクチンを用いて、遺伝的ミオパシーおよび神経筋障害（例えば、筋ジストロフィー (Gonzalez-Kadavid et al., PNAS, 1998 ; 95 : 14938-43)、運動ニューロン障害、先天性ミオパシー、炎症性ミオパシー、および代謝性ミオパシー）および後天性ミオパシー（例えば、薬剤性ミオパシー、毒素性ミオパシー、感染性ミオパシー、腫瘍随伴性ミオパシー、および重症疾患に伴う他のミオパシー）を治療することができる。

【0230】

そのような障害には、限定されるものではないが以下のものが含まれる：Duchenne筋ジストロフィー、進行性筋ジストロフィー、Becker型筋ジストロフィー、Dejerine-Landouzy筋ジストロフィー、Erb筋ジストロフィー、Emery Dreifuss筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、眼咽頭筋筋ジストロフィー (OPMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、乳児神経軸索性筋ジストロフィー、筋硬直性ジストロフィー (Steinert病)、遠位筋ジストロフィー、ネマリンミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、非ジストロフィ性ミオトニー、周期性四肢麻痺、脊髄性筋萎縮症、脊髄性筋萎縮症 (SMA)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、原発性側索硬化症 (PLS)、進行性筋萎縮症 (PMA)、遠位ミオパシー、ミオチューブラー/中心核ミオパシー、ネマリンミオパシー、ミニコアコア病、セントラルコア病、デミノパシー、封入体筋炎、皮膚筋炎、多発筋炎、ミトコンドリアミオパシー、先天性筋無力症候群、重症筋無力症、ポリオ後筋機能障害、ステロイドミオパシ

40

50

一、アルコール性ミオパシー、周術期筋萎縮症、およびICUニューロミオパシー。

【0231】

抗ミオスタチンアドネクチンで治療することができる遺伝性および後天性ニューロパシーおよび神経根障害には限定されるものではないが以下のものが含まれる：

硬脊柱症候群、筋眼脳病、遺伝性運動および感覚性ニューロパシー、Carcot-Marie-Tooth病、慢性炎症性ニューロパシー、進行性肥厚性ニューロパシー、ソーセージ様ニューロパシー、狼瘡、ギランバレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、多発性硬化症、サルコイドーシス、糖尿病性ニューロパシー、アルコール性ニューロパシー、疾患関連ニューロパシー(例えば、HIV/AIDS、ライム病)、毒素性ニューロパシー(例えば、重金属、化学療法)、圧迫性ニューロパシー(例えば、腫瘍、絞扼性ニューロパシー)、および傷害および外傷性ニューロパシー(例えば、馬尾症候群、対麻痺、四肢麻痺)。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、筋ジストロフィー(例えば、Duchenne筋ジストロフィー、Becker型筋ジストロフィー)、ALS、および骨格筋減少症を治療するのに用いることができる。

10

【0232】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンで治療することができるさらなる筋肉消耗関連傷害には以下のものが含まれる：悪液質、消耗症候群、骨格筋減少症、鬱血性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症(肺悪液質)、心疾患または心不全(心悪液質)、癌、AIDSによる消耗、腎不全による消耗、腎疾患、跛行、透析性悪液質、尿毒症、リウマチ性関節炎、筋肉損傷、外科手術、損傷した筋肉の修復、虚弱、非活動性萎縮、骨粗鬆症、変形性関節症、靭帯の成長および修復。

20

【0233】

本発明の方法を用いて、廃用性筋萎縮症に罹患した対象の筋肉容量を増加させることができる。非活動性萎縮は、限定されるものではないが以下のものを含む長期臥床または廃用をもたらすあらゆる傷害または状態を含む多くの原因から生じうる：長期安静、車いす生活、四肢固定、機械的換気による横隔膜の除荷(unloading)、実質臓器移植、関節置換術、卒中、CNS損傷性虚弱、脊髄損傷、重度の火傷からの回復、安静慢性血液透析、外傷後回復、敗血症後回復、および微小重力への暴露(Powers et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005 ; 288 : R337 ~ 44)。

【0234】

さらに、脂肪/筋肉比の加齢性増加、および加齢性筋萎縮は、ミオスタチンと関連するようである。例えば、平均血清ミオスタチン-免疫反応性タンパク質は、若年(19~35歳)、中年(36~75歳)、および高齢(76~92歳)の男女の群で加齢と共に増加したが、平均筋肉量および無脂肪量はこれらの群で加齢と共に減少した(Yarasheski et al. J Nutr Aging 6(5) : 343-8 (2002))。したがって、老化による筋萎縮症を有する対象および/または骨格筋減少症などによる虚弱な対象も本発明の抗ミオスタチンアドネクチンによる治療が有効であろう。

30

【0235】

食用動物に有効用量の抗ミオスタチンアドネクチンを投与することにより該動物の筋肉量を増加させる方法も予期される。成熟C末端ミオスタチンポリペプチドはすべての種で同じであるので、抗ミオスタチンアドネクチンは、あらゆる農業的に重要な種、例えば、限定されるものではないが、ウシ、ニワトリ、シチメンチョウ、およびブタの筋肉量を効果的に増加し、脂肪の減少させると予期される。

40

【0236】

筋肉消耗障害または筋萎縮症の治療における抗ミオスタチンアドネクチンの有効性は、例えば、筋肉量または容量、筋肉細胞の数の増加(過形成)、筋肉細胞サイズの増加(肥大)、および/または筋肉強度の増加を測定するための1またはそれ以上の方法により決定することができる。例えば、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの筋肉容量の増加効果を下記実施例に示す。「筋肉量の増加」を決定する方法は当該分野でよく知られている。例えば、筋肉容量を、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの投与前後に、標準的技術、例え

50

ば水中体重測定(例えば、Bhasin et al. New Eng. J. Med. (1996) 335 : 1-7参照)および二重エネルギーX線吸収測定法(例えば、Bhasin et al. Mol. Endocrinol. (1998) 83 : 3155-3162参照)を用いて測定することができる。筋肉サイズの増加は、少なくとも約5~10%、好ましくは少なくとも約10~20%またはそれ以上の体重増加により証明することができる。

【0237】

代謝障害

ミオスタチン活性および/またはシグナル伝達を減少させる本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、代謝障害、例えば肥満、II型糖尿病、糖尿病性障害、メタボリックシンドローム、および高血糖症の治療に有用である。

【0238】

ミオスタチンはII型糖尿病の病因に関与する。ミオスタチンは脂肪組織に発現し、ミオスタチン欠損マウスは加齢につれて脂肪蓄積の減少を示す。さらに、グルコース負荷、脂肪蓄積、および総体重は、ミオスタチン欠損アグーチレーザルイエローおよび肥満(Lep^{ob}/^{ob})マウスで減少する(Yen et al., FASEB J. 8 : 479, 1994 ; McPherron et al., 2002)。US2011/0008375に記載のように、ミオスタチンアンタゴニストは、加齢マウスモデルの脂肪/筋肉比を減少させ、STZ誘導糖尿病マウスの腎臓肥大を減少させ、骨格筋量および除脂肪体重を維持することができる。本明細書で用いている「肥満」は、健康に悪影響がありうる程度に過剰な体脂肪が蓄積している状態である。肥満は、通常、体重指数(BMI)30kg/m²またはそれ以上で定義され、BMI 25kg/m²またはそれ以上で定義される体重超過と区別される(例えば、World Health Organization (2000) (PDF)、Technical report series 894 : Obesity : Preventing and managing the global epidemic. Geneva : World Health Organization参照)。過剰の体重は、種々の疾患、具体的には、心血管疾患、II型糖尿病、閉塞性睡眠時無呼吸、ある種の癌、および変形性関節症と関連がある。

【0239】

肥満の対象は、BMI (BMIは対象の体重を身長²で割って計算する)、腹囲およびウエスト/ヒップ比(絶対腹囲(男性 > 102cmおよび女性 > 88cm)およびウエスト/ヒップ比(腹囲÷ヒップ周りが男性で > 0.9、女性で > 0.85)(例えば、Yusuf S, et al., (2004). Lancet 364 : 937-52参照)および/または体脂肪率(総体重のパーセンテージで表した総体脂肪 : 体脂肪が25%以上の男性および体脂肪が33%以上の女性が肥満である ; 体脂肪率は、式 : 体脂肪% = (1.2 * BMI) + (0.23 * 年齢) - 5.4 - (10.8 * 性) (ここで、性は、女性が0、男性が1である)によりヒトのMBIから推定することができる。)を測定することにより同定することができる。体脂肪率測定法には、例えば、コンピュータ断層撮影法(CTスキャン)、磁気共鳴画像法(MRI)、および二重エネルギーX線吸収測定法(DEXA)が含まれる。

【0240】

用語「II型糖尿病」は、体内のインスリンが有効に働かないことで生じる一生続く慢性疾患を表す。II型糖尿病の主成分は、膵臓で産生されたインスリンがグルコースが内部でエネルギーを産生する脂肪および筋肉細胞と結合することができず、高血糖症(高血液グルコース)を生じる、「インスリン抵抗性」である。それを補うために、膵臓は、より多くのインスリンを産生し、細胞はこのインスリンの氾濫によりさらに耐性となり、高グルコースレベルとしばしば高インスリンレベルの悪循環を生じる。

【0241】

本明細書で用いている用語「糖尿病に伴う障害」または「糖尿病性障害」または「糖尿病関連障害」は、通常、糖尿病に伴うかまたは関連する病状および他の疾患を表す。糖尿病に伴う障害の例には、例えば以下のものが含まれる : 高血糖症、高インスリン血症、高脂血症、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、肥満、糖尿病性網膜症、黄斑変性、白内障、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、糖尿病性ニューロパシー、勃起不全、月経前症候群、血管再狭窄、潰瘍性大腸炎、冠動脈性心疾患、高血圧、狭心症、心筋梗塞、卒中、皮膚および結合素子委障害、足潰瘍、代謝性アシドーシス、関節炎、および骨粗鬆症。

【0242】

10

20

30

40

50

代謝障害の治療における抗ミオスタチンアドネクチンの有効性は、例えば、インスリン感受性の増加、対象由来の細胞によるグルコース摂取の増加、血液グルコースレベルの低下、および体脂肪の減少を測定するための1またはそれ以上の方法により決定することができる。

【0243】

例えば、II型糖尿病を有するかまたは糖尿病を生じるリスクがある対象のHbA1cレベルをモニターすることができる。本明細書で用いている用語「ヘモグロビン1AC」または「HbA1c」は、ヘモグロビンB鎖の非酵素的糖化の産物を表す。糖尿病患者のHbA1cレベルの望ましい標的範囲は、American Diabetes Association (ADA)ガイドライン(すなわち、Standards of Medical Care in Diabetes (Diabetes Care 2012 ; 35(Suppl 1) : S511-563)から決定することができる。最新のHbA1c標的レベルは一般的には糖尿病患者で<7.0%であり、糖尿病でないヒトのHbA1c値は典型的には6%未満である。したがって、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの有効性は、対象のHbA1cレベルの観察された減少により決定することができる。

10

【0244】

本発明の方法は、さらに、抗ミオスタチンアドネクチンを単独または血糖調節(例えば、インスリン、GLP1)または当該分野で知られた糖尿病関連合併症のための当該分野で知られた他の薬剤と組み合わせて投与することを含む。

【0245】

他の障害

ミオスタチンノックアウトマウスは、筋肉量の増加、および無機物含有量およびマウス上腕骨の密度の増加、および筋肉が結合する領域の柱状骨および皮質骨両方の無機物含有量の増加(Hamrick et al. Calcif Tissue Intl 2002 ; 71 : 63-8)を示す。これは、筋肉量の増加は、骨強度の改善を助け、骨粗鬆症および他の変性骨疾患を減少させるのに役立つかもしれないことを示唆する。

20

【0246】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンが有用なさらなる疾患または障害には、損傷の治療、抗線維性疾患、ランバート・イートン症候群、およびパーキンソン病が含まれる。

【0247】

併用(組み合わせ)療法

本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンは以下のものと組み合わせて用いることができる:抗糖尿病薬、抗高血糖薬、抗高インスリン血症薬、抗網膜症薬、抗ニューロパシー薬、抗神経変性薬、抗腎症薬、抗アテローム性動脈硬化薬、抗虚血薬、抗高血圧薬、抗肥満薬、抗脂質異常症薬、抗高脂肪薬、抗高トリグリセリド薬、抗高コレステロール薬、抗再狭窄薬、抗膵臓薬、脂質低下薬、食欲抑制剤、記憶増強剤、抗認知症薬または認識促進薬、食欲抑制薬、ニューロンまたは筋肉修復治療、心不全治療、末梢動脈疾患の治療、および抗炎症薬。

30

【0248】

抗ミオスタチンアドネクチンと組み合わせて用いる抗糖尿病薬には、限定されるものではないがインスリン分泌促進剤またはインスリン増感剤、GPR40レセプターモジュレーター、または他の抗糖尿病薬が含まれる。これら薬剤には、例えば、限定されるものではないが以下のものが含まれる:ジペプチジルペプチダーゼIV(DP4)阻害剤(例えば、シタグリプチン、サクサグリプチン、アログリプチン、ビルダグリプチンなど)、ピグアニド(例えば、メトホルミン、フェンホルミンなど)、スルホニル尿素(例えば、グリブリド、グリメピリド、グリピジドなど)、グルコシダーゼ阻害剤(例えば、アカルボース、ミグリトール、など)、PPAR アゴニスト、例えばチアゾリジンジオン(例えば、ロシグリタゾン、ピオグリタゾンなど)、PPAR / デュアルアゴニスト(例えば、ムラグリラザル、テサグリタザル、アレグリタザルなど)、グルコキナーゼ活性化剤(Fyfe et al., Drugs of the Future, 34(8) : 641 ~ 653 (2009)に記載のもの(この内容は本明細書の一部を構成する))、GPR119レセプターモジュレーター(MBX-2952、PSN821、APD597など)、SGLT2阻害剤(ダバグリ

40

50

フロジン、カナグリフロジン、レマグリフロジンなど)、アミリンアナログ(例えばプラムリンチド)および/またはインスリン。糖尿病を治療するための最新および新規療法の総説は、Mohler et al., Medicinal Research Reviews, 29(1) : 125-195 (2009)、および Mizuno et al., Current Medicinal Chemistry, 15 : 61-74 (2008)に記載されている。

【0249】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、所望により、以下の1またはそれ以上の食欲減退剤と組み合わせて用いることもできる：ジエチルプロピオン、フェンジメトラジン、フェンテルミン、オルリスタット、シブトラミン、ロルカセリン、プラムリンチド、トピラメート、MCHR1レセプターアンタゴニスト、オキシントモジュリン、ナルトレキソン、アミリンペプチド、NPY Y5レセプターモジュレーター、NPY Y2レセプターモジュレーター、NPY Y4レセプターモジュレーター。セチリスタット、5HT2cレセプターモジュレーターなど。本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、グルカン様ペプチド-1レセプター(GLP-1R)、例えばエクセナチド、リラグルチド、GPR-1(1-36)アミド、GLP-1(7-36)アミド、GLP-1(7-37)(米国特許No. 5,614,492 (Habener)に記載されている(この内容は本明細書の一部を構成する))のアゴニストと組み合わせて用いることもできる。これらは、注射、鼻内、または経粘膜またはパッカル手段により投与することができる。肥満を治療するための最新および新規療法は総説は、Melnikova et al., Nature Reviews Drug Discovery, 5 : 369-370 (2006) ; Jones, Nature Reviews : Drug Discovery, 8 : 833-834 (2009) ; Obici, Endocrinology, 150(6) : 2512-2517 (2009) ; および Elangbam, Vet. Pathol., 46(1) : 10-24 (2009)に記載されている。

10

20

【0250】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、治療する特定疾患または障害に適した1またはそれ以上のさらなる治療薬とともに投与することもできる。さらなる薬剤の非限定的例には、代謝障害、例えばII型糖尿病および骨格筋減少症を治療するのに有用なもの(限定されるものではないが、GLP-1、GLP-1様、アミリン、およびFGF21を含む) ; 抗線維化疾患、神経筋疾患、運動ニューロン疾患、および骨格筋減少症を治療するのに有用なもの(限定されるものではないが、グレリン、SARM、リルゾール、テストステロン、アンドロゲン、成長ホルモン、ホルモン置換療法、COX-2阻害剤、トロポニン活性化剤、2アゴニスト、CTLA4-Ig (例えば、アベタセプト、ベラタセプト)および抗TGFβ抗体を含む) ; 悪液質および他の消耗症候群を治療するのに有用なもの(限定されるものではないが、TGFβレセプターキナーゼ阻害剤、抗IL-6、およびユビキチン-プロテアソーム阻害剤を含む) ; ミオトニーおよびPLUSに伴う筋けいれんを治療するのに有用なもの(限定されるものではないが、フィトイン、キニン、バクロフェン、チザニジンを含む) ; ニューロパシーに有用なもの(抗うつ薬(例えば、三環系抗うつ薬、および選択的セロトニン-ノルエピネフリン再吸収阻害剤(SNRI's))、抗痙攣薬、カンナビノイド、ボツリヌス毒素A型、NMDAアンタゴニスト(例えば、ケタミン)、栄養補助食品(例えば、リポ酸およびベンホチアミンを含む) ; 慢性炎症性ニューロパシーを治療するのに有用なもの(限定されるものではないが、コルチコステロイド、静脈内免疫グロブリン、および免疫抑制剤(例えば、シクロホスファミド、シクロスポリン、アザチプリン、ミコフェノレートモフェチル、抗胸腺細胞グロブリン、リツキシマブ) ; およびギランバレー症候群、骨格筋減少症、骨折、および骨損失を治療するのに有用なもの(限定されるものではないが、Boniva(イバンドロネート)およびPTHを含む)が含まれる。

30

40

【0251】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、症候性療法に用いる1またはそれ以上のさらなる薬剤とともに投与することができる。ALSの症状を治療するためのそのような薬剤の非限定的例には、ミトコンドリア透過性転移(MPT)ポア活性化剤、速筋トロポニン活性化剤、マクロファージ調節薬(例えば、NP001)、リソゾーム保存疾患治療薬(例えば、NP003)、およびニコチンアセチルコリンレセプター(nAChR)アンタゴニストが含まれる。DMD/BMDの症状を治療するのに用いるさらなる薬剤の非限定的例にATPレベルを増加させる薬剤がある。

50

【0252】

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、疾患修飾療法に用いる1またはそれ以上のさらなる薬剤とともに投与することもできる。ALSを治療するためのそのような薬剤の非限定的例には、フリーラジカルスカベンジャー(例えば、エダラボン(ノルフェナゾン)、CV-3611)、VEGFアゴニスト(例えば、sNNO029)、ナゴ-Aタンパク質I(例えば、GSK122324)、SOD1阻害薬(例えば、ISIS-SOD1Rx)、およびPGEシンターゼ1阻害薬(例えば、AAD-2004)が含まれる。DMD/BMDを治療するためのそのような薬剤の非限定的例には、エクソンスキッピングを促進するもの(例えば、アンチセンス分子、例えばドリサペルセン(PRO051/GSK2402968)、PRO044、エテルピルセン、AVI-4658、AVI-5038、アタルレン(PTC124))、遺伝子療法薬、抗炎症薬(例えば、CRD007)、および抗繊維化薬(例えば、HT-100)が含まれる。

10

【0253】

上記の通り、エクソンスキッピングを促進する薬剤を、Duchenne筋ジストロフィーおよびBecker型筋ジストロフィーを治療するために本発明の抗ミオスタチンアドネクチンと組み合わせ投与することができる。機能的ジストロフィンを修復するための標的とすることができる特定のエクソンの例には、エクソン7、8、17、43、44、45、46、50、51、52、53、および55が含まれる(例えば、Lu et al., Molecular Therapy 2011; 19: 9-15参照)。ある態様において、2以上の薬剤、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて多エクソンスキッピングを誘導することができる。

【0254】

IX. 医薬組成物

本発明は、さらに、適切な監督機関(例えば、FDA)が測定したときに、実質的にエンドトキシン不含であるか、または少なくとも許容レベルに過ぎないエンドトキシンを含む、本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンまたはその融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。

20

【0255】

本発明の組成物は、経口投与用の丸剤、錠剤、カプセル剤、液剤、または持続放出錠；静脈内、皮下、または非経口(parenteral)投与用の液剤；または局所投与用のゲル、ローション、軟膏、クリーム、またはポリマーまたは多の持続放出ビークルの形であり得る。

【0256】

組成物を製造するための当該分野でよく知られた方法は、例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」(第20版、A. R. Gennaro AR.編、2000、Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia、Pa.)に記載されている。非経口投与用の組成物は、例えば、賦形剤、無菌水、生理食潜水、ポリアルキレングリコール、例えばポリエチレングリコール、植物起源の油、または水素添加ナフタレンを含みうる。生体適合性、生体分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーは、該化合物の放出を調節するのに用いることができる。ナノ粒子組成物(例えば、生体分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソーム)は、該化合物の生体分布を調節するのに用いることができる。他の有用でありうる非経口送達システムには、include エチレン-ビニルアセテートコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋込型注入システム、およびリポソームが含まれる。該組成物中の該化合物の濃度は、投与する薬剤の用量および投与経路を含む多くの因子に応じて変化する。

30

40

【0257】

許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、用いる用量および濃度でレシピエントに無毒であり、これらには以下のものが含まれる：緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸；抗酸化剤(アスコルビン酸およびメチオニンを含む)；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール)；低分子量(約10

50

残基以下)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖類、二糖類、および他の炭化水素（グルコース、マンノース、またはデキストラン；キレート剤（例えばEDTA）；糖（例えばショ糖、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール）；塩形成対遺伝子（例えばナトリウム）；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤（例えばTween、PLURONIC（登録商標）またはポリエチレングリコール(PEG)）。

【0258】

本発明の該ポリペプチドは、所望により医薬的に許容される塩、例えば医薬産業の分野で通常用いられる非毒性酸付加塩または金属錯体として投与することができる。酸付加塩の例には以下のものが含まれる：有機酸、例えば酢酸、乳酸、パモン酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはトリフルオロ酢酸など；ポリマー酸、例えばタンニン酸、カルボキシメチルセルロースなど；および無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸など。金属錯体には、亜鉛、鉄などが含まれる。ある例において、該ポリペプチドは熱安定性を増加するために酢酸ナトリウム存在下で製剤化される。

【0259】

活性成分は、コアセルベーション技術または界面重合により製造したマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル、およびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル）、コロイドドラッグデリバリーシステム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中、またはマクロエマルジョン中に封入することもできる（例えば、それぞれの。そのような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences第16版、Osol、A.編(1980)に記載されている。

【0260】

持続放出製剤を製造することができる。持続放出製剤の適切な例には、本発明のタンパク質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックス（ここで、該マトリックスは造形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形である）が含まれる。持続放出マトリックスの例には以下のものが含まれる：ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許No.3,773,919)、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT™（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射可能マイクロスフェア）、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸。ポリマー、例えばエチレン-ビニルアセテート、および乳酸-グリコール酸は、100日間にわたり分子を放出することができ、ある種のヒドロゲル放出タンパク質の放出期間はさらに短い。本発明の封入タンパク質は、長期間にわたり体内に保持されると、37℃で湿気に暴露することにより変性または凝集し、生物活性の低下と免疫原性が変化する可能性が生じる。関与する機序に応じて安定化のための合理的戦略を立てることができる。例えば、凝集機序がチオジスルフィド交換による分子間S-S結合形成であるとわかれば、スルフィドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、湿度を調節し、適切な添加物を用い、特定のポリマーマトリックス組成物を生成することにより達成することができる。

【0261】

経口使用用の本発明の組成物は、無毒性の医薬的に許容される賦形剤と混合した活性成分を含む錠剤を含む。これら賦形剤は、例えば、不活性希釈剤または充填剤（例えばショ糖およびソルビトール）、滑沢剤、流動促進剤、および付着防止剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、水素添加植物油、またはタルク）でありうる。経口使用用の組成物は、チュアブル錠、または活性成分が不活性固体

10

20

30

40

50

希釈剤と混合している硬ゼラチンカプセル、または活性成分が水または油媒質と混合している軟ゼラチンカプセルとして提供することもできる。

【0262】

*in vivo*投与に用いる医薬組成物は典型的には無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜でろ過することにより達成することができる。該組成物を凍結乾燥する場合は、この方法を用いる滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後に行うことができる。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形または溶液で保存することができる。さらに、非経口組成物は、一般的には、無菌アクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針を突き通すことができる栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルに入れる。

【0263】

医薬組成物を製剤化したら、無菌バイアル中で溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として保存することができる。そのような製剤は、使用準備済み形、または投与前に再構成が必要な形（例えば凍結乾燥）で保存することができる。

【0264】

本明細書において該組成物は、治療する特定の適用に必要な2以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補作用を有するものも含みうる。そのような分子は、意図する目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。

【0265】

X. 投与

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンを含む医薬組成物は、本明細書に記載の病態を有するかまたはそのリスクがある対象に、経口的、非経口的、肺、経皮、筋肉内、鼻内、パッカル、舌下、または坐薬投与を含む標準的投与技術を用いて投与することができる。本発明の抗ミオスタチンアドネクチンの好ましい投与は非経口的である。用語非経口的には、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、膣、または腹腔内投与が含まれる。静脈内または腹腔内または皮下注射による末梢全身送達が好ましい。

【0266】

治療的有效用量は、投与により治療効果をもたらす用量を表す。治療的に用いる医薬組成物の有効量は、例えば治療背景および目的に依存するだろう。当業者は、治療に適した用量レベルは、一部、送達する分子、その結合剤分子を用いる適用、投与経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または臓器サイズ）および状態（年齢および一般健康状態）に応じて変化するだろう。

【0267】

例えば、治療的有效用量は、細胞培養アッセイまたは動物モデル、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、またはサルを用いて最初に評価することができる。動物モデルを用いて適切な濃度範囲および投与経路を決定することもできる。次に、そのような情報を用いてヒトにおける有用な用量および投与経路を決定することができる。正確な用量は、治療を要する対象に関連する因子に照らして決定され、標準的技術を用いて確定することができる。用量および投与は、活性化化合物の十分なレベルをもたらすかまたは目的とする効果を維持するように調整される。考慮される因子には、病状の重症度、対象の一般健康状態、対象の年齢、体重、および性別、および投与頻度、薬剤の組み合わせ、応答感度、および治療に対する反応が含まれる。一般的には、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、約0.01mg/kg～約50mg/kg/日、好ましくは0.01mg/kg～約30mg/kg/日、最も好ましくは0.01mg/kg～約20mg/kg/日で投与される。ある態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、約1～50mg、より好ましくは約10～50mgの週一回用量で投与される。他の態様において、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、30～200mg、好ましくは50～150mg、およびより好ましくは60～120mgの月一回用量で投与される。

【0268】

投与頻度は、用いる製剤中の結合剤分子の薬物動態学的パラメーターに依存するだろう。典型的には、該組成物は、目的とする効果を達成する用量に達するまで投与する。した

10

20

30

40

50

がって、該組成物は、単用量、または多用量（同一または異なる濃度/用量）で徐々に、または連続注入で投与することができる。適切な用量のさらなる改良は日常的になされる。適切な用量は、適切な用量 - 反応データを用いて確定することができる。例えば、抗ミオスタチンアドネクチンは、毎日（例えば、毎日1回、2回、3回、または4回）、またはおそれより低頻度（例えば、1日おきに1回または毎週または毎月1回）で投与することができる。さらに、当該分野で知られているように、年齢および体重、一般健康状態、性別、食事、投与時間、薬剤相互作用、および疾患の重症度の調整が必要であり、それは当業者が日常の実験により確定することができるだろう。該抗ミオスタチンアドネクチンは1回または一連の治療にわたり適切に投与される。

【0269】

治療的適用のための抗ミオスタチンアドネクチンまたはその融合物、および1またはそれ以上のさらなる治療薬の投与（同時投与または連続投与）は、上記のごとく行うことができる。同時投与用の適切な医薬的に許容される担体、希釈剤、および賦形剤は、投与する特定の治療薬の同一性に応じて当業者が理解しているだろう。

【0270】

XI. 検出方法および診断法

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、種々の診断的応用にも有用である。例えば、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンを用いてミオスタチンレベルの増加に伴う障害または疾患を診断することができる。同様に、抗ミオスタチンアドネクチンをアッセイに用いて、ミオスタチン関連病状を治療する対象のミオスタチンレベルをモニターすることができる。抗ミオスタチンアドネクチンは、修飾するか修飾せずに用いることができ、検出可能部分の共有または非共有結合により標識される。検出可能部分は、検出可能なシグナルを直接または間接的に生じることができるあらゆるものでありうる。例えば、検出可能部分は、放射性同位元素、例えばH3、C14または13、P32、S35、または1131；蛍光または化学発光化合物、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリン；または酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはホースラディッシュパーオキシダーゼでありうる。

【0271】

以下に記載の方法を含む検出可能部分にタンパク質を結合させるための当該分野で知られたあらゆる方法を用いることができる：Hunter, et al., Nature 144 : 945 (1962) ; David, et al., Biochemistry 13 : 1014 (1974) ; Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40 : 219 (1981) ; および Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30 : 407 (1982)。in vitro法には、当タンパク質と適合性の化学、例えば特定アミノ酸（例えばCysおよびLys）に対する化学を含む当該分野でよく知られた共役化学が含まれる。本発明のタンパク質とある部分（例えばPEG）を結合するために連結基または反応基を用いる。適切な連結基は当該分野でよく知られており、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光解離性基、ペプチダーゼ不安定基、およびエステラーゼ不安定基が含まれる。好ましい連結基は、適用に応じてジスルフィド基およびチオエーテル基である。Cysアミノ酸を含まないポリペプチドでは、Cysを、結合の位置をつくりながらタンパク質が活性である位置に存在するよう操作することができる。

【0272】

検出可能部分と結合した抗ミオスタチンアドネクチンはin vivo画像化にも有用である。該ポリペプチドを放射線不透過剤または放射性同位元素と結合し、対象（好ましくは血流中に）に投与し、次いで対象中の標識タンパク質の存在および位置を分析する。この画像化技術は、悪性腫瘍の病期診断と治療に有用である。該タンパク質は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で知られた他の検出手段により対象中で検出可能なあらゆる部分で標識することができる。

【0273】

抗ミオスタチンアドネクチンは、アフィニティ精製剤としても有用である。このプロセスでは、該ポリペプチドは、当該分野でよく知られた方法を用いて適切な支持体、例えば

10

20

30

40

50

Sephadex樹脂またはろ紙に固定される。抗ミオスタチンアドネクチンは、あらゆる既知アッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイに用いることができる(Zola、Monoclonal Antibodies : A Manual of Techniques、pp. 147-158 (CRC Press、Inc.、1987))。

【0274】

ある局面において、本開示は、試料中の標的分子の検出方法を提供する。ある方法は、本明細書に記載の抗ミオスタチンアドネクチンと試料を抗ミオスタチンアドネクチン-標的複合体形成を可能にする条件下で接触させ、次いで該複合体を検出することにより試料中の該標的を検出することを含みうる。検出は、あらゆる当該分野で認められた技術、例えば、ラジオグラフィ、免疫学的アッセイ、蛍光検出法、質量分析法、または表面プラズモン共鳴を用いて行うことができる。該試料はヒトもまたは他の哺乳動物由来でありうる。該抗ミオスタチンアドネクチンは、標識部分、例えば放射性部分、蛍光部分、発色部分、化学発光部分、またはハプテン部分で標識することができる。該抗ミオスタチンアドネクチンは固体支持体に固定することができる。

10

【0275】

XII. キットおよび製品

本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、予め決定した量の試薬と本発明の治療法または診断法に用いるための指示書の組み合わせのパッケージをキットで提供することができる。

例えば、本発明のある態様において、上記障害または病状を治療または予防するのに有用な物質を含む製品を提供する。該製品は容器とラベルを含む。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、および試験管が含まれる。該容器は、種々の物質、例えばガラスまたはプラスチックから形成することができる。該容器は、該障害または病状を予防または治療するのに有効な本発明の組成物を保持し、無菌アクセスポートを有しうる(例えば該容器は皮下注射針を突き通すことができる栓が付いた静脈内溶液バッグまたはバイアルでありうる。)。該組成物中の活性物質は本発明の抗ミオスタチンアドネクチンである。容器上または容器に付いたラベルは、該組成物が選択した病状を治療するのに用いられることを示す。該製品は、さらに医薬的に許容される緩衝液、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液、およびデキストロス溶液を含む第2溶液を含みうる。該製品は、さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用指示書を含む包装挿入物を含む、商業的および利用者の観点から望ましい他の物質を含むことができる。

20

30

【0276】

参考文献の組み込み

本明細書に記載のすべての文書および参考文献(特許文書およびウェブサイトを含む)は、本願にすべてまたは一部が記載されているのと同程度に参照して個々に本明細書に組込まれる。

【0277】

実施例

本発明を下記実施例により説明するが、該実施例は単に例示であって、本発明を限定するものではない。本発明はその具体的態様により詳細に説明されているが、本発明の精神と範囲から逸脱することなく本発明に種々の変更や修飾をなしうることは当業者に明らかである。

40

【実施例1】

【0278】

タンパク質生産

高生産性タンパク質生産(HTPP)

HIS6tagの上流のPET9dベクター内にクローニングし、E.coli BL21 DE3 pLysS 細胞内に形質転換した選択したバインダーを24ウェルフォーマット中の50 µg/mLカナマイシン含有5ml LB培地に接種し、37 °Cで一夜増殖させた。新鮮5ml LB培地(50 µg/mLカナマイシン)培養を、誘導発現のために一夜培養から200 µlを吸引し、それを適切なウェル中に分注す

50

ることにより調製した。該培養を37℃でA600 0.6~0.9まで増殖させた。1mM イソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)で誘導した後、培養を30℃で6時間発現させ、次いで2750 xg、4℃で10分間遠心分離して回収した。

【0279】

細胞ペレット(24ウェルフォーマット中)を、450μlの溶解緩衝液(50 mM NaH₂PO₄、0.5 M NaCl、1x Complete(登録商標)Protease Inhibitor Cocktail-EDTA不含(Roche)、1 mM PMSF、10 mM CHAPS、40 mMイミダゾール、1mg/mlリソゾーム、30 μg/mL DNase、2 μg/mLアプロトニン、pH 8.0)に再浮遊させて溶解し、室温で1~3時間振盪させた。溶解物を除去し、96ウェル、1.2mlキャッチプレートを取り付けた96ウェルWhatman GF/D Unifilterに移して96ウェルフォーマット中に再ラックし、陽圧でろ過した。除去した溶解物を、平衡緩衝液(50mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、40mMイミダゾール、pH8.0)で平衡化した96ウェル、ニッケルまたはコバルト-キレートプレートに移し、5分間インキュベーションした。非結合物質を陽圧で除去した。樹脂を0.3 ml/ウェルの洗浄緩衝液#1(50 mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、5 mM CHAPS、40mMイミダゾール、pH 8.0)で2回洗浄した。各洗浄液を陽圧で除去した。溶出前に、各ウェルを、50 μl溶出緩衝液(PBS+20mM EDTAで洗浄し、5分間インキュベーションし、この洗浄液を陽圧で除去した。各ウェルにさらに100 μlの溶出緩衝液を適用してタンパク質を溶出した。室温で30分間インキュベーションした後、該プレートを200xgで5分間遠心分離にかけ、溶出前に溶出キャッチプレートの底に加えた5 μlの0.5M MgCl₂を含む96ウェルキャッチプレートに溶出タンパク質を回収した。溶出タンパク質を、野生型¹⁰Fn3ドメインをタンパク質標準品として用いる総タンパク質アッセイで定

10

20

【0280】

不溶性フィブロネクチンベースの足場タンパク質バインダーの発現および精製

発現用に選択したクローン、次いでHIS6tagをpET9dベクターにクローニングし、E. coli BL21 DE3 plysS 細胞中で発現させた。20mlの接種培養(単一プレートコロニーから生じた)を用いて、1Lの、50 μg/mLカナマイシンおよび34 μg/mLクロラムフェニコール含有LB培地またはTB一夜発現培地(自己誘導)に接種した。LB培地中の培養を37℃でA600 0.6~1.0までインキュベーションし、その時点で、1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)で誘導し、30℃で4時間増殖させた。TB-一夜発現培地中で増殖した培養を37℃で5時間インキュベーションし、その時点で温度を18℃に下げ、19時間増殖させた。培養を、4℃、 $\geq 10,000xg$ で30分間遠心分離にかけて回収した。細胞ペレットを-80℃で凍結した。解凍後、細胞ペレットを、氷上のUltra-turraxホモゲナイザー(IKA works)を用いて25 mlの溶解緩衝液(20mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、1x Complete(登録商標)Protease Inhibitor Cocktail(プロテアーゼ・インヒビター・カクテル)-EDTA不含(Roche)、pH7.4)に再浮遊させた。細胞溶解は、モデルM-110S Microfluidizer(Microfluidics)を用いる高圧ホモゲナイゼーション($\geq 18,000$ psi)により行った。不溶性分画を、4℃、 $\geq 23,300xg$ で30分間遠心分離した。溶解物の遠心分離により回収した不溶性ペレットを20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl、pH7.4で洗浄した。ペレットを、20 mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl pH7.4中の6M塩酸グアニジンにソニケーションしながら再可溶化し、次いで37℃で1~2時間インキュベーションした。再可溶化したペレットを0.45 μmフィルターでろ過し、20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl/6MグアニジンpH7.4緩衝液で平衡化したHistrapカラムにロードした。ローディング後、カラムを、さらに25カラム容量の同じ緩衝液で洗浄した。結合タンパク質を、20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl/6Mグアニジン-HCl、pH7.4中の50mMイミダゾールで溶出した。精製したタンパク質を50mM酢酸ナトリウム/150mM NaCl、pH4.5またはPBS、pH7.2で透析して再フォールドした。

30

40

【0281】

可溶性フィブロネクチンベースの足場タンパク質バインダーの発現および精製

不溶性バインダーの代替精製法として、可溶性バインダーの精製法も用いることができる。発現のために選択したクローン、次いでHIS6tagをpET9dベクターにクローニングし、E. coli BL21 DE3 plysS細胞中で発現させた。20mlの接種培養(単一プレートコロニーか

50

ら生じた)を用いて、1Lの、50 µg/mLカナマイシンおよび34 µg/mLクロラムフェニコール含有LB培地またはTB一夜発現培地(自己誘導)に接種した。LB培地中の培養を37 °CでA600 0.6~1.0までインキュベーションし、次いで、1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)で誘導し、30 °Cで4時間増殖させた。TB一夜発現培地中で増殖した培養を37 °Cで5時間インキュベーションし、次いで温度を18 °Cに下げ、19時間増殖させた。培養を、4 °C、 $>10,000\times g$ で30分間遠心分離にかけて回収した。細胞ペレットを-80 °Cで凍結した。解凍した細胞ペレットを、氷上のUltra-turraxホモゲナイザー(IKA works)を用いて25mlの溶解緩衝液(20mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、1x Complete(登録商標)Protease Inhibitor Cocktail-EDTA不含(Roche)、pH7.4)に再浮遊させた。細胞溶解は、モデルM-110S Microfluidizer(Microfluidics)を用いる高圧ホモゲナイゼーション($>18,000\text{psi}$)により行った。可溶性分画を、4 °C、 $>23,300\times g$ で30分間遠心分離した。上清を0.45 µmフィルターを用いて浄化した。浄化した溶解物を20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl、pH7.4で予め平衡化したHisrapカラム(GE)上にロードする。次に、カラムを25カラム容量の同じ緩衝液、次いで20カラム容量の20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl/25mMイミダゾール、pH 7.4、次いで35カラム容量の20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl/40mMイミダゾール、pH 7.4で洗浄した。タンパク質を15カラム容量の20mMリン酸ナトリウム/500mM NaCl/500mMイミダゾール、pH7.4で溶出し、A280の吸光度に基づく分画をプールし、次いで、1x PBSまたは50mM Tris、150mM NaCl、pH8.5または50mM NaOAc、150mM NaCl、pH4.5で透析した。沈殿物を0.22 µmフィルターでろ過して除去した。

10

20

30

40

50

【0282】

ポリエチレングリコール(PEG)によるアドネクチンの部位特異的PEG化

操作したシステイン残基を含むアドネクチンを、システイン上のチオール基とPEGまたはn-エチルマレイミド(NEM)のマレイミド官能基の間のマイケル付加化学によりPEGまたはシステインブロッキング試薬と結合した。2分枝40kDa PEG (NOF Corporation、P/N GL2-400MA)でPEG化するために、モル過剰のPEGを弱酸性~中性条件下でタンパク質溶液に加えた。室温で2時間~一夜反応を続けさせた。次に、反応物をイオン交換カラムに適用し、PEG化アドネクチンを非反応PEG-マレイミドおよび非PEG化アドネクチンから分離した。4分枝40kDa PEG (NOF、P/N GL4-400MA)または20kDaビス-PEG (NOF Corporation、P/N DE-200MA)でPEG化するためにアドネクチンをクエン酸緩衝液pH6.5中のSP FFから分離した。DTTで還元した後、試料をG25カラムで脱塩してDTTを除去すると同じ緩衝液に交換し、20kDaビス-PEGまたは4分枝40K PEGと比2:1(PEG:アドネクチン)室温で2時間反応させ、次いで、過剰のBMEを加えて反応を止めた。非PEG化種(および20kDaビス-PEG反応の場合はモノPEG化種)を選択的に除去するために試料をResource 15Sカラム(GE # 17-0944-10)で精製した。最終プレパラティブSECカラム(GE # 17-1071-01、Superdex200、26/60)を用いて(必要ならば)、高分子種および非反応アドネクチンを除去した。CYSブロックしたアドネクチンを作製するため、10倍モル過剰のNEM(Pierce Chemical)をクエン酸(pH6.5)緩衝液で上記G25脱塩工程直後に加えた。これを室温で1時間インキュベーションし、過剰のBMEを加えて反応を止めた。次に、試料をPBSで十分に透析した。精製したコンジュゲートしたアドネクチンをSDS-PAGEおよびサイズ排除クロマトグラフィで分析した。

【0283】

非標識フィブロネクチンベースの足場タンパク質バインダーの精製およびPEG化

選択したバインダーをHis6タグのないpET9dベクターにクローンし、E. coli BL21 DE3 pLysS 細胞中で発現させた。単一プレートコロニーから先に単離した接種物培養25mlを125mlフラスコ中、pH6.85培地+50ug/mlカナマイシン(塩化アンモニウム、クエン酸、クエン酸第二鉄アンモニウム、硫酸マグネシウム、第一リン酸ナトリウム一水和物、無水ブドウ糖、グリセロール、フィトンペプトン、粒状酵母エキス、硫酸カナマイシン、硫酸アンモニウム(pH修正用))を用いてOD600nmで1~2に達するまで増殖させた。10L発酵槽(出発容量7.5Lのバッチ培地)に最終OD600nm 0.003で接種した。培養を25 °Cで一夜、溶存O₂レベル>30%、650rpmで一定に混合しながら増殖させ、pHを維持しながら増殖させた。翌日、温度を37 °Cに変え、培養をOD600nmで20~25に達するまで増殖させた。目標ODに達したら、

温度を30℃に変え、培養をIPTG(最終濃度:1mM)で誘導した。フィード培地(グリセロール、フィトンペプトン、粒状酵母エキス、硫酸カナマイシン、およびpH調整用リン酸)を培地40ml/L容積/hrの速度で加えた。細胞を10,000gで4℃、30分間遠心分離して回収した。細胞ペレットを-80℃で凍結した。

【0284】

細胞ペーストを1xPBSで緩衝液10ml/g細胞ペーストの比で解凍した。解凍したら、試料を均質になるまでUltraTurraxホモゲナイザー(IKA works)で破壊した。次に、溶液をマイクロフルイダイザー(18,000psi)に2回通した。可溶性分画を $\geq 10,000g$ で4℃、30分間遠心分離して分離した。上清を酢酸ナトリウム(pH 4.5)で1:1に希釈し、0.2 μ mフィルターで浄化した。浄化した溶解物を、50mM酢酸ナトリウム(pH4.5)で予め平衡化したSP FFカラム(SP1; GE)にロードした。次に、カラムを2カラム容量の同じ緩衝液、次いで8カラム容量の50mM酢酸ナトリウム/350mM NaCl、pH4.5で洗浄した。タンパク質を、50mM酢酸ナトリウム/700mM NaCl、pH4.5で溶出した。溶出液を吸光度 A_{280} に基づいてプールのした。

【0285】

SP1溶出液を、20mMリン酸ナトリウム(pH 6.7)で1:5に希釈し、次いで20mMリン酸ナトリウム/100mM NaCl、pH 6.7で予め平衡化したSP FFカラム(SP2)にロードした。次に、カラムを2カラム容量の同じ緩衝液で洗浄した。タンパク質を20mMリン酸ナトリウム/0.5 M NaCl、pH 6.7でカラムから溶出した。溶出液を吸光度 A_{280} に基づいてプールのした。

【0286】

SP2溶出液を20mMリン酸ナトリウム/100mM NaCl(pH6.7)で希釈し、20mMリン酸ナトリウム/100mM NaCl、pH6.7で予め平衡化したQ FFカラム(GE)にロードした。FTピーク(生成物を含む)を回収した。カラムをFTピークがベースラインに戻るまで平衡緩衝液で洗浄した。

【0287】

操作システイン残基を含むアドネクチンをシステイン上のチオール基とPEG試薬のマレイミド官能基の間のマイケル付加化学によりPEGと結合させた。Q FT分画を、PEG/タンパク質のモル比2:1で40kDa分枝PEGでPEG化した。試料を室温で一夜インキュベーションした。PEG化反応物を2部50mM酢酸ナトリウム(pH4.5)で希釈し、50mM酢酸ナトリウム(pH 4.5)で予め平衡化したSP FFカラム(GE)にロードした。カラムを2カラム容量の同じ緩衝液で洗浄した。PEG化タンパク質をカラムから50 mM酢酸ナトリウム/200 mM NaCl、pH 4.5で溶出した。溶出液を吸光度 A_{280} に基づいてプールのした。PEG化タンパク質を30kDa Millipore Biomax膜を用いて濃縮した。試料を0.22 μ mフィルターでろ過し、例えば、4℃、-20℃、または-80℃で保存した。

【0288】

Fcフォーマットフィブロネクチンベースの足場タンパク質バインダーの一過性発現および精製

DNAを製造するために選択した候補をpDV-16プラスミドにクローニングし、E. coli Top 10細胞を形質転換した。pDV-16は、ヒトIgG1~Fcをコードする配列をシグナル配列の後に導入し、Fcのいずれかの末端にアドネクチンをコードする配列を挿入することができるように制限部位を含む、pTT5(Yves Durocher、NRC Canada)の修飾形である。形質転換細胞を、100 μ g/mlアンピシリン含有Luriaプロス1Lに接種し、回転インキュベーター中、225rpmで37℃18時間インキュベーションして拡大増殖させた。細菌ペレットを $> 10000g$ で430分間遠心分離して回収した。精製プラスミドDNAを、QIAGEN Plasmid Plus Mega Kit(QIAGEN)を用い、製造業者のプロトコールに記載のごとく単離した。精製DNAを吸光度260nmで定量し、使用するまで-80℃で保存した。

【0289】

HEK 293-EBNA1(クローン 6E)(Yves Durocher、NRC Canada)細胞を10L GE Healthcare Waveバッグ中の2LのF17培地で 2×10^6 細胞/mlに拡大増殖させ、37℃、5%CO₂で角度8度、18rpmで揺らして混合した。

【0290】

10

20

30

40

50

DNAを以下のごとくトランスフェクション用に調製した。F17培地を37℃に温めた。DNAおよびPEIトランスフェクション試薬を無菌バイオセイフティフード中で解凍した。DNA(2.25mg)を無菌ポリプロピレン培養フラスコ中の100mLの温めたF17培地に加え、静かに渦巻き混合した。別のフラスコで6.75mgのPEI(1mg/ml)を100mlの予め温めたF17培地と混合し、静かに渦巻き混合した。フラスコを5分間休ませ、次いで内容物をPEI溶液を該DNAを含むフラスコに加え、静かに渦巻き混合した。

【0291】

DNA：PEI混合物を含むフラスコの内容物を、バイオセイフティフード中で室温で15分間インキュベーションした後にHEK 293-6E細胞を含むウエーブバッグに加えた。トランスフェクションしたHEK 293-6E細胞を含むバッグを37℃、5%CO₂で24時間インキュベーションし、角度8度、18rpmで揺らして混合した。24時間後、100mlの無菌ろ過したF17培地に溶解した20%トリプトンN1 (Organotechnie、Canada)を該培養に無菌的に加えた。該細胞および培地を上記のごとく72時間インキュベーションした後に回収した。あるいはまた、振盪フラスコ(2Lフラスコ中0.5L培地)中の一過性HEK発現はDNA：PEI比1：2で行うことができる。細胞を、6000gで4～30分間遠心分離して順化培地から分離した。順化培地を保持し、0.2μMフィルターでろ過し、4℃に保存した。

10

【0292】

順化培地を、PBSで予め平衡化したGE MabSelect Sure樹脂を含む10mlクロマトグラフィカラムに5ml/分の速度で適用した。ろ過した順化培地をロードし、次いでカラムを少なくとも100mlのPBSで室温で洗浄した。精製した生成物を100mMグリシン/100mM NaCl、pH3.0を適用してカラムから溶出した。分画を、1/6容量の1MトリスpH8を含むチューブに回収するか、または吸光度A280でプールし、次いで1MトリスpH8を加えて100 mMとすることにより中和した。高分子量種の含有量がプロテインA溶出後に5%以上である場合は、試料をさらにPBSを用いSuperdex 200 (26/60)カラム(GE Healthcare)により精製する。モノマー含有SEC分画をプールし、濃縮した。得られたプロテインAまたはSECプールを、4℃でPBSで徹底的に透析し、0.22μmカットオフフィルターで無菌ろ過し、次いで-80℃で凍結した。

20

【0293】

バルク製造：哺乳動物発現および一次回収：UCOE CHO系

哺乳動物Research Cell Bank (RCB)を、Ubiquitous Chromatin Opening Element (ユビキタスクロマチンオープニングエレメント) (UCOE)を含むpUCOEベクター[修飾UCOEベクター (Millipore)]中にクローニングした抗ミオスタチンアドネクチン-Fc融合物でトランスフェクションすることにより作製した。RCBを、12.5μg/mLプロマイシン含有選択培地 (CD CHO培地 (Invitrogen)中0.04% (v/v) L-グルタミン (Invitrogen)および0.01% (v/v) HTサプリメント (Invitrogen)) 中で細胞を拡大培養することにより樹立した。低継代数の細胞を遠心分離して無菌的に単離し、パンキング培地(CD CHO培地 (Invitrogen)中0.04% (v/v) L-グルタミン (Invitrogen)、0.01% (v/v) HTサプリメント (Invitrogen)および7.5% (v/v) DMSO)に最終濃度1 x 10⁷ 細胞/mLに再浮遊した。該細胞を70%イソプロピルアルコール浴中-80℃で一夜最初に凍結させ、次いで翌日長期保存のため液体窒素に移した。

30

【0294】

単一RCBバイアルを12.5μg/mLプロマイシン含有選択培地25mLで解凍し、培養を同じ培地で拡大培養することにより細胞培養を開始した。細胞が1~2 x 10⁶ 細胞/mLの濃度に達したら、0.2 x 10⁶ 細胞/mLに分割した。一般的に、細胞を2~4週間維持し、次いでバイオリアクターに播種した。拡大培養を最終的に継代し、8Lの製造培地(0.01% (v/v) HTサプリメント (Invitrogen)、0.04% (v/v) Glutamax (Gibco)、および0.005% (v/v) Pluronic F-68 (Gibco)を含むInvitrogen CD CHO培地)を含む15Lバイオリアクターに最終濁度0.2 x 10⁶ 細胞/mLで播種するまで増殖させる。バイオリアクター培養の、VCD (生細胞濁度)、生存パーセント、pH、およびグルコース濃度を毎日モニターした。バイオリアクター培養に第3および6日に総量10%のフィード培地をポラス添加した。培養を生存パーセントが>70%の第7~9日に回収した。培養中、バイオリアクター培養をpH7.1、温度37℃、%D

40

50

O₂ 40%、および一定RPM100に調節した。回収日に、バイオリアクター培養を直接6.0/3.0 μm深フィルターに通し、次いで無菌バックに無菌0.8/0.2 μmろ過した。浄化無菌培養を2~8 で一夜保存した。次に、浄化培養を30,000kDa膜を用いるフラットシートTFFで濃縮した。濃度は回収濃度に応じて約6xであった。次に、濃縮上清をPETGボトルに無菌ろ過し、直接処理するかまたは-80 に保存した。

【0295】

抗ミオスタチン-アドネクチン-Fc融合物の精製

回収した培養上清（原液または濃縮）をPBSで予め平衡化したMabSelectプロテインAカラムにロードする。カラムを5CVの50mM Tris pH8.0、1M尿素、10%PGで洗浄する。アドネクチン-Fc融合物を100mMグリシンpH3.3で溶出し、1CVの200mM酢酸ナトリウムpH4.5を予め充填した容器にピークを回収する。ピーク溶出は、吸光度A280に基づく。

【0296】

プロテインA溶出液を、2Mクエン酸を加えてpH3.0に希釈し、室温で1時間放置してウイルスを不活化する。次に、試料を200mM第3リン酸ナトリウムでpH4.5に達するまで希釈する。必要であれば、該溶液をさらに水で希釈して電導度を10ms/c以下に下げる。

【0297】

希釈したプロテインA溶出液を、負の捕捉モードで、50mM酢酸ナトリウムpH4.5で予め調整したTosoh Q 600C AR (Tosoh Bioscience)に通す。フロースルーピークを吸光度A280に基づいて回収する。カラムを50mM酢酸ナトリウムで洗浄し、および0.2N NaOHで除去する。

【0298】

Q 600C ARフロースルーを、残存物を非常に静かに混合しながら、30K NMWCO中空繊維膜(GE)を用いる接線流ろ過を用いて得る。アドネクチン-Fc融合物を、25mMリン酸ナトリウム 150mMトレハロースpH7.0の6透析容量（ディアボリュウム）で透析ろ過し、次いで標的タンパク質濃度に濃縮する。

【実施例2】

【0299】

抗ミオスタチンタンパク質の生物物理学的評価

サイズ排除クロマトグラフィ：標準的サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)を中規模法から得られる候補アドネクチンについて実施した。中規模物質のSECを、Superdex 200 10/30またはSuperdex 75 10/30カラム(GE Healthcare)、およびAgilent 1100または1200 HPLCシステムを用い、A214 nmおよびA280 nmのUV検出法および蛍光検出法(励起280 nm、放射350 nm)を用いて行った。100 mM硫酸ナトリウム/100 mMリン酸ナトリウム/150 mM塩化ナトリウム緩衝液pH 6.8を用いるSECカラムに適した流速で用いた。ゲルろ過標準品(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を分子量較正に用いた。中規模精製アドネクチンのSECの結果は、表9および10に示すように球状ゲルろ過標準品(BioRad)に対して近似範囲10kDaで溶出される主としてモノマーアドネクチンであることを示した。

【0300】

熱安定性：HTPPアドネクチンの熱スキャンニング蛍光(TSF)分析にてその相対熱安定性をスクリーニングした。試料をPBS中0.2mg/mlに標準化した。1 μlのPBSで1:40希釈したシプロオレンジ色素を25 μlの各試料に加え、プレートを透明の96ウェルマイクロプレート粘着シールで密封した。試料を、速度2度/分の温度25 ~95 の勾配のあるBioRad RT-PCR機を用いてスキャンした。データは、BioRad CFXマネージャー2.0ソフトウェアを用いて分析した。TSFで得られた値は、40 ~70 の融解範囲でDSFにより得られたTm値と良い相関を示した。これはこの技術の許容される実用範囲と考えられる。繊維曲線の勾配が小さ過ぎてその誘導ピーク(経時的な蛍光の変化速度)をノイズと区別できない場合は、ND(「データなし」)の結果となる。「ND」の結果は、熱安定性を示すと解釈することはできない。透析HTPP 'dおよび中規模アドネクチンの示差走査熱量測定法(DSC)分析を行ってその各Tmを測定した。0.5mg/ml溶液を、VP-キャピラリー示差走査熱量測定機(GE Microcal)を用い、70p.s.iの圧下、1度/分の速度で15 ~110 の温度で傾斜させることによりスキ

10

20

30

40

50

ヤンした。データを、Origin Software (オリジンソフトウェア) (OriginLab Corp)を用いるベストフィットを用い、適切な緩衝液のコントロールランに対して分析した。TSFおよびDSC分析の結果を表8~10にまとめる。表8~10に示すように、多くのクローンはアンフォールディング温度が60 以上であり、医薬製剤に適した生物物理学的安定性の高い構造を示した。アドネクチンは、一般的には、明らかな安定性の低下がなくPEG化またはFc-フォーマットに耐性であった。ある場合には、これらフォーマットは安定性の改善をもたらした。例えば、非修飾アドネクチンの3116_A07はTSFによるTmが60 であるが、PEG化すると(ATI-1377)DSCによるTmが68 であり、Fc-Xフォーマット (PRD-1286)ではDSCによるTmが66 であった。

【実施例3】

【0301】

細胞ベースのルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼレポータープラスミドのアクチビン反応性エレメント (ARE)-lucは、ホタルルシフェラーゼレポーターにタンデムでAREの9リピートを結合することにより作製した。該プラスミドをHepG2細胞に一時的にトランスフェクションした。プラスミドpGL4.74 [hRluc/TK]を、トランスフェクション効率を標準化するために同時トランスフェクションした。10,000細胞/ウェルを96ウェルプレートに播いた。タンパク質、例えば、ミオスタチン、アクチビン、またはBMP-11を細胞に加え、それらがその同種レセプターと結合すると、下流SMADシグナル伝達が生じ、リン酸化SMAD複合体のAREに対する結合が生じる。該細胞に暴露するミオスタチンなどの量は、産生されるルシフェラーゼタンパク質の量、したがって測定されるルシフェラーゼ活性と直接比例する。ミオスタチンアンタゴニスト(例えば、抗ミオスタチンアドネクチン)をミオスタチンとともに細胞に加えると、ARE活性は低下し、ルシフェラーゼの産生と活性の低下が生じる。

【0302】

この実験において、(1) 抗ミオスタチンアドネクチンおよびミオスタチン、(2) 抗ミオスタチンアドネクチンおよびアクチビンA、または(3) 抗ミオスタチンアドネクチンおよびBMP-11を細胞に加える前にプレインキュベーションした。ミオスタチン (R&D Systems) を10~500pMで、アクチビンA (R&D Systems) を10~500pMで、BMP-11 (R&D Systems) を10~500pMで用いた。これら種々の組み合わせで一晩インキュベーションした後、細胞を溶解し、Dual-Glo Luciferase Assay System (登録商標) (EnVision)を用いてルシフェラーゼ活性(発光)を測定した。IC50を、ミオスタチン誘導ARE-ルシフェラーゼ活性の50%阻害に達するのに必要なアドネクチンの濃度と定義する。

【0303】

表8~10に示すように、抗ミオスタチンアドネクチンはARE-lucレポーター活性のミオスタチン介在性増加を阻害した。

【実施例4】

【0304】

HTRF結合アッセイ

HTRFアッセイを用いて抗ミオスタチンアドネクチンのミオスタチンに対する結合親和性を測定した。該アッセイは、Eu-W1024標識をドナー発光体にAlexa Fluor (登録商標) 647をアクセプター発光体に用いる競合HTRFアッセイであった。ピオチン化アドネクチン 1889E01およびAlexa Fluor (登録商標) 647標識 rhActRIIb-Fcは、ミオスタチンと2つの異なる結合部位で同時に結合することができる。Eu-W1024標識ストレプトアビジンをピオチン化1889E01との結合に用いた。2つの発光体Eu-W1024およびAlexa Fluor (登録商標) 647を1889E01/ミオスタチン/ActRIIb-Fc複合体の形成によりまとめ、HTRFシグナルを、HTRFプロトコルを用いてEnVisionプレートリーダー (Perkin Elmer)で測定することができる。競合的アドネクチンの存在下でHTRFシグナルは低下する。IC50を表8~10に示す。

【0305】

表8: 抗ミオスタチンモノ-アドネクチンの生物物理学的特性、AREルシフェラーゼレポーターアッセイ、およびHTRF結合アッセイの結果

10

20

30

40

50

【表 4 6】

ID	T _m - TSF	T _m -DSC	ARE-ルシフェラーゼアッセイ			HTRF
			Myo IC50 (nM)	BMP-11 IC50 (nM)	Activin A I C50 (nM)	Myo IC50 (nM)
1979_B06		48	0.11	3.3	194	ND
2062_G02		48	205	1500	>1500	ND
2522_C09	40		0.06	1.6	1000	ND
2523_G06	49	49	4.2	46	>2000	ND
2524_C11	ND	55	0.1	0.89	765	ND
2524_D09	54	49	0.06	0.55	84	ND
2524_E10	ND		0.09	5.6	>1000	ND
2524_H05	40		0.09	7.3	>1000	ND
2524_H11	49		0.03	6.2	>1000	ND
2525_B01	ND		0.11	3.2	73	ND
2525_D02	58	55	0.05	1.1	345	ND
2525_D05	ND	69	0.11	3.9	>1000	ND
2525_F07	46		0.13	3.4	>1000	ND
2987_A06		50	0.10	23	283	ND
2987_B04		48	0.12	3.3	239	ND
2987_B09		52	0.01	0.92	172	ND
2987_C02		50	0.06	7.1	464	ND
2987_D05		49	0.11	2.4	2000	ND
2987_E03		51	0.10	2.3	224	ND
2987_E08		52	0.05	2.8	352	ND
2987_F01		49	0.05	6.5	594	ND
2987_F06		52	0.08	20	538	ND
2987_G04		49	0.09	3.3	171	ND
2987_G09		54	0.05	0.91	>2000	ND
2987_H02		51	0.05	11	794	ND
2987_H07		57	0.02	5.5	>400	ND
3006_A10	62		0.08	2.0	>2000	0.15
3007_B08	57		0.06	0.23	423	0.14
3007_C09	63		0.04	0.89	417	0.14
3007_C10	66		0.03	1.0	>2000	0.14
3008_A03	59		0.11	22.6	>2000	0.22
3008_B08	57		0.35	9.3	254	0.37
3008_D04	56		0.09	1.2	720	0.14
3008_F01	63		0.08	0.12	>2000	0.21
3008_G01	57		0.03	0.31	>2000	0.11
3008_G03	58		0.09	1.3	>2000	0.13
3115_D04	64		0.16	3.6	>1000	0.20
3115_E06	62		0.07	2.0	>1000	0.14

10

20

30

40

【表 4 7】

3116_A06	64		0.14	13	>1000	0.15
3116_A07	60		0.04	0.5	>1000	0.11
3116_C01	60		0.10	6.7	1000	0.35
3116_C06	61		0.14	8.9	>1000	0.18
3116_H06	60		0.10	1.6	>1000	0.13
3146_A08	69		0.70	48	>1000	0.26
ATI-1267		60	0.06	0.50	644	0.12
ATI-1275		53	0.03	0.14	19	0.19
ATI-1277		転移なし	0.14	1.18	2000	0.38
ATI-1340		54	0.05	4.87	324	0.16

10

【0306】

表9：PEG化抗ミオスタチンアドネクチンの生物物理学的特性、AREルシフェラーゼレポーターアッセイ、およびHTRF結合アッセイの結果

【表 4 8】

ID	T _m - T SF	T _m -DSC	% モノ マー (SE C)	ARE-ルシフェラーゼアッセイ			HTRF
				Myo IC5 0 (nM)	BMP-11 IC 50 (nm)	アクチビン A IC50 (nM)	Myo IC5 0 (nM)
ATI-1106				177	1414	>2000	
ATI-1107		63	98	19	888	>2000	ND
ATI-1266		60	97.8	0.12	0.89	2000	0.21
ATI-1276		56	94.6	0.08	0.15	110	0.28
ATI-1278		46	93.7	0.27	1.1	>2000	0.54
ATI-1338		59		0.28	5.8	>1000	0.24
ATI-1339		61		0.28	6.0	>1000	0.28
ATI-1341		53		0.03	0.14	14	0.13
ATI-1359		57	96.5	0.26	3.1	>1000	0.36
ATI-1375		67	>99	0.17	1.6	>1000	0.76
ATI-1376		70	>99	0.03	0.83	>1000	0.32
ATI-1377		68	>99	0.05	0.78	>1000	0.15
ATI-1378		74	>99	0.29	5.4	>1000	1.29
ATI-1379		69	>99	0.10	4.3	>1000	0.28

20

30

【0307】

表10：Fc融合抗ミオスタチンアドネクチンの生物物理学的特性、AREルシフェラーゼレポーターアッセイ、およびHTRF結合アッセイの結果

【表 4 9】

ID	T _m - T SF	T _m -DSC	%モノマ ー(SEC)	ARE-ルシフェラーゼアッセイ			HTRF
				Myo IC ₅₀ (nM)	BMP-11 IC ₅₀ (nm)	アクチビン A IC ₅₀ (nM)	Myo IC ₅₀ (nM)
PRD-932				0.24	ND	ND	ND
PRD-1171				0.08	0.20	19	0.14
PRD-1173				0.02	0.10	6	0.12
PRD-1174		T _{m1} 61 T _{m2} 67 T _{m3} 83		0.04	0.10	4	0.09

【表 5 0】

PRD-1175				0.10	0.28	19	0.15
PRD-1177				0.16	0.28	21	0.64
PRD-1178		Tm1 60 Tm2 69 Tm3 84		0.08	0.25	16	0.27
PRD-1180		Tm1 68 Tm2 83		0.07	0.11	14	0.13
PRD-1284				0.02	0.04	44	0.62
PRD-1285		Tm1 67 Tm2 68 Tm3 80	97	0.05	0.03	216	0.49
PRD-1286		Tm1 66 Tm2 68 Tm3 81	99	0.10	0.11	94	0.73
PRD-1287				0.30	0.80	>1000	2.70
PRD-1288		Tm1 65 Tm2 69 Tm3 81	93	0.08	0.10	>1000	0.47
PRD-1301				0.06	0.06	15	0.07
PRD-1302				0.03	0.02	14	0.12
PRD-1303				0.02	0.03	314	0.11
PRD-1304				0.05	0.07	45	0.24
PRD-1305				0.06	0.07	113	0.10
PRD-1471		Tm1 62 Tm2 68 Tm3 81	99	0.16	0.16	60	0.47
PRD-1472		Tm1 62 Tm2 69 Tm3 80	100	0.07	0.05	1000	0.41
PRD-1473		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0.07	0.06	125	0.73
PRD-1474		Tm1 63 Tm2 69 Tm3 81	100	0.08	0.09	>1000	0.45

10

20

30

【実施例 5】

【0308】

ミオスタチン誘導SMAD2リン酸化の抗ミオスタチンアドネクチン介在性阻害

ヒト横紋筋肉腫RH41細胞 (DSMZ, Braunschweig, Germany)を以下のごとく12-、2-、および4-点阻害反応分析に用いた。細胞を培養液から除去し、洗浄して血清を除去し、BSAを含むアッセイ培地中で4時間静止させた。細胞をヴェルセンを用いてフラスコから除去し、 5×10^5 細胞/ウェルを96ウェル、V底ポリプロピレンプレートに移した。12-点阻害反応では、アドネクチン1000 nMで出発する5倍希釈濃度範囲のアドネクチン(すなわち、1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM、0.0128nM、0.00256nM、0.000512nM、0.000102nM、.0000204 nM)で1時間プレインキュベーションした100pM組換えミオスタチン(R & D Systems)を細胞に加えた。4-点阻害反応では、一定濃度範囲のアドネクチン (30nM、3 nM、0.1nMまたは0.001nM)と1時間プレインキュベーションした100 pMのミオスタチンを細胞に加えた。2-点阻害反応では、一定濃度範囲のアドネクチン (10nMまたは0.5nM)と1時

40

50

間ブレインキューベーションした100pMのミオスタチンを細胞に加えた。細胞を、ミオスタチン-アドネクチン混合物で37℃、1時間処理し、SMAD2リン酸化を誘導した(pSmad2)。細胞を氷上に置き、氷冷PBSを加えて刺激を止めた。細胞をペレットとし、標準的プロトコールに従って溶解し、ELISAアッセイ(Cell Signaling Technologies)を用いてSMAD2リン酸化を検出した。該濃度範囲のアドネクチンにより達成された阻害をGraphPad Prism Software (グラフパッドプリズムソフトウェア)を用いて100%および0%阻害をもたらすコントロールに対してデータ点を標準化した。IC50を、ミオスタチン誘導SMAD2リン酸化の50%阻害に達するのに必要なアドネクチンの濃度で定義する。表11に示すデータは、親クローン1979_B06および2062_G02の親和性最適化から得られたアドネクチンが共にミオスタチン誘導pSMADリン酸化を強く完全に阻害し、0.78nM~0.06nMの範囲のIC50値を示したことを示す。これは、IC50値が親クローン1979_B06 (IC50 = 12.8 nM)および2062_G02 (IC50 = 59.1 nM)より16~75倍以上改善したことを示す。

10

【0309】

表11. 抗ミオスタチンアドネクチンによるSMAD2リン酸化 (pSMAD2)の阻害

【表51】

pSmad2 アッセイ			
ID	Myo IC50 (nM) 12-点	Myo IC50 (nM) 4-点	10nMのMyo%阻害
1979_B06 (aka ATI-1133)	12.8±2.4		
2062_G02 (aka ATI-1134)	59.1±16.2		
2522_C09	0.13		
2523_G06	0.78		
2524_C11	0.14		
2524_D09	0.11		
2524_E10	0.13		
2524_H05	0.13		
2524_H11	0.11		
2525_B01	0.14		
2525_D02	0.36		
2525_D05	0.20		
2525_F07	0.27		
3006_A10			51
3007_B08			97
3007_C09			80
3007_C10			76
3008_A03			87
3008_B08			90
3008_D04			92
3008_F01			86
3008_G01			98
3008_G03			91
3115_D04		0.06	
3115_E06		0.06	

20

30

40

50

【表 5 2】

3116_A06		0.27	
3116_A07		0.06	
3116_C01		0.26	
3116_C06		0.73	
3116_H06		0.06	
3146_A08		0.78	

【実施例 6】

【0310】

10

SPRフォーマットAを用いる抗ミオスタチンアドネクチンアドネクチン結合動態のSPR親和性測定

抗ヒトFc抗体(Biacore/GE)をBiacoreCM5チップ上に使用説明書に従ってNHS/EDCカップリングにより固定した。ActRIIb-Fc (R&D Systems)を基準細胞および活性フロー細胞上に捕捉し、次いでヒトミオスタチン(R&D Systems)、ヒトBMP-11(GDF-11; R&D Systems)、またはヒトアクチビンA (R&D Systems)を活性フロー細胞のみ上に捕捉した(それぞれ、製造者の示すプロトコールに従って可溶化し、HBSPランニング緩衝液で希釈した)。一定濃度範囲の抗ミオスタチンアドネクチンをHBSPランニング緩衝液中のすべてのフロー細胞にわたり適用した。サイクル間のチップ表面の再生は、3M MgCl₂の2回の30秒間パルスにより達成された。基準差引センサーグラムの動力的トレースをBiaevaluation (ピアエバリュエーション)ソフトウェアを用いる1:1結合モデルに適合させた。Biacorekinetic (ピアコアカイネティック)データのまとめを表12に示す。表12に示すデータは、最適化子孫アドネクチンが、親アドネクチン1979_B06および2062_G02 (それぞれK_D 29および49nMを示す)に比べて0.06~1.47nMの範囲のK_Dで強くミオスタチンと結合することを示す。

20

【0311】

PEG化すると、ミオスタチン親和性はいくらか低下する(K_Dが0.76nMから14.4nMに)が、ARE-ルシフェラーゼアッセイにおける効力に対するPEG化の影響はみられない(表8および9参照)。

BMP-11に対するアドネクチンの選択性は、完全に非選択性~最大17倍の範囲であるが、アクチビンに対する結合は、極めて弱いかまたは存在せず、アクチビンに対する高い選択性を示唆する。

30

【0312】

SPRフォーマットB(Fcフォーマット化アドネクチンに有用)を用いるアドネクチン結合動態

ヒトミオスタチン(R&D Systems)、ヒトBMP-11 (GDF-11; R&D Systems)、またはヒトアクチビンA(R&D Systems)を、製造者が示すプロトコールに従って可溶化し、標準的NHS/EDCカップリングを用い、酢酸(pH4.0または4.5)緩衝液中1~10 μg/mLでBiacoreCM5チップに固定した。一定濃度範囲の抗ミオスタチンアドネクチンをHBSPランニング緩衝液に適用した。サイクル間のチップ表面の再生は、10~50mM NaOHを60秒間用いて達成した。基準差引センサーグラムの動力的トレースをBiaevaluationソフトウェアを用いる1:1結合モデルに適合させた。Fcフォーマット化アドネクチンでは、相互作用動態は、低固定密度でも二価Fcおよびダイマーミオスタチンの結合力により決定される。Biacorekineticデータのまとめを表12に示す。表12に示すデータは、あるアドネクチンはこのSPRフォーマットで、ミオスタチンおよびBMP-11、およびアクチビンとも同じ親和性で結合することを示す。しかしながら、ARE-ルシフェラーゼアッセイにおけるアクチビンに対する実質的な選択性は、アクチビンに対する親和性がこのSPRアッセイフォーマットで人為的に強調されることを示唆する。

40

【0313】

表12. 抗ミオスタチンアドネクチンのSPR動力的データの要約。フォーマットAおよびBを実施例6に示す。

50

【表 5 3】

ID	Myo KD (nM)	BMP-11 KD (nM)	アクチビンA KD (nM)	フォーマット
1979_B06 (aka ATI-1133)	29	489	無結合	A、25C
2062_G02 (aka ATI-1134)	48.8	697	無結合	A、25C
2522_C09	0.51	0.45	無/弱結合	A、25C
2523_G06	1.465	10.65	無結合	A、25C
2524_C11	0.62	0.67	無結合	A、25C
2524_D09	0.64	0.81	弱結合	A、25C
2524_E10	1.34	1.42	無結合	A、25C
2524_H05	0.88	0.87	弱結合	A、25C
2524_H11	1.12	1.22	無結合	A、25C
2525_B01	1.29	1.58	弱結合	A、25C
2525_D02	0.24	0.30	無/弱結合	A、25C
2525_D05	1.28	1.99	無結合	A、25C
2525_F07	0.79	0.97	無/弱結合	A、25C
2987_H07	0.99	2.25	弱結合	A、25C
ATI-1267	0.057	0.065	弱結合	A、25C
ATI-1275	0.15	0.15	弱結合	A、25C
ATI-1277	0.16	0.14	弱結合	A、25C
ATI-1107	128	~300	無結合	A、25C
ATI-1266	0.76	2.57	弱結合	A、25C
ATI-1276	4.18	8.8	無結合	A、25C
ATI-1278	6.04	3.3	無結合	A、25C
ATI-1338	1.9	3.8	4.6	B、37C
ATI-1339	3.6	6.9	6.5	B、37C
ATI-1359	7.9	35.45	弱結合	A、25C
ATI-1375	12.6	33.2	弱結合	A、25C
ATI-1376	8.21	13.4	弱結合	A、25C
ATI-1377	8.21	14.2	弱結合	A、25C
ATI-1378	14.4	59.6	弱結合	A、25C
ATI-1379	9.5	21.6	弱結合	A、25C
PRD-932	1.43	ND	ND	B、25C
PRD-1474 (aka ATI-1465)	0.59	ND	ND	B、37C

10

20

30

40

【実施例 7】

【0314】

抗ミオスタチンアドネクチンに対する溶液相親和性

ミオスタチンに対するFc融合抗ミオスタチンアドネクチンPRD-1474の溶液親和性を動力的排除アッセイ(KinExA)を用いて測定した。PRD-1474の四重タイトレーションを、2nM (n=2)、1nM (n=1)、および0.7nM (n=1)のモノマー濃度のミオスタチンを用いて行った。相対的非結合ミオスタチン濃度を、ATI-1310固体マトリックス(ポリアクリルアミドビーズと操作遊離システインを介して結合)上で捕捉し、次いでミオスタチンをアドネクチンと同時に結合することができるミオスタチンコレセプター-ActRIIB-Igの蛍光標識構築物を用いて検出することにより測定した。ATI-1310は、ミオスタチンとの結合についてPRD-

50

1474と競合し、非結合ミオスタチンを捕捉することができる関連アドネクチンである。表13に示す全体的Kd分析は、Kd 170pMおよび95%信頼区間330~60pMを示す。PRD-1177およびATI-1338の親和性も、同じアッセイフォーマットを用いて測定した。PRD-1177のトリプリーケートタイトレーションを1nM (n=2)および0.8nM (n=1)のモノマー濃度のミオスタチンを用いて行った。ATI-1338のトリプリーケートタイトレーションを5nM (n=1)、1.6nM (n=1)、および1.4nM (n=1)モノマー濃度のミオスタチンを用いて行った。これらの分析は、PRD-1177がミオスタチンと全体的Kd値250pMおよび95%信頼区間340~130pMで結合することを示す(表13)。ATI-1338は、ミオスタチンと全体的Kd値850pMおよび95%信頼区間1400~330pMで結合する。

【0315】

10

表13. ミオスタチンの結合に対するKinExA溶液相親和性測定

【表54】

アドネクチン	Kd	95%信頼区間:	
		高Kd	低Kd
PRD-1474	170 pM	330 pM	60 pM
PRD-1177	250 pM	340 pM	130 pM
ATI-1338	850 pM	1400 pM	330 pM

【実施例8】

【0316】

20

3116_A06の突然変異分析

突然変異に対するループ位置の相対耐性を理解するため、2つの同様の独立した試験を行った。第1は、伝統的アラニンスキャンであり、アドネクチン3116_A06(配列番号118)のループ中の分離したアラニン突然変異の効果および結合を生化学的および細胞ベースのアッセイにて評価した。第2の試験は、ディープミューテーションスキャンングからなり、3116_A06(配列番号118)の同じ位置の単一部位突然変異のライブラリーを作製し、可能な20のアミノ酸で各位置を置換した。次に、これらライブラリー成分をタンパク質-mRNA融合物として発現させ、mRNAディスプレイに1回かけ(IV項に示す)、ピオチン化ミオスタチン結合ライブラリー成分をストレプトアビジン磁石ビーズを用いて残りの非結合物から分離した。このアプローチにおいて、インプットおよび結合ポピュレーションの次世代シーケンシングは、そのミオスタチンに対する固有の親和性を反映する各配列の相対豊富化/欠失の決定を可能にした。

30

【0317】

アラニンスキャンング: PCR部位指向性突然変異誘発を用いて、BCループ(残基25~33)、DEループ(残基55~58)、およびFGループ(残基80~89)において、3116_A06(配列番号118)中に単一部位アラニン突然変異を作成した。クローンをE. coli中で発現させ、実施例1に記載のごとくHTPPで精製した。サイズ排除クロマトグラフィ(SEC、実施例2に記載の)によりすべてのアラニン置換タンパク質が主としてモノマーであることが確認された(表14)。ARE-ルシフェラーゼ(実施例3)およびHTRFアッセイ(実施例4)を行った。HTRF競合結合アッセイにおいて、有効性は、IC50 = 1.5nM ~ > 100nMの範囲であった(表14)。結合が顕著に低下する(IC50 > 100nM) 該DEループのGly55、Arg56、およびGly57を除き、ほとんど位置がHTRFアッセイである程度アラニン置換を許容した。BCループのGly30、および該FGループのVal80、Thr81、およびTyr88の位置で効果がより小さく、まだ結合を示したが、親配列(「WT」)に比べてIC50は>10倍増加した。ARE-ルシフェラーゼ細胞ベースのアッセイにおいて、突然変異体の有効性は、IC50 = 0.6nM ~ > 100nMであった(表14)。アラニン突然変異の影響は、一般的にHTRFアッセイより該細胞ベースのアッセイでより大きかった。該DEループのGly55、Arg56、およびGly57、および該FGループのVal80、およびTyr88はすべて、このアッセイで有効性の顕著な低下を示した(IC50 > 100nM)。より穏やかな効果が、BC位置Leu26、Pro27、His28、Gly30、およびAsn33、およびFG位置Thr81、Tyr85、およびLeu86でみられた(IC50はすべて親配列の>10倍)。

40

50

【0318】

表14：3116_A06のアラニン突然変異体の生化学的特性および細胞ベースの有効性

【表55】

	突然変異	SEC*	ミオスタチン HT RF C50 (nM)	ミオスタチン AR E-luc IC50 (nM)
	WT親	1	0.3	0.6
BC	S25A	1	0.8	2.9
	L26A	1	2.3	16
	P27A	1	1.0	10
	H28A	1	0.8	6.2
	Q29A	1	0.7	1.5
	G30A	2	5.1	40
	K31A	1	0.6	2.2
	N33A	1	2.0	9.8
DE	G55A	2	>100	>100
	R56A	1	55	>100
	G57A	1	>100	>100
	V58A	2	1.6	3.3
FG	V80A	1	4.0	>100
	T81A	1	4.9	32
	D82A	1	0.8	1.8
	T83A	1	1.3	1.8
	G84A	1	2.0	3.6
	Y85A	1	2.0	5.5
	L86A	2	1.4	12
	K87A	1	0.8	2.0
	Y88A	1	11	>100
	K89A	1	0.7	1.6

*SEC1：高度にモノマー；SEC2：ほぼモノマー。

【0319】

ディープミューテーションショナルスクランニング：高スループットシーケンシングを、上記のような伝統的アプローチでは面倒な規模のすべての可能な単一部位ループ突然変異体の相対的適合性の同時測定を可能にするタンパク質ディスプレイと組み合わせた(「ディープミューテーションショナルスクランニング」アプローチの総説は、Araya et al., Trends in Biotechnology 29: 435-442, 2011参照。同様のアプローチは、さらにForsyth et al., mAbs 5: 523-532, 2013に記載されている)。

【0320】

ライブラリー構築および選択：3116_A06(配列番号118)の3ループ：BCループ(25~33位)、DEループ(55~58位)、およびFGループ(80~89位)のそれぞれにすべての可能な単一部位突然変異を含む3つの独立したライブラリーを作成した。各ループについて、各位置にNNKコドン(ここで、N=A、C、G、T、およびK=G、T)を個々に取り込んだ複数のオリゴヌクレオチドを設計した。これら縮合コドンの使用は、NNKを組み込む位置にすべての20アミノ酸(+終止コドン)をコードするのを可能にする。該オリゴヌクレオチドを重複伸張PCRを介して組み立て、Lib-BCが3116_A06のアミノ酸BCループのすべての単一突然変異を含

み、Lib-DEが3116_A06のすべての単一アミノ酸DEループ突然変異を含み、Lib-FGが3116_A06のすべての単一アミノ酸FGループ突然変異を含む完全長アドネクチンライブラリーを作製した。該3つのライブラリーを、Xu et al., Chemistry & Biology 9 : 933-942, 2002に記載のPRO融合を用いてmRNA-タンパク質融合分子として発現させた。Lib-BC、Lib-DE、およびLib-FG PRO融合分子を3nMピオチン化ミオスタチンに対して独立して選択し、次いで結合分子をストレプトアビジン磁性ビーズで捕捉した。該バインダーを該ビーズから100mM KOHを用いて溶出させた。該ビーズから溶出した分子は、依然としてミオスタチンと結合することができる3116_A06の変異体を表すが、初期ライブラリーに存在するが溶出液中に見られないものは、ミオスタチンと結合しない3116_A06の変異体を表す。

【0321】

NGSバーコーディングおよび混合：3ライブラリー(Lib-BC、Lib-DE、およびLib-FG)それぞれに由来する2つのポピュレーション、インプット(ミオスタチン結合前)およびバインダー(選択後ビーズから溶出)を収集し、別々に増幅した。各ポピュレーションに、5'-TruSeqユニバーサルアダプター、3'-TruSeqアダプターII、およびユニーク6-ヌクレオチドバーコード(PCRによる)を付加した。次に、全部で6バーコード化ポピュレーションを統計的に無作為化した1位置当たり同様の配列数を得るために各ループ中の無作為化した残基数に基づいて、個々に同定し、混合した(Lib-BC : Lib-DE : Lib-FG = 9 : 4 : 10)。プールした試料を、MiSeq 150bp対末端(Illumina)次世代シーケンシングにより配列決定した。

【0322】

NGSデータ分析：次世代シーケンシングから得たフォワードリード配列をポピュレーション、突然変異位置、および突然変異したアミノ酸の同定に基づいてビンした。低品質のすべての配列および複数の突然変異部位を含むものを分析から除外した。次に、選択後ポピュレーション中の各配列の頻度をインプットポピュレーション中のその頻度で割り、濃縮比(ER)を得た。親配列(WT、陽性コントロールとして働く)および終止コドンを含む配列(偶然的生存のバックグラウンドノイズを表し、陰性コントロールとして働く)のERの比較は、シグナル/バックグラウンド(S/B)比が異なることを示し、これは各ループライブラリーを個々に選択したためと思われる。このため、全配列をその固有ループについて平均終止および平均wt ERに対して標準化し、 ER^{norm} を得た。

$$ER^{norm} = (ER - ER_{stop}) / (ER_{wt} - ER_{stop})$$

【0323】

ディープミューテイショナルスキンの正当性を、単一部位アラニン突然変異体の相対的適合性と伝統的アラニンスキンで得た生化学的データを比較することにより立証した。全体的に、相関は極めて強かった(図8)。NGS ERは、HTRFおよびARE-ルシフェラーゼアッセイでみられた効果と良い相関を示すループにわたるアラニン突然変異体の豊富化および欠失のプロフィールを定義する。生化学的HTRF IC50は、図9に示す各アラニン突然変異体のNGS ER^{norm} に対して直接プロットした。アラニン相関に基づき、すべての単一部位アミノ酸突然変異を、そのNGS豊富化比：最も好ましい突然変異($ER^{norm} > 0.8$)、より好ましい突然変異($ER^{norm} > 0.5$)、および好ましい突然変異(ループ平均 ER_{stop} からの $ER^{norm} > 3$ 標準偏差)によりビンする3つのカテゴリーを確立した。後者のカテゴリーを定義する ER^{norm} の下限は、3ループで異なった：BC = 0.25 ; DE = 0.15 ; FG = 0.35。3116_A06のループのすべての単一部位突然変異体を、その標準化濃縮比に従ってビンし、突然変異に対する各位置の相対的抵抗性を決定した(表15)。

【0324】

表15：ミオスタチンに対する結合を維持する3116_A06のループ配列中の単一部位突然変異

10

20

30

40

【表 5 6】

位置	好ましい突然変異	より好ましい突然変異	最も好ましい突然変異
25	X ₅₁ ACDFHIKLNQRSTVW Y	CFISVWY	FSW
26	X ₅₂ LMV	L	L
27	X ₅₃ ACDEIKLMNPQRSTVY	P	P
28	X ₅₄ ACDEFGHIKLMNQRS TVWY	CDEFGHIKLMNQRST VWY	CFGIKLMNRSTVWY
29	X ₅₅ ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACEFHILMPQRSTVY
30	X ₅₆ GS	G	G
31	X ₅₇ ACDEFGHIKLMNQRS TVWY	ACGHIKLMNQRSVWY	ACHKLMNRVWY
32	X ₅₈ ACGLMST	AGLMS	AGL
33	X ₅₉ ACFHNQRSY	CHNQRSY	HNQ
55	G	G	G
56	R	R	R
57	G	G	G
58	X ₆₀ ACDEFIKLMNQSTV	CEILMQTV	CEILMV
80	X ₆₁ ACFILMQTVWY	ACILMV	IV
81	X ₆₂ ACFGHIKLMNQRSTV WY	CFHILMQRSTVWY	CFILMTVWY
82	X ₆₃ ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACDEFGHILMNPQST VWY	ACDEFGHILMNQSTV
83	X ₆₄ ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACDEFGHIKLMNQRS TVWY	ACDFGILMNQSTVWY
84	X ₆₅ ACDEFGHIKLMNQRS TVWY	ADEFGHILMNQSTVW Y	AGSTW
85	X ₆₆ ACFHILMNPSTVWY	CFILMPTVWY	FIVWY
86	X ₆₇ ACEFHILMNPQRSTV WY	CFHIKLMNQRTVWY	FHILMVWY
87	X ₆₈ ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACEFGIKLMNPQRST VWY	ACFGIKLMTVW
88	X ₆₉ FWY	WY	WY
89	X ₇₀ ACDEFGHIKLMNPQR STVWY	ACDEGHKLMNPQRST V	AGKLMPQR

完全ディーブミューテーションスキャンニングデータを用い、BCループの25、26、27、30、32、および33位、DEループの55、56、および57位、およびFGループの80および88位は、これらの位置の単一または数アミノ酸種のみがミオスタチンとの結合を維持するので最も保存的と思われる。他方、BCループの28、29、および31位、およびFGループの82、83、および87位を含む他の位置は突然変異に耐性が高い。

【実施例 9】

【0325】

抗ミオスタチンアドネクチン薬物動態の評価

種々のPEG化フォーマットを有するアドネクチンの薬物動態的プロフィールを検討するため、抗ミオスタチンアドネクチン2987_H07を、2分枝40KD PEG (ATI-1338)、4分枝40KD PEG (ATI-1339)、およびビス20KD PEG (ATI-1341)でフォーマットした。これら3つのPEG化アドネクチンを皮下投与する単用量試験をC57BL6マウスで行った。総薬物濃度をELISAアッセイで測定した。ATI-1338を定量するための生物分析PKイムノアッセイは、該1338をHIS-TAGタンパク質に対するモノクローナル抗体で捕捉し、次いでポリクローナル抗PEG抗体で検出する標準的サンドイッチフォーマットELISAアッセイを用いた。表16に示すよう

に、2つの40KD PEG化フォーマット、ATI-1338およびATI-1339は、ビス-20KD PEG化フォーマットATI-1341より優れた薬物動態学的増強（すなわち、より長い半減期($t_{1/2}$)およびより高い用量標準化暴露）をもたらした。

【0326】

表16. アドネクチン2987_H07に対する3つのPEG化フォーマットの薬物動態学的比較

【表57】

PKパラメーター	ATI-1338	ATI-1339	ATI-1341
用量(mg/kg)	5	3.9	4
C _{max} /用量 (nM/(mg/kg))	547	370	113
T _{max} (h)	24	24	4
AUC/用量 (nM*hr/(mg/kg))	32	23	2.1
$t_{1/2}$ (h)	25	31	16

10

【0327】

Fc融合抗ミオスタチンアドネクチン(PRD-1177、PRD-1286、およびPRD-1474)を静脈内および皮下投与する単用量試験をC57BL6マウスで行い、薬物動態学的パラメーターに対するFc融合の効果を評価した。総薬物濃度をELISAアッセイで評価した。PRD1177、1474、および1286のFcコンジュゲートの定量のための生物分析PKイムノアッセイは、すべて、該1177を足場アドネクチンに対するポリクローナル抗体で捕捉し、次いで抗ヒトIgG抗体で検出する、ECL技術を用いる標準的サンドイッチフォーマットELISAアッセイを用いた。表17に示すように、すべて3つのFc-融合アドネクチンは、PEG化アドネクチンATI-1338(25h)より半減期が長かった(58~172h)。低いSCバイオアベイラビリティは、生物分子の間質およびリンパ系輸送中のタンパク質分解を反映するようである。Fc-融合アドネクチンのSCバイオアベイラビリティは、公表文献(例えば、Richter et al., AAPS J. 2012; 14: 559-70)

20

30

【0328】

表17. 3つのFc融合抗ミオスタチンアドネクチンの薬物動態学的比較

【表58】

PKパラメーター	PRD-1177	PRD-1286	PRD-1474
用量(mg/kg)	2	2	2
クリアランス(mL/min/kg)	0.017	0.016	0.014
V _{dss} (L/kg)	0.093	0.190	0.054
$t_{1/2}$ (h)	68	172	58
SCバイオアベイラビリティ	60%	100%	94%

40

【実施例10】

【0329】

抗ミオスタチンアドネクチン阻害の機序

競合ELISA: ミオスタチンとActRIIBレセプターの結合に競合する抗ミオスタチンアドネクチンの能力を評価するための競合結合アッセイを競合ELISAを用いて行った。Nunc Maxi

50

sorpプレートを、4 で一夜、0.2M炭酸ナトリウムpH9.6緩衝液中の2 µg/mL ActRIIb-Fc (R&D Systems)でコートした。PBS-T(0.05%Tween-20含有PBS)で洗浄した後、ウェルを、25 で1時間振盪させながらOptEIA緩衝液(BD Biosciences)でブロックした。ミオスタチン(10nM; R&D Systems)を、25 で1時間振盪させながらOptEIA緩衝液中の一定濃度範囲のアドネクチンまたはActRIIb-Fc競合物(0.2pM~1 µM)とプレインキュベーションした。ブロックし、コートしたアッセイプレートをPBS-Tで洗浄し、次いでミオスタチン/競合物混合物を加え、25 で30分間振盪させながらインキュベーションした。アッセイプレートをPBS-Tで洗浄し、次いで、結合したミオスタチンを、25 で1時間振盪させながらOptEIAで希釈した1:1000ピオチン化ヤギ抗ミオスタチンポリクローナル(R&D Systems)で検出した。PBS-Tで洗浄した後、OptEIAで希釈した1:5000ストレプトアビジン-HRP(Thermo/Pierce)を加え、次いで25 で30分間振盪させながらインキュベーションした。アッセイプレートをTMB(BD Biosciences)で発色させ、2N硫酸で反応を止め、次いで吸光度をA450で読んだ。図10に示すように、溶液中のActRIIb-Fcは、予期した様にプレート上にコートしたActRIIb-Fcに対するミオスタチンの結合を完全に阻害する。しかしながら、それに対し、PRD-1288 (PRD-1474とリンカー配列のみが異なる)、PRD-1285、およびPRD-1286は、1 µM以下の濃度でActRIIbとの結合からミオスタチンを阻害しなかった。

10

【0330】

競合SPR: ミオスタチンまたはBMP11 (ミオスタチンの代用として)との結合においてI型およびII型レセプターと競合する抗ミオスタチンアドネクチンの濃色を評価するための競合結合アッセイも2つの異なる実験フォーマットでBiacoreT100装置を用いるSPRを用いて行った。「SPRフォーマットA」では、センサーチップ表面を、エタノールアミンブロッキングを用いる標準的エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)/N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)化学を用い、CM5センサーチップ(Biacore/GE Healthcare)上に10mMアセテートpH4.5中の100ug/mlプロテインA(Pierce) (4500RU)を固定して調製した。ミオスタチンとの結合においてActRIIbと競合し、ミオスタチン(自家製造)またはアドネクチン-Fc PRD-1474 (濃度7~13 µg/ml)との結合において3116A06と競合しないALK4-Fc (R&D Systems)、ALK5-Fc(R&D Systems)、ActRIIb-Fc(自家製造)、抗ミオスタチン/BMP11モノクローナル抗体(mAb-A)を、Fcテールを介して、10 µl/minの60s注射を用いて1600~430 ORUの表面密度に捕捉した。競合実験は、200nMアドネクチンATI-1523の存在下または非存在下、流速30 µl/min、180s結合および解離時間で該表面上に100nMミオスタチン (R&D Systems)またはBMP11 (R&D Systems)を流すことにより行った。固定および競合実験用のランニング緩衝液は、10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、および0.05% v/v界面活性剤P20、pH 7.4であり、10mMグリシンpH1.5を30 µl/minで30s、2回注射してサイクル間に表面を再生した。

20

30

【0331】

SPRフォーマットAでは、BMP11は、ALK4-Fc、ALK5-Fc、ActRIIb-Fc、mAb-A、およびPRD-1474表面と特異的に結合したが、ミオスタチンはActRIIb-Fc、mAb-A、およびPRD-1474と特異的に結合し、ALK4-FcまたはALK5-Fcと結合しなかった。ミオスタチンまたはBMP11結合に対するATI-1523の効果を評価するため、180s結合相の終了時における各タンパク質に対する結合反応を、それぞれ100%に標準化し、ATI-1523存在下のミオスタチンまたはBMP11に対する結合反応と比較した(表18)。予期した通り、ATI-1523は、コントロールPRD-1474表面に対するミオスタチンまたはBMP11の結合を完全に阻害した。ミオスタチンとALK4-FcまたはALK5-Fcとの相互作用を阻害するATI-1523の能力を評価するためのアッセイでは、ミオスタチンのみがこの実験フォーマット下でALK4-FcおよびALK5-Fcと有意に結合しないため、ALK4-FcおよびALK5-Fcとも結合するBMP-11をミオスタチンの代替物として用いた。ATI-1523は、ALK4-Fc(98%低下)およびALK5-Fc (69%低下)に対するBMP11の結合シグナルを有意に低下させ、アドネクチンがI型レセプターとミオスタチンとの結合に競合することを示唆した。これに対して、結合反応の増加がActRIIb-FcまたはmAb-A表面でミオスタチン/ATI-1523またはBMP11/ATI-1523複合体について認められ、オスタチン/ATI-1523またはBMP11/ATI-1523複合体がこれら表面と結合することができる、すなわち、アドネク

40

50

チンがActRIIB-FcまたはmAb-Aと競合しないことを示唆する。ActRIIB-FcおよびmAb-A表面に対するミオスタチン/ATI-1523複合体の結合反応の大きな増加 (>1000%増加)は、ミオスタチンに対する可溶化作用を有するアドネクチンと一致する。

【0332】

表18：200nM ATI-1523存在下または非存在下の、ALK4-Fc、ALK5-Fc、ActRIIB-Fc、mAb-A、またはPRD-1474表面における100nMミオスタチンまたは100nM BMP11のSPR結合反応【表59】

分析	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-Fc	mAb-A	PRD-1474
ミオスタチン			100%	100%	100%
ミオスタチン + A TI-1523			1313%	1544%	-2%
BMP11	100%	100%	100%	100%	100%
BMP11 + ATI-1523	2%	31%	189%	258%	-1%

10

【0333】

「SPRフォーマットB」を用いるアドネクチン競合：抗ミオスタチンアドネクチンの作用機序を、さらにミオスタチンまたはBMP11 (10 mMアセテートpH4.5中10 µg/ml)をCM5センサーチップ表面にEDC/NHSカップリング化学を用いて密度985RU (ミオスタチン)または530 RU (BMP11)で直接固定する「SPRフォーマットB」を用いて評価した。単独注射した(2 µM、30 µl/minで180s)のレセプター-ALK4-Fc (R&D Systems)、ALK5-Fc (R&D Systems)、またはActRIIB-モノマー(自家製造)結合反応を、該表面とアドネクチン-Fc融合物PRD-1474を予め結合(1 µM、30 µl/minで480s)した後のこれらタンパク質に対する結合反応と比較した。固定および競合実験用のランニング緩衝液は、10mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、および0.05% v/v界面活性剤P20、pH7.4であり、50mM NaOHを30 µl/minで15s、4回注射してサイクル間に表面を再生した。

20

【0334】

PRD-1474の非存在下で各レセプターは固定化BMP11と特異的に結合するが、ALK4-FcではなくALK5-FcおよびActRIIBモノマーのみが固定化ミオスタチンと結合した。PRD-1474を予め結合すると、BMP11に対するALK4-Fcの結合シグナルは有意に減少し(70%減少)、ミオスタチンまたはBMP11に対するALK5-Fcの結合も減少した(35~41%減少)が、ミオスタチンまたはBMP11表面に対するActRIIBモノマーの結合に対する影響はごくわずかであった(表19)。これらデータは、「SPRフォーマットA」から得られるSPR競合データ(表18)、競合ELISAデータ(図10)、およびARE-ルシフェラーゼアッセイでみられたミオスタチンシグナル伝達の完全な阻害(図11)と共に、アドネクチンの作用機序はI型シグナル伝達レセプター(ALK4/5)のリクルートメントの阻害であり、アドネクチンはII型レセプター(ActRIIB)の結合と競合しないことを示す。

30

【0335】

表19：PRD-1474が予め(前)結合しているかまたは結合していない固定ミオスタチンまたはBMP11表面に対する1 µM ALK4-Fc、ALK5-Fc、またはActRIIB-モノマーのSPR結合反応【表60】

40

表面	PRD-1474の前結合	ALK4-Fc	ALK5-Fc	ActRIIB-モノマー
ミオスタチン	なし		100%	100%
	あり		55%	111%
BMP11	なし	100%	100%	100%
	あり	30%	65%	92%

【0336】

50

これらアドネクチンは本発明において例示される配列ファミリーを表し、明確な配列ファミリー内の個々のクローンは同じ結合部位を維持するので、本発明に含まれる配列は、ALK4/5リクルートメントのミオスタチン-ActRIIb複合体に対する結合を阻害することにより作用する。

【0337】

該薬物動態学的データは、さらに、ミオスタチン-アドネクチン複合体レベルが経時的に蓄積し、該複合体がActRIIbと結合し、遊離薬物と独立してシグナル伝達の主な負の阻害剤として作用することを示す。これらユニークな機序は、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンを文献(例えばUS 7632499)に記載の抗ミオスタチン抗体と区別し、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンが増加した活性を有することを示す。

10

【実施例11】

【0338】

HDX-MSを用いるミオスタチンのアドネクチン結合部位のマッピング

ミオスタチンのアドネクチン結合部位を、さらに水素-重水素交換質量分析(HDX-MS)を用いて評価した。

水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)法は、バックボーンアミド水素の重水素交換速度および程度をモニターすることにより溶液中のタンパク質構造および構造的動力学を調べる。HDXのレベルは、バックボーンアミド水素の溶媒との接近可能性および該タンパク質の構造に依存する。HDXにおける該タンパク質の質量増加は、MSにより正確に測定することができる。この技術を酵素的消化と組み合わせると、ペプチドレベルの構造的特徴を得ることができ、表面に露出したペプチドをタンパク質-タンパク質複合体内部にフォールドされたものまたは境界面で隔離されたものと区別することができる。典型的には、重水素標識、次いでクエンチング実験、次いでオンラインペプチド消化、ペプチド分離、およびMS分析を行う。

20

【0339】

ミオスタチン単独では生理学的に適切なpHの条件下でHDX-MSにおいて可溶性が不適切に低い($< 10 \mu\text{g/ml}$)ことがわかったため、実施例10に記載のSPR実験を用いてアドネクチンと競合しないことがわかったmAb-A (Fab-A)由来のFab断片と該タンパク質を複合体化することによりミオスタチンの可溶性を増加させる別の戦略を用いた。HDX-MS試料のオリゴマー状態をマルチアングルレーザー光走査検出機(SEC-MALS)と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィにより特徴づけた。ミオスタチン/Fab-A複合体($\sim 120\text{kDa}$)のMALS検出量は、2つのFab-A分子と結合した1つのミオスタチンホモダイマーの期待化学量論と一致し、ミオスタチン/Fab-A/3116_A06複合体(142kDa)のMALS検出量は2つのFab-A分子+2つの3116_A06分子と結合した1つのミオスタチンホモダイマーの期待化学量論と一致した。

30

【0340】

アドネクチン3116_A06により認識されるミオスタチン上のアドネクチン結合部位をHDX-MSによってマッピングする前に、非重水素化実験を行ってミオスタチン/Fab-A (モル比1:1、各 $30 \mu\text{M}$)およびミオスタチン/Fab-A/3116_A06(モル比1:1:1、各 $30 \mu\text{M}$)試料由来のミオスタチンの共通消化性ペプチドのリストを作製し、ミオスタチンについて83.5%の配列適用範囲を達成した。この実験において、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)を標識工程に使い、次いでクエンチング緩衝液(4M GdnClおよび0.5M TCEP、pH2.5(1:1、v/v)を含む200mMリン酸緩衝液)を加えた。アドネクチン結合部位マッピング実験では、 $5 \mu\text{L}$ の各試料(ミオスタチン/Fab-Aまたはミオスタチン/Fab-A/3116_A06)を $65 \mu\text{L}$ HDX胸式緩衝液(D2O中の10mMリン酸緩衝液、pD7.0)と混合し、室温($\sim 25^\circ\text{C}$)で標識反応を開始した。反応を、種々の時間行った(20秒間、1分間、10分間、60分間、および240分間)。各標識反応期間の終了までに、クエンチング緩衝液(1:1、v/v)を加えて反応を減衰させ、減衰させた試料をWaters HDX-MSシステムに注射し分析を行った。観察された共通消化性ペプチドについて、その3116_A06存在下/非存在下の重水素取込レベルをモニターした。

40

【0341】

HDX-MS測定から得た実験データは、ミオスタチン中の2つのペプチド領域：

50

領域1: LYFNGKEQI IYGKIPAM(85~101); 配列番号329

領域2: PHTHLVHQANP(56~66); 配列番号330

からなる不連続アドネクチン結合部位を認識することを示す。相対重水素取込レベルに基づいて、2つのペプチド領域は領域1>2としてランクすることができ、領域1は重水素取込の最も顕著な変化を示す。

【実施例12】

【0342】

アドネクチンの3116_A06のミオスタチン上へのin silicoドッキング

コンピューター的アプローチを用いてHDX-MSデータと一致する3116_A06-ミオスタチン複合体の構造モデルを作成した(図13)。ヒトミオスタチン(タンパク質データバンク、www.rcsb.org; Cash et al., EMBO J. 28:2662-2676, 2009から得たPDB 3HH2)の構造中への3116_A06のタンパク質ドッキングをAccelrysソフトウェアDiscovery Studio v3.5 (Accelrys)に従いZDOCK (Chen and Wang, Proteins 47:281-294, 2002)を用いて行った。ZDOCKプロトコールは、2つのタンパク質構造(リガンド=3116_A06およびレセプター=ミオスタチン)の剛体ドッキングを利用する。ドッキングしたポーズを、3116_A06 FG (残基Thr79~Tyr88)およびBC(残基Ser25~N33)ループの構造を含む複合体についてフィルターした。好ましい複合体を、アドネクチン突然変異誘発により同定したループに好都合な置換の相関と組み合わせた境界面残基の相補性に基づいて選択した。図13Aは、ミオスタチン構造(灰色)上にマップしたALK4結合部位およびActRIIB結合部位を示す。実施例11に記載のHDX-MS実験により同定された領域1および領域2を黒色で示す。図13Bは、3116_A06(黒色)のBC、DE、およびFGループ(棒で示す)およびミオスタチン(灰色)の領域1および2(空間充填で示す)のドッキングから得られる好ましい複合体を示す。ループの好ましい突然変異として同定された種々の残基が極めて重要な寄与を示す。例えば、3116_A06のBCループ中の残基Ser25、Leu26、およびPro27は、全体的ループ構造を維持するための構造的制約として重要である。一方、Ala32は、複合体接合部で形成される小さな疎水性の裂け目に適合し、該残基の骨格はミオスタチンと水素結合を形成する。32位の最も好ましい置換はGlyまたはLeuであり、それらはアラニンの代わりに充分適合すると予測される。同様に、Asn33は、ミオスタチンの隣接トリプトファン残基との水素結合に関与する。33位の最も好ましい置換はHisおよびGlnであり、これは水素結合ドナーとして寄与しうる側鎖も含む。該DEループ中の残基は重要であり、最も好ましい置換はGly55、Arg56、およびGly57に限定され、Val58は保存的置換のみが好ましい。該モデル構造において、Arg56は、領域1のミオスタチンのY86とのpiカチオン相互作用、および他の領域1残基の主鎖と側鎖のさらなる水素結合に寄与する重要な残基である。多くのFGループ残基について、最も好ましい置換は保存的置換である。同定したある重要な位置は、Y55およびミオスタチンの領域2の他の残基とのpiカチオン相互作用およびpi-pi相互作用を有するTyr88である。該FGループは、突然変異性実験から同定した領域1および2との種々の疎水性相互作用にも関与する。これらの計算値はHDX-MSおよびSPR実験データとよく一致する。

【実施例13】

【0343】

筋骨格有効性のIn vivoマウスモデル

雄B6.SCIDマウス(9-13週齢、Jackson Laboratories、Bar Harbor、Maine)を12時間明/暗逆転周期で温度調節室に収容した。水および標準餌を自由に与えた。マウスを、体重(約20~22g)に基づきコントロールまたは本発明の被験化合物を投与する処置群に無作為化および分配した。本発明の化合物のin vivo効果を証明するため、該化合物を1週間に1回(Fc融合抗ミオスタチンアドネクチン)または1週間に2回(PEG化抗ミオスタチンアドネクチン)皮下注射により投与した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の被験化合物を用いて動物に投与した。被験動物(n=8~10マウス/群)に、14日間の時間枠で本発明の化合物を、例えば、5、6または10mg/kg/週皮下投与した。体重測定を、無作為化前、無作為化当日、および処置期間中1週間に2~3回、および試験終了時に行った。下肢筋肉量は定量的磁気共鳴映像法(MRI、Echo Medical Systems、Tex)分析により試験終了時の屠体から記録した。

次試験群をコントロール群と比較した。結果は、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンがベースラインからの体重パーセントの増加をもたらした(図14)、コントロールマウスに比べて骨格筋容量に対する有意な同化作用を示した(図15)(例えば、筋肉容量がコントロールと比べて約7~10%増加)ことを示す。

【0344】

核磁気共鳴画像法(MRI)

MRIによる肢筋肉容量測定を、内径16cmのBruker PharmaScan 4.7 Tesla (Bruker Biospin, Billerica, Ma. USA)を用いて実施した。62mm容量コイルをトランスミッターとレシーバーに用いた。下肢のローカライザー画像を得た後、T2強調画像を軸方向スライスプランを用いて得た。高速スピンエコー(RARE)シーケンスは、90°Hermiteパルス、次いで180°Hermiteパルス(TR/TE=2000/23ms)からなった。11軸スライスを、256 x 128データポイントのマトリックスディメンジョンで膝上部からくるぶしまで回収した。視野は5cm x 2.5cm、スライス厚は1.25mm、およびRAREファクターは4および8シグナル平均であった。肢筋肉量は、各肢の総筋肉量についてすべての軸スライス面積 x 1.25mmスライス厚で計算した。画像をImage Sequence Analysis (イメージシーケンスアナリシス) (ISA, Bruker Biospin, Billerica, Ma.)により目的領域(ROI)の面積平均として分析した。マニュアルROIを皮膚および皮下脂肪領域を除く肢筋肉の周りに集めた。両肢の総平均筋肉量を図15に示す。

【0345】

安全エンドポイントとして心臓容量のMRIも同じMRIスキャナーで行った。胸部領域の初期ローカライザー画像を得た後、9軸画像を大血管から心臓先端まで回収した。肢筋肉の分析と同様に、軸面積を加え、1.25 mmのスライス厚をかけて各動物の総心臓容積を得た。MRIで心臓容積に有意差はみられなかった。

統計分析

群間の差を対応のある両側スチューデントのt検定分析により評価した。

【実施例14】

【0346】

in vivoでの筋肉成長に対するPRD-1474の効果

雄B6.SCIDマウス(n=10/群)を、PRD-1474を図16に記載の種々の用量で投与し、処置期間が28日間である以外は、実施例10に記載のごとく維持し、処置した。PRD-1474は1mg/kgでPBSコントロール群に比べて下肢筋肉容量の有意な11.1%の増加を示した(p<0.0001)。下肢筋肉容量の27.7%、29.7%、および32.8%の有意な増加もPRD-1474のそれぞれ10mg/kg、30mg/kg、および100mg/kgで観察された。すべての処置用量群でコントロールに比べて心臓容量の変化はみられなかった。データは平均±標準偏差で示す。種々の用量群をANOVAを用いて比較した>(*p<0.0001; #群間で有意差無し)。

【0347】

該データは、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンが先に記載のミオスタチン阻害剤(例えば、US 7632499, J. Clin. Oncol. 30(Suppl): Abstr. 2516, 2012)より著しく低用量で有効であることを示す。したがって、本発明の抗ミオスタチンアドネクチンは、筋肉消耗および本明細書に記載の代謝疾患を治療するために単独または他のミオスタチン阻害剤、または他の薬剤と組み合わせて投与すると、望ましくない副作用が低下し、低用量で有効性の増加をもたらす。

【0348】

態様

1. フィブネクチンタイプIII第10ドメイン(¹⁰Fn3)を含むポリペプチドであって、
該¹⁰Fn3がヒト¹⁰Fn3ドメインの対応するループの配列と比べて変化したアミノ酸配列を含むループBC、DE、およびFGから選ばれる少なくとも1のループを有し、
ミオスタチンと結合するポリペプチド。
2. K_Dが500nM以下のミオスタチンと結合する態様1に記載のポリペプチド。
3. 該BCループが式: X₁-L-P-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇に記載のアミノ酸配列を含む態様1また

は2に記載のポリペプチド

[式中、

- (a) X_1 は、S、T、およびYからなる群から選ばれる、
- (b) X_2 は、H、Y、N、R、F、G、S、およびTからなる群から選ばれる、
- (c) X_3 は、A、P、Q、S、F、H、N、およびRからなる群から選ばれる、
- (d) X_4 は、G、およびAからなる群から選ばれる、
- (e) X_5 は、H、L、R、V、N、D、F、I、およびKからなる群から選ばれる、
- (f) X_6 は、A、L、G、M、F、I、およびVからなる群から選ばれる、
- (g) X_7 は、からなる群から選ばれる、H、およびNからなる群から選ばれる。]

- 4. X_1 がSである態様3に記載のポリペプチド。 10
- 5. X_2 がHまたはYである態様3または4に記載のポリペプチド。
- 6. X_3 がAまたはPである態様3~5のいずれかに記載のポリペプチド。
- 7. X_4 がGである態様3~6のいずれかに記載のポリペプチド。
- 8. X_5 がH、LまたはRである態様3~7のいずれかに記載のポリペプチド。
- 9. X_6 がAまたはLである態様3~8のいずれかに記載のポリペプチド。

【 0 3 4 9 】

- 10. X_7 がHである態様3~9のいずれかに記載のポリペプチド。
- 11. BCループが配列番号7、11~21、23~31、34、および36~38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様3に記載のポリペプチド。
- 12. BCループが配列番号34で示されるアミノ酸配列を含む態様11に記載のポリペプチド 20
- 13. DEループが式： $G-R-G-X_8$ （ここで、 X_8 はVまたはLである）で示されるアミノ酸配列を含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。
- 14. DEループが配列番号39および42からなる群から選ばれるアミノ酸を含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。
- 15. DEループが配列番号39で示されるアミノ酸配列を含む態様14に記載のポリペプチド。
- 16. 該FGループが式： $X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ で示されるアミノ酸配列を含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド

[式中、

- (a) X_9 は、L、V、およびIからなる群から選ばれる、
- (b) X_{10} は、T、およびSからなる群から選ばれる、
- (c) X_{11} は、K、R、A、G、S、D、H、N、T、およびPからなる群から選ばれる、
- (d) X_{12} は、S、T、A、E、H、K、およびNからなる群から選ばれる、
- (e) X_{13} は、K、G、Q、D、E、N、T、およびSからなる群から選ばれる、
- (f) X_{14} は、V、I、F、L、M、P、T、およびYからなる群から選ばれる、
- (g) X_{15} は、I、L、およびYからなる群から選ばれる、
- (h) X_{16} は、H、I、V、K、L、R、F、G、S、およびTからなる群から選ばれる、
- (i) X_{17} は、Y、およびHからなる群から選ばれる、
- (j) X_{18} は、K、M、L、R、およびVからなる群から選ばれる。]
- 17. X_9 がLまたはVである態様16に記載のポリペプチド。
- 18. X_{10} がTである態様16または17に記載のポリペプチド。
- 19. X_{11} がKまたはRである態様16~18のいずれかに記載のポリペプチド。

【 0 3 5 0 】

- 20. X_{12} がSまたはTである態様16~19のいずれかに記載のポリペプチド。
- 21. X_{13} がK、GまたはQである態様16~20のいずれかに記載のポリペプチド。
- 22. X_{14} がVまたはIである態様16~21のいずれかに記載のポリペプチド。
- 23. X_{15} がIである態様16~22のいずれかに記載のポリペプチド。
- 24. X_{16} がH、IまたはVである態様16~23のいずれかに記載のポリペプチド。
- 25. X_{17} がYである態様16~24のいずれかに記載のポリペプチド。 50

26. X_{18} がKまたはMである態様16~25のいずれかに記載のポリペプチド。
27. FGループが、配列番号46、50~62、64~72、75~77、および79からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。
28. FGループが配列番号75で示されるアミノ酸配列を含む態様27に記載のポリペプチド。
29. BCループが式： X_{19} - X_{20} -P- X_{21} -G- X_{22} -Aで示されるアミノ酸配列を含む態様1または2に記載のポリペプチド
 [式中、
 (a) X_{19} は、D、E、V、およびWからなる群から選ばれる、
 (b) X_{20} は、A、S、およびVからなる群から選ばれる、
 (c) X_{21} は、R、A、G、K、およびLからなる群から選ばれる、
 (d) X_{22} は、LおよびRからなる群から選ばれる。]。
30. X_{19} がDである態様29に記載のポリペプチド。
 【0351】
31. X_{20} がAである態様29または30に記載のポリペプチド。
32. X_{21} がRまたはAである態様29~31のいずれかに記載のポリペプチド。
33. X_{22} がLである態様29~32のいずれかに記載のポリペプチド。
34. BCループが、配列番号8~10、22、32、33、および35からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様29~33のいずれかに記載のポリペプチド。
35. DEループが式： X_{23} -G-R-G- X_{24}
 [式中、
 (a) X_{23} は、V、P、F、I、およびLからなる群から選ばれ、
 (b) X_{24} は、S、N、およびTからなる群から選ばれる。]
 で示されるアミノ酸を含む態様1、2、および27~34のいずれかに記載のポリペプチド。
36. DEループが、配列番号40、41、および43~45からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様35に記載のポリペプチド。
37. FGループが式： X_{25} - X_{26} -R- X_{27} -G- X_{28} - X_{29} - X_{30} - X_{31} - X_{32} で示されるアミノ酸配列を含む態様1、2、および29~36のいずれかに記載のポリペプチド
 [式中、
 (a) X_{25} は、I、およびVからなる群から選ばれる、
 (b) X_{26} は、F、D、およびYからなる群から選ばれる、
 (c) X_{27} は、D、およびTからなる群から選ばれる、
 (d) X_{28} は、P、M、V、およびTからなる群から選ばれる、
 (e) X_{29} は、V、L、N、R、およびSからなる群から選ばれる、
 (f) X_{30} は、H、T、L、N、Q、およびSからなる群から選ばれる、
 (g) X_{31} は、F、W、Y、H、およびLからなる群から選ばれる、
 (h) X_{32} は、D、A、およびGからなる群から選ばれる。]。
38. X_{25} がIである態様37に記載のポリペプチド。
39. X_{26} がFである態様37または38に記載のポリペプチド。
40. X_{27} がDである態様37~39のいずれかに記載のポリペプチド。
 【0352】
41. X_{28} がPである態様37~40のいずれかに記載のポリペプチド。
42. X_{29} がVである態様37~41のいずれかに記載のポリペプチド。
43. X_{30} がHまたはTである態様37~42のいずれかに記載のポリペプチド。
44. X_{31} がFまたはWである態様37~43のいずれかに記載のポリペプチド。
45. X_{32} がDである態様37~44のいずれかに記載のポリペプチド。
46. FGループが、配列番号47~49、63、73、74、および78からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様37~45のいずれかに記載のポリペプチド。
47. BCループおよびDEループを含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。
48. BCループが、配列番号7~38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含み、DEループ

が、配列番号39～45からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様47に記載のポリペプチド。

49. BCループおよびFGループを含む態様1～46のいずれかに記載のポリペプチド。

50. BCループが、配列番号7～38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含み、FGループが、配列番号46～79からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様49に記載のポリペプチド。

【0353】

51. DEループおよびFGループを含む態様1～46のいずれかに記載のポリペプチド。

52. DEループが配列番号39～45からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含み、FGループが配列番号46～79からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様51に記載のポリペプチド。

10

53. BCループ、DEループ、およびFGループを含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。

54. BCループが、配列番号7～38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含み、DEループが、配列番号39～45からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含み、FGループが、配列番号46～79からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様53に記載のポリペプチド。

55. BCループが配列番号34のアミノ酸配列を含み、DEループが配列番号39を含み、FGループが配列番号75を含む態様54に記載のポリペプチド。

56. BCループ配列が1、2、3、4、5、または6アミノ酸置換を有し、DEループが1アミノ酸置換を有し、FGループが1、2、3、4、5、6、7、または8アミノ酸置換を有する態様55に記載のポリペプチド。

20

57. (a) BCループが式： X_{33} -L-P- X_{34} - X_{35} - X_{36} - X_{37} - X_{38} - X_{39}

[式中、

(i) X_{33} は、TおよびYからなる群から選ばれる、

(ii) X_{34} は、Y、N、R、F、G、S、およびTからなる群から選ばれる、

(iii) X_{35} は、A、P、S、F、H、N、およびRからなる群から選ばれる、

(iv) X_{36} はAである；

(v) X_{37} は、H、L、R、V、N、D、F、およびIからなる群から選ばれる、

(vi) X_{38} は、L、G、M、F、I、およびVからなる群から選ばれる、および

(vii) X_{39} はHである。]

30

で示されるアミノ酸配列を含み、

(b) DEループが式： G -R-G- X_{40} （式中、 X_{40} はLである）で示されるアミノ酸配列を含み、

、

(c) FGループが式 X_{41} - X_{42} - X_{43} - X_{44} - X_{45} - X_{46} - X_{47} - X_{48} - X_{49} - X_{50}

[式中、

(i) X_{41} は、LおよびIからなる群から選ばれる、

(ii) X_{42} はSである、

(iii) X_{43} は、K、R、A、G、S、H、N、T、およびPからなる群から選ばれる、

(iv) X_{44} は、S、A、E、H、K、およびNからなる群から選ばれる、

(v) X_{45} は、K、Q、D、E、N、T、およびSからなる群から選ばれる、

40

(vi) X_{46} は、V、I、F、L、M、P、およびTからなる群から選ばれる、

(vii) X_{47} は、IおよびYからなる群から選ばれる、

(viii) X_{48} は、H、I、V、L、R、F、G、S、およびTからなる群から選ばれる、

(ix) X_{49} はHである、

(x) X_{50} は、M、L、R、およびVからなる群から選ばれる。]

で示されるアミノ酸配列を含む態様56に記載のポリペプチド。

58. BCループが式： X_{51} - X_{52} - X_{53} - X_{54} - X_{55} - X_{56} - X_{57} - X_{58} - X_{59} で示されるアミノ酸配列を含む態様1または2に記載のポリペプチド

[式中、

(a) X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から

50

選ばれる、

(b) X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる、

(c) X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる、

(d) X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、

(e) X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、

(f) X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる、

(g) X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、 10

(h) X_{58} は、かA、C、G、L、M、S、およびTらなる群から選ばれる、および

(i) X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYからなる群から選ばれる。]。

59. (a) X_{51} が、C、F、I、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(b) X_{52} が、Lからなる群から選ばれ、

(c) X_{53} が、Pからなる群から選ばれ、

(d) X_{54} が、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(e) X_{55} が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、 20

(f) X_{56} が、Gからなる群から選ばれ、

(g) X_{57} が、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(h) X_{58} が、A、G、L、M、およびSからなる群から選ばれ、および

(i) X_{59} が、C、H、N、Q、S、およびYからなる群から選ばれる、態様58に記載のポリペプチド。

60. (a) X_{51} が、F、S、およびWからなる群から選ばれ、

(b) X_{52} が、Lからなる群から選ばれ、

(c) X_{53} が、Pからなる群から選ばれ、

(d) X_{54} が、C、F、G、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、 30

(e) X_{55} が、A、C、E、F、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれ、

(f) X_{56} が、Gからなる群から選ばれ、

(g) X_{57} が、A、C、H、K、L、M、N、R、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(h) X_{58} が、A、G、およびLからなる群から選ばれ、

(i) X_{59} が、H、N、およびQからなる群から選ばれる、態様59に記載のポリペプチド。

【 0 3 5 4 】

61. X_{51} がSである態様58～60のいずれかに記載のポリペプチド。

62. X_{52} がLである態様58に記載のポリペプチド。 40

63. X_{53} がPである態様58に記載のポリペプチド。

64. X_{54} がHである態様58、59、および61～63のいずれかに記載のポリペプチド。

65. X_{55} がQである態様58～64のいずれかに記載のポリペプチド。

66. X_{56} がGである態様58に記載のポリペプチド。

67. X_{57} がKである態様58～66のいずれかに記載のポリペプチド。

68. X_{58} がAである態様の58～67いずれかに記載のポリペプチド。

69. X_{59} がNである態様58～68のいずれかに記載のポリペプチド。

70. BCループが、配列番号7、11～21、23～31、34、および36～38からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様58に記載のポリペプチド。

【 0 3 5 5 】

71. BCループが配列番号34で示されるアミノ酸配列を含む態様70に記載のポリペプチド。

72. DEループが式：G-R-G- X_{60} （ここで、 X_{60} は、A、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVである）で示されるアミノ酸配列を含む態様58～71のいずれかに記載のポリペプチド。

73. X_{60} がC、E、I、L、M、Q、T、およびVである態様72に記載のポリペプチド。

74. X_{60} がC、E、I、L、M、およびVである態様73に記載のポリペプチド。

75. X_{60} がVである態様72～74のいずれかに記載のポリペプチド。

76. DEループが配列番号39および42からなる群から選ばれるアミノ酸を含む態様58～75のいずれかに記載のポリペプチド。

77. DEループが配列番号39で示されるアミノ酸配列を含む態様76に記載のポリペプチド。

78. FGループが式 X_{61} - X_{62} - X_{63} - X_{64} - X_{65} - X_{66} - X_{67} - X_{68} - X_{69} - X_{70} で示されるアミノ酸配列を含む態様58～77のいずれかに記載のポリペプチド

[式中、

(a) X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(b) X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(c) X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(d) X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(e) X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(f) X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(g) X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(h) X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(i) X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる；

(j) X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。]。

79. (a) X_{61} が、A、C、I、L、M、およびVからなる群から選ばれ、

(b) X_{62} が、C、F、H、I、L、M、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(c) X_{63} が、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(d) X_{64} が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(e) X_{65} が、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(f) X_{66} が、C、F、I、L、M、P、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(g) X_{67} が、C、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(h) X_{68} が、A、C、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

(i) X_{69} が、W、およびYからなる群から選ばれ、

(j) X_{70} が、A、C、D、E、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、およびVからなる群から選ばれる、態様78に記載のポリペプチド。

80. (a) X_{61} が、I、およびVからなる群から選ばれ、

(b) X_{62} が、C、F、I、L、M、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、

10

20

30

40

50

- (c) X_{63} が、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれ、
- (d) X_{64} が、A、C、D、F、G、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ、
- (e) X_{65} が、A、G、S、T、およびWからなる群から選ばれ、
- (f) X_{66} が、F、I、V、W、およびYからなる群から選ばれ、
- (g) X_{67} が、F、H、I、L、M、V、W、およびYからなる群から選ばれ、
- (h) X_{68} が、A、C、F、G、I、K、L、M、T、V、およびWからなる群から選ばれ、
- (i) X_{69} が、W、およびYからなる群から選ばれ、
- (j) X_{70} が、A、G、K、L、M、P、Q、およびRからなる群から選ばれる
- 態様79に記載のポリペプチド。

10

【0356】

81. X_{61} がVである態様78~80のいずれかに記載のポリペプチド。
82. X_{62} がTである態様78~81のいずれかに記載のポリペプチド。
83. X_{63} がDである態様78~82のいずれかに記載のポリペプチド。
84. X_{64} がTである態様78~83のいずれかに記載のポリペプチド。
85. X_{65} がGである態様78~84のいずれかに記載のポリペプチド。
86. X_{66} がYである態様78~85のいずれかに記載のポリペプチド。
87. X_{67} がLである態様78~86のいずれかに記載のポリペプチド。
88. X_{68} がKである態様78~87のいずれかに記載のポリペプチド。
89. X_{69} がYである態様78~88のいずれかに記載のポリペプチド。
90. X_{70} がKである態様78~89のいずれかに記載のポリペプチド。

20

【0357】

91. (a) BCループが式： $X_{51}-X_{52}-X_{53}-X_{54}-X_{55}-X_{56}-X_{57}-X_{58}-X_{59}$ で示されるアミノ酸配列を含み

[式中、

- (i) X_{51} は、A、C、D、F、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、
- (ii) X_{52} は、L、M、およびVからなる群から選ばれる、
- (iii) X_{53} は、A、C、D、E、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれる、
- (iv) X_{54} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである、
- (v) X_{55} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、
- (vi) X_{56} は、GおよびSからなる群から選ばれる、
- (vii) X_{57} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである、
- (viii) X_{58} は、A、C、G、L、M、S、およびTである、
- (ix) X_{59} は、A、C、F、H、N、P、Q、R、S、およびYである。]

30

40

- (b) DEループが、式： $G-R-G-X_{60}$ (式中、 X_{60} は、A、C、D、E、F、I、K、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれる) で示されるアミノ酸配列を含み、

- (c) FGループが、式： $X_{61}-X_{62}-X_{63}-X_{64}-X_{65}-X_{66}-X_{67}-X_{68}-X_{69}-X_{70}$ で示されるアミノ酸配列を含む

[式中、

- (i) X_{61} は、A、C、F、I、L、M、Q、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、
- (ii) X_{62} は、A、C、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYである、
- (iii) X_{63} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、
- (iv) X_{64} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYか

50

らなる群から選ばれる、

(v) X_{65} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる；

(vi) X_{66} は、A、C、F、H、I、L、M、N、P、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、

(vii) X_{67} は、A、C、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、

(viii) X_{68} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる、

(ix) X_{69} は、F、W、およびYからなる群から選ばれる、

(x) X_{70} は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる。]

態様1または2に記載のポリペプチド。

92. (a) (i) X_{51} が、C、F、I、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(ii) X_{52} がLであり；

(iii) X_{53} がPであり；

(iv) X_{54} が、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(v) X_{55} が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(vi) X_{56} がGであり；

(vii) X_{57} が、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(viii) X_{58} が、A、G、L、M、およびSからなる群から選ばれ；および

(ix) X_{59} が、C、H、N、Q、S、およびYからなる群から選ばれ；

(b) X_{60} が、C、E、I、L、M、Q、T、およびVからなる群から選ばれ；および

(c) (i) X_{61} が、A、C、I、L、M、およびVからなる群から選ばれ；

(ii) X_{62} が、C、F、H、I、L、M、Q、R、S、T、V、W、およびYであり；

(iii) X_{63} が、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(iv) X_{64} が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(v) X_{65} が、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(vi) X_{66} が、C、F、I、L、M、P、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(vii) X_{67} が、C、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(viii) X_{68} が、A、C、E、F、G、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(ix) X_{69} が、WおよびYからなる群から選ばれ；

(x) X_{70} が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれる

態様91に記載のポリペプチド。

93. (a) (i) X_{51} が、F、S、およびWからなる群から選ばれ；

(ii) X_{52} がLであり；

(iii) X_{53} がPであり；

(iv) X_{54} が、C、F、G、I、K、L、M、N、R、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；

(v) X_{55} が、A、C、E、F、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、およびYからなる群から選ばれ；

10

20

30

40

50

- (vi) X_{56} がGであり；
- (vii) X_{57} が、A、C、H、K、L、M、N、R、V、W、およびYからなる群から選ばれ；
- (viii) X_{58} が、A、G、およびLからなる群から選ばれ；
- (ix) X_{59} が、H、N、およびQからなる群から選ばれ；
- (b) X_{60} が、C、E、I、L、M、およびVからなる群から選ばれ；
- (c) (i) X_{61} が、I、およびVからなる群から選ばれ；
- (ii) X_{62} が、C、F、I、L、M、T、V、W、およびYであり；
- (iii) X_{63} が、A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、およびVからなる群から選ばれ；
- (iv) X_{64} が、A、C、D、F、G、I、L、M、N、Q、S、T、V、W、およびYからなる群から選ばれ；
- (v) X_{65} が、A、G、S、T、およびWからなる群から選ばれ；
- (vi) X_{66} が、F、I、V、W、およびYからなる群から選ばれ；
- (vii) X_{67} が、F、H、I、L、M、V、W、およびYからなる群から選ばれ；
- (viii) X_{68} が、A、C、F、G、I、K、L、M、T、V、およびWからなる群から選ばれ；
- (ix) X_{69} が、W、およびYからなる群から選ばれ；
- (x) X_{70} が、A、G、K、L、M、P、Q、およびRからなる群から選ばれる
- 態様92に記載のポリペプチド。
94. (a) (i) X_{51} がSであり；
- (ii) X_{52} がLであり；
- (iii) X_{53} がPであり；
- (iv) X_{54} がHであり；
- (v) X_{55} がQであり；
- (vi) X_{56} がGであり；
- (vii) X_{57} がKであり；
- (viii) X_{58} がAであり；
- (ix) X_{59} がNであり；
- (b) X_{60} がVであり；
- (c) (i) X_{61} がVであり；
- (ii) X_{62} がTであり；
- (iii) X_{63} がDであり；
- (iv) X_{64} がTであり；
- (v) X_{65} がGであり；
- (vi) X_{66} がYであり；
- (vii) X_{67} がLであり；
- (viii) X_{68} がKであり；
- (ix) X_{69} がYであり；
- (x) X_{70} がKである
- 態様92に記載のポリペプチド。
95. 配列番号118、273、281、または331の非BC、DE、およびFGループ領域と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%または100%同一なアミノ酸配列を含む、態様1または2に記載のポリペプチド。
96. BC、DE、またはFGループアミノ酸配列が、配列番号7~38、39~45、および46~79のいずれかとそれぞれ少なくとも80%同一な態様1または2に記載のポリペプチド。
97. 配列番号80~123、228~239、252~273、281、および331のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を含む、態様1に記載のポリペプチド。
98. 配列番号331と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を含む、態様97に記載のポリペプチド。
99. 配列番号273と少なくとも80%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一な

アミノ酸配列を含む、態様97に記載のポリペプチド。

100. 配列番号80～123、228～239、252～273、281、および331からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む態様1に記載のポリペプチド。

【0358】

101. 配列番号331に記載のアミノ酸配列を含む態様100に記載のポリペプチド。

102. 配列番号273に記載のアミノ酸配列を含む態様101に記載のポリペプチド。

103. ミオスタチンのアドネクチン結合部位が不連続である先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。

104. アミノ酸56～66内の領域と結合する態様103に記載のポリペプチド。

105. アミノ酸85～101の領域と結合する態様103に記載のポリペプチド。

106. 配列番号3のアミノ酸85～101、および56～66内の領域と結合する態様103に記載のポリペプチド。

107. ミオスタチンとの結合についてActRIIBと競合する先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。

108. ミオスタチンとの結合についてALK4および/またはALK5と競合する先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。

109. さらに、ポリエチレングリコール、シアル酸、Fc、Fc断片、トランスフェリン、血清アルブミン、血清アルブミン結合タンパク質が、および血清免疫グロブリン結合タンパク質からなる群から選ばれる1またはそれ以上の薬物動態学的(PK)部分を含む先の態様のいずれかに記載のポリペプチド。

110. 該PK部分および該ポリペプチドが、少なくとも1のジスルフィド結合、ペプチド結合、ポリペプチド、ポリマー糖またはポリエチレングリコール部分を介して結合する態様109に記載のポリペプチド。

【0359】

111. 該PK部分および該ポリペプチドが、配列番号181～227からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有するリンカーを介して結合する態様109に記載のポリペプチド。

112. 該血清アルブミン結合タンパク質がフィブロネクチンタイプIII第10ドメイン(¹⁰Fn3)を含む態様109に記載のポリペプチド。

113. 該¹⁰Fn3ドメインがHSAと結合する態様109に記載のポリペプチド。

114. 該PK部分がFcである態様109に記載のポリペプチド。

115. 該Fcが該ポリペプチドのN末端にある態様114に記載のポリペプチド。

116. 該Fcが該ポリペプチドのC末端にある態様115に記載のポリペプチド。

117. ダイマーを形成する態様114～116のいずれかに記載のポリペプチド。

118. 該PK部分がポリエチレングリコールである態様109に記載のポリペプチド。

119. 先の態様のいずれかのポリペプチドおよび医薬的に許容される担体を含む医薬組成物。

120. 本質的にエンドトキシン不含である態様118記載の組成物。

121. 態様1～116のいずれかに記載のポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

122. 配列番号124～167、240-251、および284～305からなる群から選ばれる配列を有する態様121に記載の単離された核酸分子。

123. 態様1～116のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

124. 態様1～115のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸を含む細胞。

125. 該ポリペプチドを発現させるのに適した条件下で態様124の細胞を培養し、該ポリペプチドを精製することを含むミオスタチン結合ポリペプチドの製造方法。

126. 有効量の、態様1～120のいずれかに記載の該ポリペプチドまたは組成物を投与することを含む対象のミオスタチン関連疾患または障害を軽減または阻害する方法。

127. 該疾患または障害が以下からなる群から選ばれる態様126に記載の方法：

筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、鬱血性閉塞性肺疾患、慢性心不全、癌、AIDs、腎不全、慢性腎疾患、尿毒症、リウマチ性関節炎、骨格筋減少症、長期安静による筋肉の

10

20

30

40

50

消耗、脊髄損傷、卒中、骨折、老化、糖尿病、肥満、高血糖症、悪液質、変形性関節症、骨粗鬆症、心筋梗塞、および線維症。

128. 有効量の態様1~120のいずれかに記載の該ポリペプチドまたは組成物を投与することを含む、対象の筋肉の消耗に関連する障害を軽減または阻害する方法。

129. 該障害が以下からなる群から選ばれる態様128に記載の方法：筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、鬱血性閉塞性肺疾患、慢性心不全、癌、AIDs、悪液質、腎不全、慢性腎疾患、尿毒症、リウマチ性関節炎、骨格筋減少症、長期安静による筋肉の消耗、脊髄損傷、外傷、卒中、骨折、および老化。

130. 該疾患が筋ジストロフィーである態様129に記載の方法。

【0360】

131. 対象に対する該ポリペプチドの投与が少なくとも1の以下の生理学的効果をもたらす態様128に記載の方法：

- (a) 筋肉量の増加；
- (b) 筋肉細胞の数の増加；
- (c) 筋肉細胞の大きさの増加；および
- (d) 筋肉強度の増加。

132. 有効量の、態様1~120のいずれかに記載の該ポリペプチドまたは組成物を投与することを含む対象の代謝障害を軽減または阻害する方法。

133. 対象が、糖尿病、高血糖症、高インスリン血症、高脂血症、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、肥満、およびメタボリックシンドロームからなる群から選ばれる疾患または障害を有する態様132に記載の方法。

134. 該疾患または障害がII型糖尿病である態様132に記載の方法。

135. さらに、糖尿病を治療するための第二治療用組成物を投与することを含む態様134に記載の方法。

136. 対象に対するポリペプチドの投与が以下の生物学的効果の少なくとも1つをもたらす態様131~135のいずれかに記載の方法：

- (a) インスリン感受性の増加；
- (b) 対象における細胞によるグルコース取り込みの増加；
- (c) 血液グルコースレベルの低下；および
- (d) 体脂肪の減少。

137. 有効量の、態様1~120のいずれかに記載のポリペプチドまたは組成物を投与することを含む対象の除脂肪筋肉量を増加させる方法。

138. 有効量の、態様1~120のいずれかに記載の該ポリペプチドまたは組成物を投与することを含む、対象の除脂肪筋肉量/脂肪比を増加させる方法。

139. 態様1~120のいずれかに記載の該ポリペプチドまたは組成物および使用説明書を含むキット。

140. 試料と態様1~117のいずれかに記載のポリペプチドを接触させ、該ポリペプチドとミオスタチンとの結合を検出または測定することを含む、試料中のミオスタチンを検出または測定する方法。

10

20

30

【 図 1 】

1379 806 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (806) 1380 807 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (807) 1381 808 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (808) 1382 809 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (809) 1383 810 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (810) 1384 811 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (811) 1385 812 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (812) 1386 813 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (813) 1387 814 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (814) 1388 815 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (815) 1389 816 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (816) 1390 817 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (817) 1391 818 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (818) 1392 819 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (819) 1393 820 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (820) 1394 821 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (821) 1395 822 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (822) 1396 823 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (823) 1397 824 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (824) 1398 825 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (825) 1399 826 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (826) 1400 827 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (827) 1401 828 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (828) 1402 829 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (829) 1403 830 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (830) 1404 831 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (831) 1405 832 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (832) 1406 833 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (833) 1407 834 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (834) 1408 835 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (835) 1409 836 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (836) 1410 837 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (837) 1411 838 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (838) 1412 839 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (839) 1413 840 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (840) 1414 841 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (841) 1415 842 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (842) 1416 843 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (843) 1417 844 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (844) 1418 845 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (845) 1419 846 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (846) 1420 847 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (847) 1421 848 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (848) 1422 849 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (849) 1423 850 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (850) 1424 851 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (851) 1425 852 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (852) 1426 853 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (853) 1427 854 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (854) 1428 855 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (855) 1429 856 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (856) 1430 857 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (857) 1431 858 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (858) 1432 859 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (859) 1433 860 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (860) 1434 861 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (861) 1435 862 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (862) 1436 863 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (863) 1437 864 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (864) 1438 865 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (865) 1439 866 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (866) 1440 867 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (867) 1441 868 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (868) 1442 869 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (869) 1443 870 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (870) 1444 871 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (871) 1445 872 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (872) 1446 873 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (873) 1447 874 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (874) 1448 875 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (875) 1449 876 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (876) 1450 877 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (877) 1451 878 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (878) 1452 879 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (879) 1453 880 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (880) 1454 881 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (881) 1455 882 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (882) 1456 883 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (883) 1457 884 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (884) 1458 885 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (885) 1459 886 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (886) 1460 887 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (887) 1461 888 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (888) 1462 889 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (889) 1463 890 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (890) 1464 891 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (891) 1465 892 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (892) 1466 893 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (893) 1467 894 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (894) 1468 895 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (895) 1469 896 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (896) 1470 897 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (897) 1471 898 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (898) 1472 899 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (899) 1473 900 MOTWVYVLLVYVAVPPELLL... (900)

Fig. 1

【 図 2 】

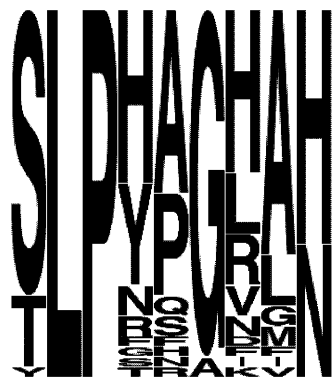


Fig. 2

【 図 3 】



Fig. 3

【 図 4 】



Fig. 4

【 図 5 】



Fig. 5

【 図 6 】



Fig. 6

【 図 7 】



Fig. 7

【 図 9 】

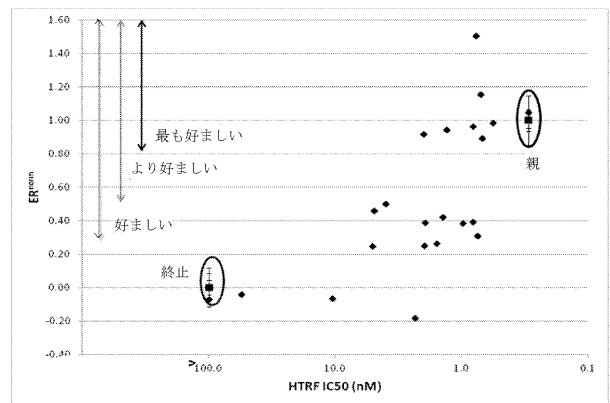


Fig. 9

【 図 8 】

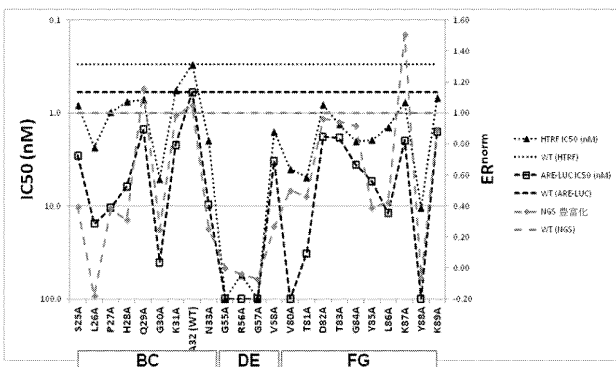


Fig. 8

【 図 1 0 】

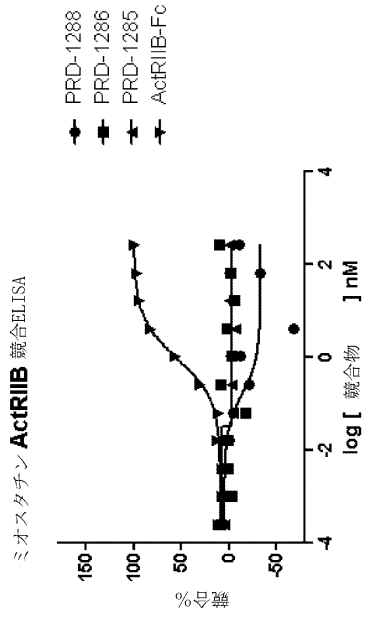


Fig. 10

【 図 1 1 】

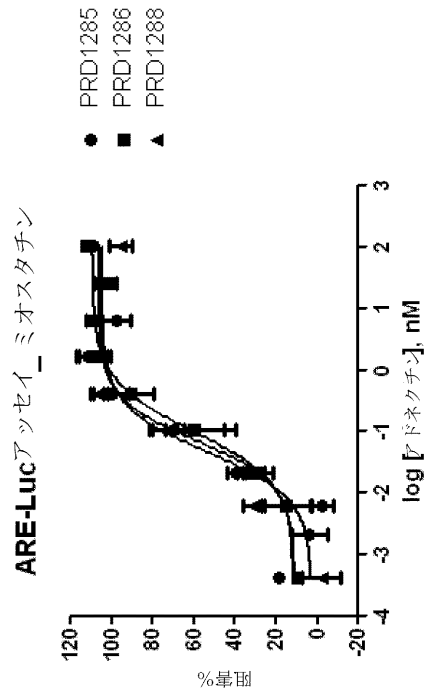


Fig. 11

【 図 1 2 】

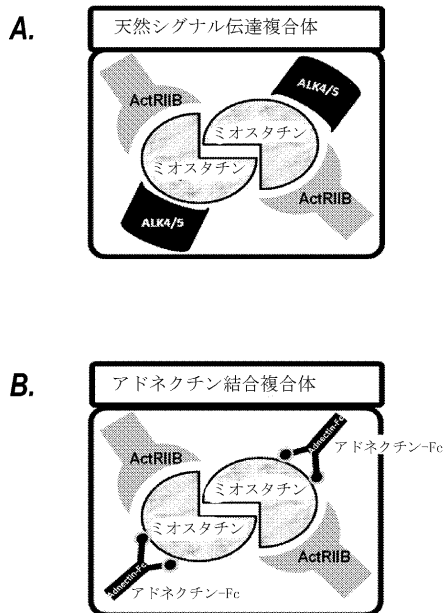


Fig. 12

【 図 1 3 A 】

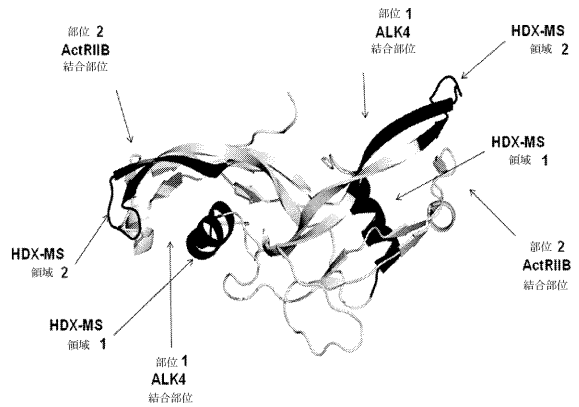


Fig. 13A

【 図 1 3 B 】

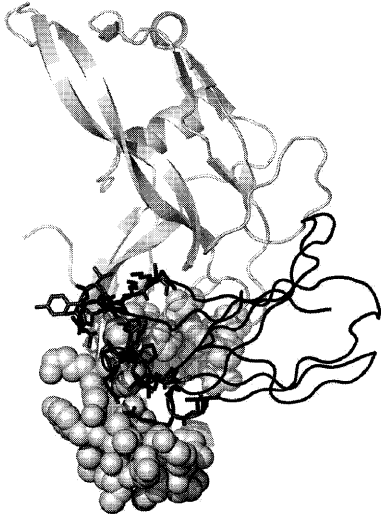


Fig. 13B

【 図 1 4 】

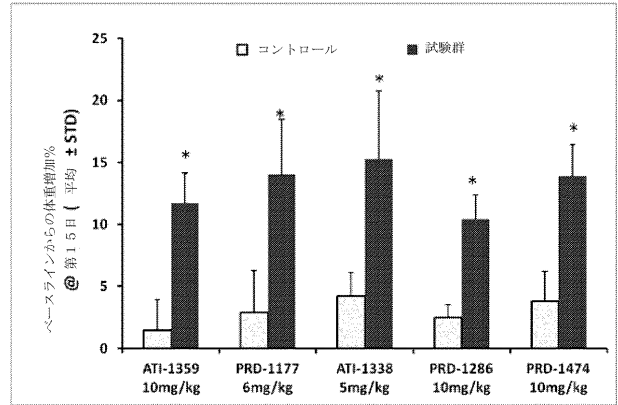


Fig. 14

【 図 1 5 】

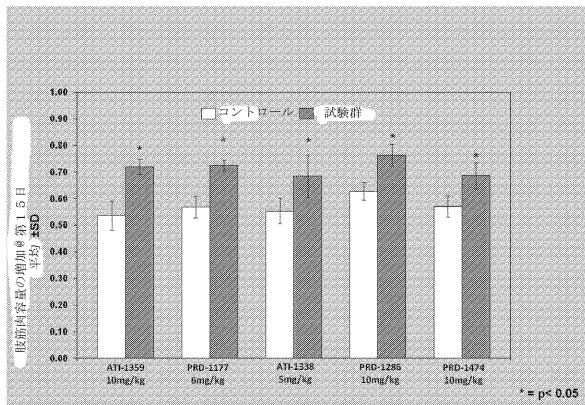


Fig. 15

【 図 1 6 】

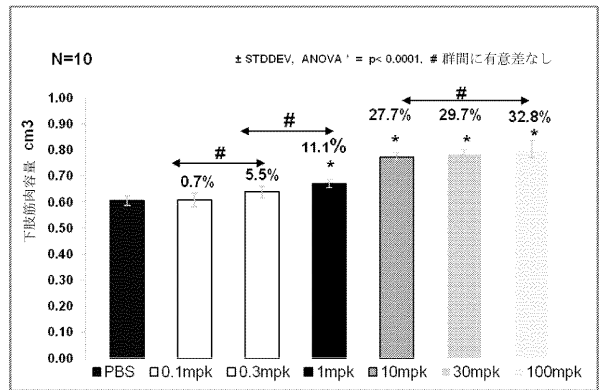


Fig. 16

【配列表】

2015530390000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/059458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/130354 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; CAMPHAUSEN RAY [US]; CLOAD SHARON T [US]) 20 October 2011 (2011-10-20) the whole document -----	1-20
Y	WO 2012/088006 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; BUSH ALEX [US]; DASGUPTA RUCHIRA [US]; E) 28 June 2012 (2012-06-28) the whole document ----- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 November 2013		13/12/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Young, Craig

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/059458

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EMANUEL STUART L ET AL: "A fibronectin scaffold approach to bispecific inhibitors of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor-I receptor", MABS, vol. 3, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 38-48, XP002716931, ISSN: 1942-0862 the whole document	1-20
Y	WO 01/64942 A1 (PHYLOS INC [US]; LIPOVSEK DASA [US]; WAGNER RICHARD W [US]; KUIMELIS R) 7 September 2001 (2001-09-07) the whole document	1-20
Y	LIPOVSEK D: "Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics", PROTEIN ENGINEERING DESIGN & SELECTION, vol. 24, no. 1-2, Sp. Iss. SI, January 2011 (2011-01), pages 3-9, XP002716999, ISSN: 1741-0126 the whole document	1-20
Y	WO 2010/070094 A1 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ASHMAN CLAIRE [GB]; BEATON ANDREW [GB]; ELLIS JO) 24 June 2010 (2010-06-24) the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/059458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011130354 A1	20-10-2011	AR 081454 A1	05-09-2012
		AU 2011240650 A1	29-11-2012
		CA 2796338 A1	20-10-2011
		CN 103068843 A	24-04-2013
		EA 201270761 A1	29-03-2013
		EP 2558491 A1	20-02-2013
		JP 2013531613 A	08-08-2013
		KR 20130056871 A	30-05-2013
		MA 34209 B1	02-05-2013
		PE 02382013 A1	11-03-2013
		SG 184220 A1	29-11-2012
		TW 201141508 A	01-12-2011
		US 2012094909 A1	19-04-2012
		US 2013210703 A1	15-08-2013
		UY 33331 A	31-10-2011
		WO 2011130354 A1	20-10-2011
		WO 2012088006 A1	28-06-2012
EP 2655411 A1	30-10-2013		
US 2013288372 A1	31-10-2013		
WO 2012088006 A1	28-06-2012		
WO 0164942 A1	07-09-2001	AT 346160 T	15-12-2006
		AU 4185001 A	12-09-2001
		AU 2001241850 B2	07-09-2006
		CA 2400058 A1	07-09-2001
		DE 60124678 T2	13-09-2007
		DK 1266025 T3	19-03-2007
		EP 1266025 A1	18-12-2002
		ES 2276770 T3	01-07-2007
		JP 4829457 B2	07-12-2011
		JP 2003525487 A	26-08-2003
		PT 1266025 E	28-02-2007
		US 6818418 B1	16-11-2004
		US 2005255548 A1	17-11-2005
		WO 0164942 A1	07-09-2001
WO 2010070094 A1	24-06-2010	AR 074777 A1	09-02-2011
		AU 2009329533 A1	30-06-2011
		CA 2747062 A1	24-06-2010
		CN 102325793 A	18-01-2012
		CO 6400149 A2	15-03-2012
		CR 20110358 A	04-10-2011
		DO P2011000189 A	31-07-2011
		EA 201190018 A1	28-02-2013
		EP 2358753 A1	24-08-2011
		JP 2012512641 A	07-06-2012
		KR 20110103431 A	20-09-2011
		MA 32980 B1	02-01-2012
		NZ 593297 A	26-10-2012
		PE 04292012 A1	08-05-2012
		SG 172039 A1	28-07-2011
		TW 201029662 A	16-08-2010
		US 2011256132 A1	20-10-2011
		UY 32341 A	30-07-2010
		WO 2010070094 A1	24-06-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1 4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	G
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/566	

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

- (72) 発明者 シャロン・クロード
アメリカ合衆国 0 2 4 5 3 マサチューセッツ州ウォルサム、ビーバー・ストリート 1 0 0 番
- (72) 発明者 リンダ・エンゲル
アメリカ合衆国 0 1 7 0 1 マサチューセッツ州フラミンガム、ランディ・ロード 1 9 番
- (72) 発明者 ダーサ・リポブセク
アメリカ合衆国 0 2 4 5 3 マサチューセッツ州ウォルサム、ビーバー・ストリート 1 0 0 番
- (72) 発明者 マラビ・マディレディ
アメリカ合衆国 0 8 5 3 4 ニュージャージー州ペニントン、ペニントン - ロッキー・ヒル・ロード 3 1 1 番
- (72) 発明者 ジンジャー・チャオ・レイクストロー
アメリカ合衆国 0 2 1 4 4 マサチューセッツ州サマービル、ホール・アベニュー 6 5 番
- (72) 発明者 ジョアンナ・スウェイン
アメリカ合衆国 0 2 4 5 3 マサチューセッツ州ウォルサム、ビーバー・ストリート 1 0 0 番
- (72) 発明者 ウェンジュン・ジャオ
アメリカ合衆国 0 8 5 3 4 ニュージャージー州ペニントン、ペニントン - ロッキー・ヒル・ロード 3 1 1 番

- (72)発明者 ホイ・ウェイ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・
ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 アーロン・ピー・ヤムニウク
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・
ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ヴィドヤシャンカール・ラマムルティ
インド 5 6 0 1 0 0 バンガロール、エレクトロニック・シティ、ニーラドリ・ロード、コンコード
・シリコン・パレー、ゼット 1 7、シンジーン・インターナショナル・リミテッド
- (72)発明者 アレグザンダー・ティ・コジッチ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・
ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 マーティン・ジェイ・コーベット
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・
ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 スタンリー・リチャード・クライステック・ジュニア
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・
ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA06 EA04 GA11
4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01 AC14 BC01 CA24 CA44
4C076 DD68 EE23 EE41 EE59 FF02
4C084 AA01 AA02 AA03 AA07 NA14 ZA362 ZA592 ZA702 ZA812 ZA942
ZA962 ZA972 ZB152 ZB262 ZB332 ZC332 ZC352
4C085 AA21 CC22 EE01 GG01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	基于纤连蛋白的支架结构域蛋白，结合肌肉生长抑制素		
公开(公告)号	JP2015530390A	公开(公告)日	2015-10-15
申请号	JP2015532042	申请日	2013-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	シャロンクロード リンダエンゲル ダーサリポブセク マラビマディレディ ジンジャーチャオレイクストロー ジョアンナスウエイン ウエンジュンジャオ ホイウエイ アーロンピーヤムニウク ヴイドヤシャンカールラマムルティ アレグザンダーティコジッチ マーティンジエイコーベット スタンリーリチャードクライステックジュニア		
发明人	シャロン・クロード リンダ・エンゲル ダーサリポブセク マラビ・マディレディ ジンジャー・チャオ・レイクストロー ジョアンナ・スウエイン ウエンジュン・ジャオ ホイ・ウエイ アーロン・ピーヤムニウク ヴイドヤシャンカール・ラマムルティ アレグザンダーティ・コジッチ マーティンジエイコーベット スタンリー・リチャード・クライステック・ジュニア		
IPC分类号	C07K14/78 C12N15/09 C12N11/19 C12N1/21 C12N1/15 C12N5/10 A61K38/00 A61K47/48 A61K39/395 A61K47/42 A61P21/00 A61P3/10 A61P3/06 A61P21/02 A61P11/00 A61P9/10 A61P35/00 A61P31/18 A61P13/12 A61P29/00 A61P19/00 A61P3/04 A61P19/02 A61P19/10 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K38/17 A61K38/1709 A61K38/39 A61K45/06 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/50 A61P7/12 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/02 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61K47/60 C07K14/78 A61K47/642 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/79 C07K16/18 C07K16/46 C07K23/19/30 C07K23/19/31 G01N33/74		
FI分类号	C07K14/78.ZNA C12N15/00.A C12N11/19 C12N1/21 C12N1/15 C12N5/00.101 A61K37/02 A61K47/48 A61K39/395.L A61K39/395.G A61K47/42 A61P21/00 A61P3/10 A61P3/06 A61P21/02 A61P11/00 A61P9/10 A61P35/00 A61P31/18 A61P13/12 A61P29/00.101 A61P19/00 A61P3/04 A61P19/02 A61P19 /10 G01N33/53.D G01N33/566		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BC01 4B065 /CA24 4B065/CA44 4C076/DD68 4C076/EE23 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA592 4C084/ZA702 4C084		

/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C085/AA21 4C085/CC22 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26

代理人(译) 田中，三夫
山崎 宏
富田健二

優先権 61/780005 2013-03-13 US
61/700697 2012-09-13 US

其他公开文献 JP6346895B2
JP2015530390A5

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及结合肌肉生长抑制素的基于纤连蛋白的支架结构域蛋白。本发明涉及用于治疗肌营养不良，恶病质，骨骼肌减少，骨关节炎，骨质疏松症，糖尿病，肥胖症，COPD，慢性肾病，心力衰竭，心肌梗塞和纤维化的治疗应用。它还涉及蛋白质的使用。本发明进一步涉及包含蛋白质，编码蛋白质或其片段的多核苷酸和包含编码蛋白质的多核苷酸的载体的细胞。

(21) 出願番号	特願2015-532042 (P2015-532042)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成25年9月12日 (2013. 9. 12)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月16日 (2015. 4. 16)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/059458		BRISTOL-MYERS SQUIB
(87) 国際公開番号	W02014/043844		B COMPANY
(87) 国際公開日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)		アメリカ合衆国08543ニュージャージ
(31) 優先権主張番号	61/780, 005		ー州プリンストン、ルート206アンド・
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)		プロビンス・ライン・ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	61/700, 697		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成24年9月13日 (2012. 9. 13)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く