

(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2013-537425

(P2013-537425A)

(43) 公表日 平成25年10月3日(2013.10.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 16/24 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/24 Z N A	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-524918 (P2013-524918)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月15日 (2011. 8. 15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月28日 (2013. 3. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/047806  
 (87) 国際公開番号 W02012/024242  
 (87) 国際公開日 平成24年2月23日 (2012. 2. 23)  
 (31) 優先権主張番号 61/374, 095  
 (32) 優先日 平成22年8月16日 (2010. 8. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500049716  
 アムジエン・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 シーエー 91320,  
 サウザンド オークス, ワン アムジエン  
 センター ドライブ  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミオスタチンに結合するポリペプチド、組成物および方法

## (57) 【要約】

選択的ミオスタチンアンタゴニスト(抗体を含む)、それらをコードする核酸、ならびにそれらを作製および使用する方法を開示する。21~31位および50~60位付近の立体構造エピトープを認識する中和抗体を開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

少なくとも1本の軽鎖と少なくとも1本の重鎖とを含む、単離されたミオスタチン特異的抗体であって、

該軽鎖が、定常領域と、3つの相補性決定領域(CDR)を含む可変領域とを含み、かつ該重鎖が、定常領域と、3つのCDRを含む可変領域とを含み、

軽鎖CDRは配列番号10に開示されたものであり、かつ重鎖CDRは配列番号20に開示されたものである、

前記単離されたミオスタチン特異的抗体。

## 【請求項2】

軽鎖CDRが、

- a) 配列番号1に開示される軽鎖CDR；
- b) 配列番号2に開示される軽鎖CDR；
- c) 配列番号3に開示される軽鎖CDR；
- d) 配列番号4に開示される軽鎖CDR；
- e) 配列番号5に開示される軽鎖CDR；
- f) 配列番号6に開示される軽鎖CDR；
- g) 配列番号7に開示される軽鎖CDR；
- h) 配列番号8に開示される軽鎖CDR；および

i) 配列番号9に開示される軽鎖CDR；

からなる群より選択され、かつ重鎖CDRが、

- a') 配列番号11に開示される重鎖CDR；
- b') 配列番号12に開示される重鎖CDR；
- c') 配列番号13に開示される重鎖CDR；
- d') 配列番号14に開示される重鎖CDR；
- e') 配列番号15に開示される重鎖CDR；
- f') 配列番号16に開示される重鎖CDR；
- g') 配列番号17に開示される重鎖CDR；
- h') 配列番号18に開示される重鎖CDR；および
- i') 配列番号19に開示される重鎖CDR；

からなる群より選択される、請求項1記載の抗体。

## 【請求項3】

軽鎖可変領域が、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含み、かつ重鎖可変領域が、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の抗体。

## 【請求項4】

軽鎖可変領域が、

- a) 配列番号1に開示される軽鎖可変領域；
  - b) 配列番号2に開示される軽鎖可変領域；
  - c) 配列番号3に開示される軽鎖可変領域；
  - d) 配列番号4に開示される軽鎖可変領域；
  - e) 配列番号5に開示される軽鎖可変領域；
  - f) 配列番号6に開示される軽鎖可変領域；
  - g) 配列番号7に開示される軽鎖可変領域；
  - h) 配列番号8に開示される軽鎖可変領域；および
  - i) 配列番号9に開示される軽鎖可変領域；
- からなる群より選択され、かつ重鎖可変領域が、

- a') 配列番号11に開示される重鎖可変領域；
- b') 配列番号12に開示される重鎖可変領域；
- c') 配列番号13に開示される重鎖可変領域；
- d') 配列番号14に開示される重鎖可変領域；

10

20

30

40

50

- e') 配列番号15に開示される重鎖可変領域；  
 f') 配列番号16に開示される重鎖可変領域；  
 g') 配列番号17に開示される重鎖可変領域；  
 h') 配列番号18に開示される重鎖可変領域；および  
 i') 配列番号19に開示される重鎖可変領域；  
 からなる群より選択される、請求項3記載の抗体。

【請求項5】

100pM未満の $K_d$ でミオスタチンに結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体。

【請求項6】

10nMを超える $K_d$ でGDF-11に結合する、請求項5記載の単離されたミオスタチン特異的抗体。 10

【請求項7】

GDF-11に対する親和性よりも少なくとも5,000倍高い親和性でミオスタチンに結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体。

【請求項8】

GDF-11に対するよりもミオスタチンに対して少なくとも5,000倍高い選択性を示す、単離されたミオスタチン特異的抗体。

【請求項9】

ミオスタチンに結合し、かつミオスタチンとALK4との相互作用をブロックする、単離されたミオスタチン特異的抗体。 20

【請求項10】

ミオスタチンに結合しかつミオスタチンとALK4との相互作用をブロックするが、ミオスタチン/ActRIIA複合体および/またはミオスタチン/ActRIIB複合体と共結合する、請求項9記載の単離されたミオスタチン特異的抗体。

【請求項11】

ミオスタチンに結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体であって、  
 該ミオスタチン特異的抗体とミオスタチンとの結合に必要とされるミオスタチンにおける2つの領域が、成熟ミオスタチン(配列番号25)の21~31位および50~60位付近の配列に位置する、  
 前記単離されたミオスタチン特異的抗体。 30

【請求項12】

成熟ミオスタチンの21~31位および50~60位付近の配列に位置するミオスタチンの2つの領域内におけるペプチド結合のキモトリプシン切断を阻止するように、これらの領域と相互作用する、単離されたミオスタチン特異的抗体。

【請求項13】

軽鎖定常領域が および 軽鎖からなる群より選択され、かつ重鎖定常領域が  $\mu$ 、  
 、 および 定常領域からなる群より選択される、請求項1~12のいずれか一項記載の抗体。

【請求項14】

IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる群より選択されるサブクラスに属する、請求項13記載の抗体。 40

【請求項15】

請求項1~14のいずれか一項記載のミオスタチン特異的アンタゴニストをコードする、単離された核酸。

【請求項16】

請求項15記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項17】

請求項16記載のベクターをトランスフェクトされた、または該ベクターで形質転換された、単離された宿主細胞。

【請求項18】

請求項17記載の宿主細胞を発現促進条件下で培養する段階と、培養培地からミオスタチン特異的アンタゴニストを回収する段階とを含む、ミオスタチン特異的アンタゴニストの産生のための方法。

【請求項19】

請求項1～16のいずれか一項記載のミオスタチン特異的アンタゴニストと、生理学的に許容される希釈剤、賦形剤または担体とを含む、組成物。

【請求項20】

ミオスタチンの少なくとも1つの活性が部分的にまたは完全に阻害されるように、請求項19記載の組成物を個体に投与する段階を含む、ミオスタチンの少なくとも1つの活性を阻害する方法。

10

【請求項21】

前記個体が、性腺機能低下症(アンドロゲン除去療法に起因する性腺機能低下症、および生殖腺機能の加齢に伴う低下に起因する性腺機能低下症を含む)；悪液質；心臓悪液質；腎臓悪液質；心臓萎縮；心臓發育不全(hypotrophy)；心不全；サルコペニア；外傷性骨折；骨粗鬆症性骨折；骨量の減少(例えば、骨粗鬆症または骨減少症)；アジソン病；筋萎縮性側索硬化症または運動ニューロン疾患(ALS；MND；ルー・ゲーリグ病)；ベル麻痺(および/または顔面神経の問題)；ボツリヌス中毒；脳性麻痺；シャルコー・マリー・トゥース病および他の末梢神経障害；クッシング症候群；糖尿病性神経障害；ギラン・バレー症候群；多発性硬化症；筋萎縮(進行性および脊髄性筋萎縮を含む)；筋ジストロフィー(ベッカー型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮、ブラウン・ヴィアレット・ヴァン ラーレ(Brown-Vialetto-Van Laere)(BVVL)症候群、ファチオ・ロンデ(Fazio-Londe)(FL)症候群、ならびに進行性の骨格筋筋力低下、筋タンパク質の欠陥、および筋細胞および組織の死によって特徴づけられる他の症候群を含む)；重症筋無力症；灰白髄炎；多発性筋炎；筋肉、腱および/または靭帯の捻挫および挫傷；脳卒中(および筋肉の消耗をもたらす他の状態、例えば長期の無活動または床上安静、手足の固定化[例えば、ギプス包帯固定および/または副子固定]および宇宙飛行)；ならびに成長ホルモン、インスリン成長因子-1(IGF-1)、成長ホルモン分泌促進因子、および成長ホルモン-IGF-1軸に関連する他の物質により処置可能な状態；からなる群より選択される状態を患っている、請求項20記載の方法。

20

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み入れられる2010年8月16日出願の米国特許仮出願第61/374,095号の米国特許法第119条の下での恩典を主張するものである。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般的にはミオスタチンならびにそれに結合するタンパク質に関する。特に、本発明はミオスタチン阻害物質とその使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

増殖/分化因子8(GDF-8)は、別名ミオスタチンとも呼ばれており、発生中および成体の骨格筋組織の細胞で大部分発現されるTGF-ファミリーのメンバーである。ミオスタチンは骨格筋増殖を負に制御する上で不可欠な役割を果たしているようである(McPherron et al. Nature (London) 387, 83-90 (1997)(非特許文献1))。ミオスタチン遺伝子の突然変異は、ウシ、ブタ、イヌおよびヒトを含めて、さまざまな種で実証されており、筋肉組織の増加をもたらしてきた(Kocamis and Killefer, Domestic Animal Endocrinology 23:44

50

7; 2002(非特許文献2))。また、ミオスタチンをアンタゴナイズすると、動物における除脂肪筋肉量が増加することが示されている(McFerron et al, 前掲; Zimmers et al, Science 296:1486 (2002)(非特許文献3))。

【0004】

ミオスタチンアンタゴニストはヒトの臨床試験でも評価されている。MYO-29と呼ばれるヒト抗体がさまざまな型の筋ジストロフィーの患者において評価された。このミオスタチンアンタゴニストを用いた早期の臨床試験結果は、良好な安全性と忍容性を実証したものの、筋力または筋機能の改善を示さなかった(しかし、この研究は、有効性を実証するために規模を拡大して行うことはなかった); 筋肉サイズの増加傾向が限られた数の対象において認められた(Wagner et al. Ann. Neurol. 63:561; 2008(非特許文献4))。その後の報告では、処置を受けた患者の全体的な定量的筋力測定は改善しなかったが、数人の患者は単一筋線維の収縮特性の改善を示した(Krivickas et al. Muscle Nerv. 39:3; 2009(非特許文献5))。

10

【0005】

ミオスタチン経路の調節は、潜在的ミオスタチン複合体の成熟ミオスタチンへのプロセッシングを必要とすると考えられる。潜在的複合体は、成熟C末端二量体と非共有結合で会合されている、切断されるプロペプチドドメインから形成されており、生物学的に不活性である。組織特異的因子が不活性な複合体を生物学的に活性な形態に変換するのに関与していると考えられる。ミオスタチンはまた、フォリスタチン関連遺伝子(FLRG)および増殖・分化関連因子関連の血清タンパク質-1(GASP-1)と複合体を形成し、両方の複合体とも血清中において同定されている。

20

【0006】

成熟ミオスタチンはアクチピンIIB型受容体(ActRIIB)に高い親和性で、かつアクチピン受容体(ActRIIA)に低い親和性で結合する。細胞内シグナル伝達は、ActRIIBへの二量体ミオスタチンの結合と、その後の低親和性I型受容体であるアクチピン様キナーゼ4(ALK4)またはアクチピン様キナーゼ5(ALK5)のいずれかの動員によって開始される。I型受容体のリン酸化は、ミオスタチンの生物学的効果に関与する細胞内シグナル伝達経路の開始をもたらす。

【0007】

ミオスタチンアンタゴニストのインビボでの有用性は、ミオスタチン経路の調節とシグナル伝達の本質によってだけでなく、増殖・分化因子11(GDF-11; 骨形成タンパク質11またはBMP-11の別名でも知られる)に対するミオスタチンの高度の類似性によっても複雑化されている(増殖・分化因子11は活性ドメインにおいて、アミノ酸レベルで、ミオスタチンと90%同一である)。シグナル伝達機構における高度の配列同一性および類似性は、ミオスタチンとGDF-11が特定の機能を共有していることを示唆するが、これら2つのTGF-ファミリーメンバーの標的化された遺伝子破壊は非常に異なる結果を示す。ミオスタチンノックアウトマウスは筋線維の過形成および肥大を示し、GDF-11ノックアウトマウスは多くの異常を伴って生後まもなく死亡する; デュアルノックアウト動物はシングルノックアウトマウスには見られない追加的な異常を示す(McPherron et al., BMC Dev Biol. 9:24; 2009(非特許文献6))。

30

40

【0008】

したがって、当技術分野には、ミオスタチン経路と関連経路を阻害することの有害作用を排除するかまたは最小限に抑えながら、ミオスタチンに結合してその活性をアンタゴナイズする物質のさらなる必要性が存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】McPherron et al. Nature (London) 387, 83-90 (1997)

【非特許文献2】Kocamis and Killefer, Domestic Animal Endocrinology 23:447; 2002

【非特許文献3】Zimmers et al, Science 296:1486 (2002)

50

【非特許文献4】Wagner et al. Ann. Neurol. 63:561; 2008

【非特許文献5】Krivickas et al. Muscle Nerv. 39:3; 2009

【非特許文献6】McPherron et al., BMC Dev Biol. 9:24; 2009

【発明の概要】

【0010】

本発明は、100pM未満の $K_d$ でミオスタチンに結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体を提供する。一態様において、本発明は、100pM未満の $K_d$ でミオスタチンに結合しかつ10nMを超える $K_d$ でGDF-11に結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体を提供する。別の態様において、本発明は、GDF-11に対する親和性よりも少なくとも5,000倍高い親和性でミオスタチンに結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体を提供する。さらなる態様において、本発明は、GDF-11に対するよりもミオスタチンに対して少なくとも5,000倍高い選択性を示す、単離されたミオスタチン特異的抗体を提供する。

10

【0011】

本発明の一局面においては、ミオスタチンに結合しかつミオスタチンとALK4との相互作用をブロックする、単離されたミオスタチン特異的抗体が提供される。別の局面においては、ミオスタチンに結合しかつミオスタチンとALK4との相互作用をブロックするが、ミオスタチン/ActRIIA複合体および/またはミオスタチン/ActRIIB複合体と共結合する、単離されたミオスタチン特異的抗体が提供される。

【0012】

本発明の別の局面においては、ミオスタチンに結合する単離されたミオスタチン特異的抗体であって、ミオスタチン特異的アンタゴニストへのミオスタチンの結合に必要とされるミオスタチンにおける2つの領域が成熟ミオスタチン(配列番号25)の21~31位および50~60位付近の配列に位置する、該抗体が提供される。また、成熟ミオスタチンの21~31位および50~60位付近の配列に位置するミオスタチンの2つの領域内におけるペプチド結合のキモトリプシン切断を阻止するように、これらの領域と相互作用する、単離されたミオスタチン特異的抗体も提供される。

20

【0013】

本発明の一態様において、ミオスタチン特異的アンタゴニストは、少なくとも1本の軽鎖と少なくとも1本の重鎖とを含む抗体であり、ここで軽鎖は、定常領域と、3つの相補性決定領域(CDR)を含む可変領域とを含み、かつ重鎖は、定常領域と、3つの相補性決定領域(CDR)を含む可変領域とを含む。この態様には、本発明の前述の態様および/または局面の1つまたは複数を組み込むことができる。特定の態様において、重鎖CDRおよび軽鎖CDRの配列は本明細書に開示したとおりである。一態様では、軽鎖CDRは配列番号10に開示されるものであり、かつ重鎖CDRは配列番号20に開示されるものである。別の態様では、軽鎖CDRが、配列番号1に開示される軽鎖CDR；配列番号2に開示される軽鎖CDR；配列番号3に開示される軽鎖CDR；配列番号4に開示される軽鎖CDR；配列番号5に開示される軽鎖CDR；配列番号6に開示される軽鎖CDR；配列番号7に開示される軽鎖CDR；配列番号8に開示される軽鎖CDR；および配列番号9に開示される軽鎖CDRからなる群より選択され、かつ重鎖CDRが、配列番号11に開示される重鎖CDR；配列番号12に開示される重鎖CDR；配列番号13に開示される重鎖CDR；配列番号14に開示される重鎖CDR；配列番号15に開示される重鎖CDR；配列番号16に開示される重鎖CDR；配列番号17に開示される重鎖CDR；配列番号18に開示される重鎖CDR；および配列番号19に開示される重鎖CDRからなる群より選択される。

30

40

【0014】

特定の態様において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列は本明細書に開示したとおりである。一態様では、軽鎖可変領域が、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含み、かつ重鎖可変領域が、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む。別の態様では、軽鎖可変領域が、配列番号1に開示される軽鎖可変領域；配列番号2に開示される軽鎖可変領域；配列番号3に開示される軽鎖可変領域；配列番号4に開示される軽鎖可変領域；配列番号5に開示される軽鎖可変領域；配列番号6に開示される軽鎖可変領域；配列番号7に開示される軽鎖可変領域；配列番号8に開示される軽鎖可変領域；および配列番号9に開示される軽

50

鎖可変領域からなる群より選択され、かつ重鎖可変領域が、配列番号11に開示される重鎖可変領域；配列番号12に開示される重鎖可変領域；配列番号13に開示される重鎖可変領域；配列番号14に開示される重鎖可変領域；配列番号15に開示される重鎖可変領域；配列番号16に開示される重鎖可変領域；配列番号17に開示される重鎖可変領域；配列番号18に開示される重鎖可変領域；および配列番号19に開示される重鎖可変領域からなる群より選択される。

【0015】

前述した抗体の変異体も提供される。一態様において、変異型抗体は、抗体の1つ、例えば抗体12A5-5に対して90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。別の態様では、変異型抗体は、(アミノ酸の置換または欠失によって) 1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸残基において前述の抗体(例えば、12A5-5)と異なっている。さらなる態様では、1個(または複数個)のアミノ酸が(例えば、環化もしくは他のアミノ酸への変換により、ならびに/または脱アミド化、異性化、糖化および/もしくは酸化により)翻訳後修飾される。

10

【0016】

本発明のさらなる局面において、抗体軽鎖定常領域は および 軽鎖からなる群より選択され、かつ重鎖定常領域は  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、および  $\epsilon$  定常領域からなる群より選択される。さらなる態様では、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる群より選択されるサブクラスに属する抗体が提供される。本発明のこれらの局面は前述の局面および態様に等しく適用されることが理解される。

20

【0017】

本発明はまた、前述のミオスタチン特異的アンタゴニストのいずれかをコードする単離された核酸、および該核酸を含むベクター、該ベクターをトランスフェクトされたまたは該ベクターで形質転換された単離された宿主細胞、および該宿主細胞を発現促進条件下で培養し、培養培地からミオスタチン特異的アンタゴニストを回収することを含む、ミオスタチン特異的アンタゴニストの産生のための方法を提供する。前述したミオスタチン特異的アンタゴニストと、生理学的に許容される希釈剤、賦形剤または担体とを含む組成物も提供され、同様に、ミオスタチンの少なくとも1つの活性が部分的にまたは完全に阻害されるように、該組成物を個体に投与することを含む、ミオスタチンの少なくとも1つの活性の阻害方法も提供される。

30

【0018】

本発明の追加的な態様において、前記個体は以下からなる群より選択される状態を患っている：性腺機能低下症(アンドロゲン除去療法に起因する性腺機能低下症、および生殖腺機能の加齢に伴う低下に起因する性腺機能低下症を含む)、悪液質；心臓悪液質、腎臓悪液質、心臓萎縮；心臓発育不全(hypotrophy)；心不全；サルコペニア；外傷性骨折；骨粗鬆症性骨折；骨量の減少(例えば、骨粗鬆症または骨減少症)；アジソン病；筋萎縮性側索硬化症または運動ニューロン疾患(ALS；MND；ルー・ゲーリグ病)；ベル麻痺(および/または顔面神経の問題)；ボツリヌス中毒；脳性麻痺；シャルコー・マリー・トゥース病および他の末梢神経障害；クッシング症候群；糖尿病性神経障害；ギラン・バレー症候群；多発性硬化症；筋萎縮(進行性および脊髄性筋萎縮を含む)；筋ジストロフィー(多くの型がある；ベッカー型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮、ブラウン・ヴィアレット・ヴァン ラーレ(Brown-Vialetto-Van Laere)(BVVL)症候群、ファチオ・ロンデ (Fazio-Londe)(FL)症候群、ならびに進行性の骨格筋筋力低下、筋タンパク質の欠陥、および筋細胞および組織の死によって特徴づけられる他の症候群を含む)；重症筋無力症；灰白髄炎；多発性筋炎；筋肉、腱および/または靭帯の捻挫および挫傷；脳卒中(および筋肉の消耗をもたらす他の状態、例えば長期の無活動または床上安静、手足の固定化[例えば、ギプス包帯固定および/または副子固定]および宇宙飛行)；ならびに成長ホルモン、インスリン成長因子-1 (IGF-1)

40

50

、成長ホルモン分泌促進因子、および成長ホルモン-IGF-1軸に関連する他の物質により処置可能な状態。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】実施例4に記載されるような、対照(PBS；白丸)と比較したときの、ミオスタチン阻害物質(抗ミオスタチン抗体12A5-5；黒ひし形)を与えられたマウスの総体重の増加を示す。

【図2】核磁気共鳴(NMR)で測定したときの4週目の除脂肪体重の変化を表す。

【図3】指定された分子内および分子間ジスルフィド結合を有する成熟型ヒトミオスタチンのアミノ酸配列を表す。ジスルフィド結合Cys15-Cys74、Cys43-Cys106、およびCys47-Cys108はシスチンノット構造を形成する。 10

【図4】シスチンノットを形成するように4つのLysC処理ペプチドと一緒に連結しているジスルフィド結合と、2つの55~78の配列をCys73と一緒に連結している別のジスルフィド結合とを示す、ペプチドGの一次構造を示す。ペプチドGは抗体への結合を示す。

【図5】シスチンノットを形成するように4つのキモトリプシン処理ペプチド(chymotryptic peptide)と一緒に連結しているジスルフィド結合と、2つの63~82の配列をCys73と一緒に連結しているジスルフィド結合とを示す、ペプチドNの一次構造を表す。ペプチドNは抗体に結合しない。

【図6】非還元およびTCEP還元ペプチドサンプルについてのBIAcore(登録商標)競合アッセイの結果を表す。ペプチドA、C、E、G、OおよびPは、すべてが抗体12A5-5に結合し、それによって成熟ミオスタチンに12A5-5が結合するのを妨げることができる。キモトリプシン処理シスチンノットペプチドの、ペプチドGおよびペプチドNのTCEP還元から得られたものを含めて、試験した他のペプチドはどれも、抗体との結合を示さなかった。 20

【図7】ミオスタチンのほかに、ペプチドA、C、EおよびGについての直接BIAcore(登録商標)競合アッセイの結果を示す。

【図8】ミオスタチン/フォリスタチン複合体(Cash et al., 後述)の共結晶構造から誘導されたミオスタチン二量体および単量体の構造を表す。ジスルフィド結合に關与するCys残基が示され、同様に12A5-5の結合にとって重要であると考えられる領域(斜線のひし形で示される)の追加のアミノ酸残基も示される。

【発明を実施するための形態】 30

【0020】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、ミオスタチンに結合し(例えば、抗ミオスタチン抗体、抗体フラグメント、および抗体誘導体)かつミオスタチンの少なくとも1つの生物学的活性を阻害する分子に関する組成物、キットもおよび方法を提供する。本明細書中で用いる用語「ミオスタチンアンタゴニスト」は「ミオスタチン阻害物質」と交換可能に使用される。本発明によるミオスタチンアンタゴニストは、ミオスタチンの少なくとも1つの活性を阻害またはブロックするか、あるいはミオスタチンまたはその受容体の発現をブロックする。ミオスタチン活性を阻害またはブロックすることは、例えば、ミオスタチンとその受容体との結合を妨げる1つまたは複数の阻害物質、および/またはミオスタチンとその受容体との結合から生じるシグナル伝達をブロックする阻害物質を用いることによって、達成することができる。アンタゴニストには、ミオスタチン自体に結合する物質、またはミオスタチン受容体に結合する物質が含まれる。例えば、ミオスタチンアンタゴニストとしては、限定するものではないが、フォリスタチン、ミオスタチンプロドメイン、増殖・分化因子11(GDF-11)プロドメイン、プロドメイン融合タンパク質、ミオスタチンに結合するアンタゴニスト抗体、アクチビンIIIB型受容体に結合するアンタゴニスト抗体または抗体フラグメント、可溶性アクチビンIIIB型受容体、可溶性アクチビンIIIB型受容体融合タンパク質、可溶性ミオスタチン類似体(可溶性リガンド)、オリゴヌクレオチド、小分子、ペプチドミメティック、およびミオスタチン結合物質が挙げられる。これらは以下で詳細に説明される。 40

【0021】 50

また、ミオスタチンに結合するポリペプチドの全部もしくは一部をコードするヌクレオチドの配列を含む核酸、ならびにその誘導体およびフラグメント、例えば、抗ミオスタチン抗体、抗体フラグメント、または抗体誘導体の全部もしくは一部をコードする核酸；該核酸を含むプラスミドおよびベクター、該核酸および/またはベクターもしくはプラスミドを含む細胞または細胞株が提供される。提供される方法には、例えば、抗ミオスタチン抗体などの、ミオスタチンに結合する分子を作製する、同定する、または単離する方法、ある分子がミオスタチンに結合するか否かを判定する方法、ある分子がミオスタチンをアンタゴナイズするか否かを判定する方法、ミオスタチンに結合する分子を含有する薬学的組成物などの組成物を作製する方法、ならびにミオスタチンに結合する分子を対象に投与するための方法、例えば、ミオスタチンにより媒介される状態を処置するための方法、およびインビボまたはインビトロでミオスタチンの生物学的活性をアンタゴナイズ(または阻害)するための方法が含まれる。ミオスタチンの1つのそのような生物学的活性はミオスタチン受容体への結合である；別のそのような活性は骨格筋増殖の負の調節である。

10

**【0022】**

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは標準的な1文字または3文字表記を用いて示される。特に断らない限り、各ポリペプチド配列は左側にアミノ末端、右側にカルボキシ末端を有する；各一本鎖核酸配列、および各二本鎖核酸配列の上側鎖は、左側に5'末端、右側に3'末端を有する。特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列はまた、それが参照配列とどのように異なるのかを説明することによって、記載することも可能である。

20

**【0023】**

本明細書中で別途定義されない限り、本発明に関連して用いられる科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈から特に必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。一般的に、本明細書に記載される細胞・組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、およびタンパク質・核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションの技術と、それらに関連して用いられる命名法は、当技術分野でよく知られた、一般に利用されるものである。

**【0024】**

本発明の方法および技術は一般的に、別途示されない限り、本明細書全体を通して引用され説明される、各種の一般的な参考文献およびより具体的な参考文献に記載されるような、当技術分野でよく知られた従来の方法に従って行われる。例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、およびAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992)、およびHarlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を参照されたい；これらは参照により本明細書に組み入れられる。酵素反応および精製技術は、当技術分野で一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように、メーカーの仕様書に従って行われる。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、および医薬品化学の実験手法および技術、ならびにそれらに関連して用いられる専門用語は、当技術分野でよく知られた、一般に利用されるものである。化学合成、化学分析、医薬品の製造、処方および送達、ならびに患者の処置では標準的な技法を用いることができる。

30

40

**【0025】**

以下の用語は、特に断らない限り、以下の意味をもつと理解されるべきである。

**【0026】**

用語「単離された分子」(ここで、該分子は例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体である)とは、その由来または供給源によって、(1)天然で会合した成分と会合していない分子(その天然の状態では該成分を随伴する)、(2)同じ種由来の他の分子を実質的に含まない分子、(3)異なる種由来の細胞によって発現される分子、または(4)ヒトの介入なしには天然に存在しない分子である。したがって、化学的に合成される、またはそ

50

れが天然で由来する細胞とは異なる細胞系で合成される分子は、その天然では会合している成分から「単離」されている。分子はまた、当技術分野で周知の精製技術を用いて単離することにより、天然では会合している成分を実質的に含まないようにすることができる。分子の純度または均一性は、当技術分野で周知の多くの手段によってアッセイすることができる。例えば、ポリペプチドサンプルの純度は、当技術分野で周知の技術を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動とポリペプチドを可視化するためのゲルの染色とを用いてアッセイされ得る。特定の目的のために、当技術分野で周知のHPLCまたは他の精製手段を用いることによって、より高い分解能を得ることが可能である。

#### 【0027】

用語「ミオスタチン阻害物質」および「ミオスタチンアンタゴニスト」は交換可能に用いられる。どちらもミオスタチンの少なくとも1つの機能を検出可能に阻害する分子である。反対に、「ミオスタチンアゴニスト」は、ミオスタチンの少なくとも1つの機能を検出可能に増加させる分子である。ミオスタチン阻害物質によって引き起こされる阻害は、それが例えばアッセイを用いるなどして検出可能であれば、完全である必要はない。ミオスタチンの機能のアッセイはどれも使用可能であり、それらの例が本明細書に提供される。ミオスタチン阻害物質によって阻害され得る(またはミオスタチンアゴニストによって増加され得る)ミオスタチンの機能の例には、ミオスタチン受容体(または該受容体を発現している細胞)への結合、および骨格筋増殖の負の調節が含まれる。ミオスタチン阻害物質およびミオスタチンアゴニストのタイプの例としては、限定するものではないが、ミオスタチン結合ポリペプチド、例えば抗原結合タンパク質(例：ミオスタチン抗原結合タンパク質)、抗体、抗体フラグメント、および抗体誘導体が挙げられる。

#### 【0028】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」はそれぞれ、ペプチド結合によって互いに結合された2個以上のアミノ酸残基を含む分子を指す。これらの用語は、例えば、天然および人工のタンパク質、タンパク質フラグメント、およびタンパク質配列のポリペプチド類似体(例えば、突然変異タンパク質、変異体、および融合タンパク質)、ならびに翻訳後修飾された、または別の方法で共有結合もしくは非共有結合により改変されたタンパク質を包含する。ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は単量体または多量体であり得る。

#### 【0029】

本明細書中で用いる用語「ポリペプチドフラグメント」とは、対応する全長タンパク質に比べて、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失を有するポリペプチドを指す。フラグメントは、例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、50、70、80、90、100、150または200アミノ酸長であり得る。フラグメントはまた、例えば、多くても1,000、750、500、250、200、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、14、13、12、11、または10アミノ酸長であり得る。フラグメントはさらに、その末端のいずれか一方または両方に、1個または複数個の追加のアミノ酸、例えば、天然に存在する異なるタンパク質由来のアミノ酸の配列(例：Fcまたはロイシンジッパードメイン)または人工のアミノ酸配列(例：人工リンカー配列またはタグタンパク質)を含むことができる。

#### 【0030】

本発明のポリペプチドには、何らかの方法で何らかの理由のために改変されたポリペプチドが含まれ、例えば、(1)タンパク質分解に対する感受性を低減させる、(2)酸化に対する感受性を低減させる、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる、(4)結合親和性を変化させる、および(4)他の物理化学的もしくは機能的特性を付与または変更する、ために改変されたポリペプチドが含まれる。類似体には、ポリペプチドの突然変異タンパク質が含まれる。例えば、単一または複数のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換)を、天然に存在する配列において(例えば、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチド部分において)行うことができる。コンセンサス配列が、置換のためのアミノ酸残基を選択するために使用され得る；当業者であれば、追加のアミノ酸残基

10

20

30

40

50

も置換され得ることを認識している。

【0031】

「保存的アミノ酸置換」は、親配列の構造的特徴を実質的に変化させないものである(例えば、交換用アミノ酸は、親配列に生じるヘリックスを壊したり、親配列を特徴づけるまたはその機能のために必要とされる他のタイプの二次構造を破壊したりする傾向があつてはならない)。当技術分野で認識されているポリペプチドの二次および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton編, W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze編, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); およびThornton et al. Nature 354:105 (1991)に記載されており、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0032】

本発明はまた、ミオスタチン結合ポリペプチドの非ペプチド類似体をも提供する。非ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの特性に類似する特性をもつ薬物として製薬業界で一般に使用されている。これらのタイプの非ペプチド化合物は「ペプチド模倣体」または「ペプチドミメティック」と呼ばれており、例えば、Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); およびEvans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)を参照されたい; これらは参照により本明細書に組み入れられる。治療に有用なペプチドに構造上類似するペプチド模倣体を用いて、同等の治療または予防効果を生み出すことができる。一般的に、ペプチドミメティックは、ヒト抗体などのパラダイムポリペプチド(すなわち、所望の生化学的特性または薬理活性をもつポリペプチド)に構造上類似しているが、当技術分野で周知の方法によって、 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (シスおよびトランス)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、および $-\text{CH}_2\text{SO}-$ からなる群より選択されるリンケージで任意に置き換えられた、1つまたは複数のペプチドリンケージを有する。コンセンサス配列の1個または複数個のアミノ酸の、同じ種類のD-アミノ酸による系統的な置換(例えば、L-リシンの代わりにD-リシン)を用いて、より安定したペプチドを生成することも可能である。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列変異を含む拘束性ペプチド(constrained peptide)は、当技術分野で公知の方法(Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992); 参照により本明細書に組み入れられる)によって、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を追加することによって、生成することができる。

20

30

【0033】

ポリペプチド(例えば、抗体)の「変異体」は、別のポリペプチド配列に比べて、1個または複数個のアミノ酸残基がアミノ酸配列中に挿入されている、アミノ酸配列から欠失されているおよび/または置換されている、そうしたアミノ酸配列を含む。本発明の変異体には融合タンパク質が含まれる。

【0034】

ポリペプチドの「誘導体」は、例えば、別の化学成分(例えば、ポリエチレングリコールまたはヒト血清アルブミンなどのアルブミン)へのコンジュゲーション、リン酸化および/またはグリコシル化によって、化学的に改変されているポリペプチド(例えば、抗体)である。特に断らない限り、用語「抗体」には、2本の全長重鎖と2本の全長軽鎖を含む抗体のほかに、その誘導体、変異体、フラグメント、および突然変異タンパク質が含まれ、それらの例については以下で説明する。

40

【0035】

「抗原結合タンパク質」は、抗原に結合する部分を含み、必要に応じて、抗原結合タンパク質が抗原への該抗原結合タンパク質の結合を促進する立体構造をとることを可能にする足場またはフレームワーク部分を含む、タンパク質のことである。抗原結合タンパク質の例には、抗体、抗体フラグメント(例えば、抗体の抗原結合部分)、抗体誘導体、および抗体類似体が含まれる。抗原結合タンパク質は、例えば、CDRまたはCDR誘導体をグラフト化した代替タンパク質足場または人工足場を含むことができる。そのような足場には、限定するものではないが、例えば抗原結合タンパク質の三次元構造を安定化するために導入

50

された変異を含む抗体由来の足場、および、例えば生体適合性ポリマーで構成される、完全に合成の足場が含まれる。例えば、Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654を参照されたい。さらに、ペプチド抗体ミメティック(「PAM」)は、足場としてフィブロネクチン成分を利用する抗体ミメティックに基づく足場としても使用され得る。

#### 【0036】

抗原結合タンパク質は、例えば、天然に存在する免疫グロブリンの構造をもつことができる。「免疫グロブリン」は四量体の分子である。天然に存在する免疫グロブリンでは、各四量体は2つの同一のポリペプチド鎖の対で構成されており、各対は1本の「軽鎖」(約25kDa)と1本の「重鎖」(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主に関与する約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は または軽鎖に分類される。重鎖は  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、または  $\epsilon$  に分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして抗体のアイソタイプを規定する；IgG抗体はヒトでは4つのサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4)にさらに分けることができる。軽鎖および重鎖内で、可変領域と定常領域は約12個またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域をも含む。一般的には、Fundamental Immunology 第7章(Paul, W. 編, 第2版 Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい(すべての目的のためにその全体が参照により組み入れられる)。各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗体の結合部位を形成し、その結果としてインタクトな免疫グロブリンは2つの結合部位をもつことになる。

#### 【0037】

天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域は、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって連結された、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)である同じ一般的構造を示す。N末端からC末端に向かって、軽鎖と重鎖は両方ともドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991中のKabatらの定義に従うものである。免疫グロブリン鎖のアミノ酸のための他のナンバリングシステムとしては、IMGT(登録商標)(国際ImMunoGeneTics情報システム；Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 29:185-203; 2005)およびAHO(Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657-670; 2001)が挙げられる。

#### 【0038】

抗体は、多様な抗原特異性を有する免疫グロブリン類を含む血清または血漿などの供給源から取得することができる。そうした抗体をアフィニティ精製にかけると、それらを特定の抗原特異性について濃縮することができる。そのような抗体の濃縮調製物は、通常、特定の抗原に対する特異的結合活性を有する約10%未満の抗体で構成される。これらの調製物を数ラウンドのアフィニティ精製にかけると、その抗原に対する特異的結合活性を有する抗体の割合を増やすことができる。このようにして調製された抗体は多くの場合「単一特異性」と呼ばれる。単一特異性抗体の調製物は、特定の抗原に対する特異的結合活性を有する約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または99.9%の抗体で構成され得る。

#### 【0039】

「抗体」とは、他に特に規定がなければ、インタクトな免疫グロブリン、または特異的結合についてインタクトな抗体と競合するその抗原結合部分を指す。抗原結合部分は、組換えDNA技術によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断によって生成させることができる。抗原結合部分としては、とりわけ、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ドメイン抗体(dAb)、および相補性決定領域(CDR)フラグメント、可変領域フラグメント、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ならびにポ

リペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分な、免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドが挙げられる。

【0040】

Fabフラグメントは $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ および $C_H1$ ドメインをもつ1価フラグメントである； $F(ab')_2$ フラグメントはヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントをもつ2価フラグメントである；Fdフラグメントは $V_H$ および $C_H1$ ドメインを有する；Fvフラグメントは抗体の単一アームの $V_L$ および $V_H$ ドメインを有する；およびdAbフラグメントは $V_H$ ドメイン、 $V_L$ ドメイン、または $V_H$ もしくは $V_L$ ドメインの抗原結合フラグメントを有する(米国特許第6,846,634号、第6,696,245号、米国特許出願公開第05/0202512号、第04/0202995号、第04/0038291号、第04/0009507号、第03/0039958号、Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)。

10

【0041】

一本鎖抗体(scFv)は、 $V_L$ および $V_H$ 領域がリンカー(例えば、アミノ酸残基の合成配列)によって連結されて、連続したタンパク質鎖を形成している抗体であり、ここで該リンカーは、タンパク質鎖をそれ自体に折り重ねて1価の抗原結合部位を形成させるのに十分な長さである(例えば、Bird et al., 1988, Science 242:423-26およびHuston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83を参照されたい)。ダイアボディは2本のポリペプチド鎖を含む2価抗体であり、ここで各ポリペプチド鎖はリンカーによって連結された $V_H$ または $V_L$ ドメインを含み、該リンカーは同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるものであり、したがって、各ドメインは別のポリペプチド鎖上の相補的なドメインと対を形成することができる(例えば、Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48、およびPoljak et al., 1994, Structure 2:1121-23を参照されたい)。ダイアボディの2本のポリペプチド鎖が同一である場合は、それらの対形成から生じるダイアボディは2つの同じ抗原結合部位をもつことになる。異なる配列を有するポリペプチド鎖を用いて、2つの異なる抗原結合部位をもつダイアボディを作製することができる。同様に、トリアボディおよびテトラボディは、同一でも異なってもよい、それぞれ3本および4本のポリペプチド鎖を含み、かつそれぞれ3つおよび4つの抗原結合部位を形成している抗体である。

20

【0042】

所定の抗体の相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)は、Kabat et al. 前掲、Lefranc et al. 前掲および/またはHonegger and Pluckthun, 前掲に記載されるシステムを用いて同定することができる。1つまたは複数のCDRを共有結合または非共有結合のいずれかで分子に組み込むことにより、その分子を抗原結合タンパク質にすることが可能である。抗原結合タンパク質は、より大きいポリペプチド鎖の一部としてCDRを組み込んでいても、別のポリペプチド鎖にCDRを共有結合で連結していても、またはCDRを非共有結合で組み込んでいてもよい。CDRは、抗原結合タンパク質が関心対象の特定の抗原に特異的に結合するのを可能にする。

30

【0043】

抗原結合タンパク質は1つまたは複数の結合部位をもつことができる。2つ以上の結合部位が存在する場合、それらの結合部位は互いに同一でも異なってもよい。例えば、天然に存在するヒト免疫グロブリンは一般的に2つの同じ結合部位をもつのに対し、「二重特異性」または「二機能性」抗体は2つの異なる結合部位をもつ。

40

【0044】

用語「ヒト抗体」には、ヒト免疫グロブリン配列に由来する1つまたは複数の可変領域および定常領域を有する全ての抗体が含まれる。一態様では、全ての可変および定常ドメインがヒト免疫グロブリン配列(完全ヒト抗体)に由来する。こうした抗体はさまざまな方法で調製することができ、それらの例は、ヒト重鎖および/または軽鎖をコードする遺伝子から誘導される抗体を発現するように遺伝的に改変されたマウスを、関心対象の抗原で免疫することによる方法を含めて、以下で説明される。

【0045】

50

ヒト化抗体は、1個または複数個のアミノ酸の置換、欠失、および/または付加によって非ヒト種由来の抗体の配列と異なる配列を有し、その結果、ヒト化抗体は、それをヒト対象に投与したとき、非ヒト種抗体に比べて、免疫応答を誘発する可能性が低く、かつ/またはそれほど深刻な免疫応答を誘発しない。一態様では、非ヒト種抗体の重鎖および/または軽鎖のフレームワークおよび定常ドメイン内の特定のアミノ酸が、ヒト化抗体を生成するように変異される。別の態様では、ヒト抗体由来の定常ドメインが非ヒト種の可変ドメインに融合される。別の態様では、非ヒト抗体の1つまたは複数のCDR配列中の1個または複数個のアミノ酸残基が、ヒト対象に投与したときに起こりそうな非ヒト抗体の免疫原性を低下させるように、変更される；その際、変更されるアミノ酸残基は、抗体のその抗原への免疫特異的結合に不可欠なものではないか、行われるアミノ酸配列に対する変化が保存的な変化であるかのいずれかであり、その結果、ヒト化抗体の抗原への結合は非ヒト抗体の抗原への結合より著しく悪化することはない。ヒト化抗体を作製する方法の例は、米国特許第6,054,297号、第5,886,152号および第5,877,293号に見いだすことができる。

#### 【0046】

用語「キメラ抗体」とは、ある1つの抗体由来の1つまたは複数の領域および1つまたは複数の他の抗体由来の1つまたは複数の領域を含む抗体を指す。一態様では、CDRの1つまたは複数がヒト抗ミオスタチン抗体に由来する。別の態様では、CDRの全部がヒト抗ミオスタチン抗体に由来する。別の態様では、2種以上のヒト抗ミオスタチン抗体由来のCDRがミックスされて、キメラ抗体に組み合わせられる。例えば、キメラ抗体は、第1のヒト抗ミオスタチン抗体の軽鎖由来のCDR1と、第2のヒト抗ミオスタチン抗体の軽鎖由来のCDR2およびCDR3と、第3の抗ミオスタチン抗体の重鎖由来のCDRを含むことができる。他の組み合わせが可能であり、本発明の態様内に包含される。

#### 【0047】

さらに、フレームワーク領域は、同じ抗ミオスタチン抗体の1つに、1種または複数種の異なる抗体(例えば、ヒト抗体)に、またはヒト化抗体に由来するものであり得る。キメラ抗体の一例では、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、該抗体に相同であるか、あるいは該抗体に由来する一方で、前記鎖の残部は、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、該抗体に相同であるか、あるいは該抗体に由来する。また、所望の生物学的活性(すなわち、ミオスタチンに特異的に結合する能力)を示す、そのような抗体のフラグメントも包含される。例えば、米国特許第4,816,567号およびMorrison, 1985, Science 229:1202-07を参照されたい。

#### 【0048】

「中和抗体」または「阻害抗体」は、過剰の抗ミオスタチン抗体が、ミオスタチンとミオスタチン受容体との相互作用の量を、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイを用いて、少なくとも約20%低下させるときの、該相互作用を阻害する抗体である。さまざまな態様において、抗原結合タンパク質はミオスタチンとミオスタチン受容体との相互作用を少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、および99.9%低下させる。

#### 【0049】

抗体のフラグメントまたは類似体は、当業者であれば、本明細書の教示に従って、当技術分野で周知の技術を用いて容易に調製することができる。フラグメントまたは類似体のアミノ末端およびカルボキシ末端は機能性ドメインの境界付近に出現する。構造ドメインおよび機能ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを公的または私的な配列データベースと比較することによって識別可能である。コンピュータ化された比較方法を用いて、構造および/または機能が知られている他のタンパク質中に存在する配列モチーフまたは推定上のタンパク質構造ドメインを識別することができる。既知の三次元構造に折りたためるタンパク質配列を同定する方法が知られている。例えば、Bowie et al., 1991, Science 253:164を参照されたい。

#### 【0050】

10

20

30

40

50

「CDRグラフト化抗体」とは、特定の種もしくはアイソタイプの抗体に由来する1つまたは複数のCDRと、同じまたは異なる種もしくはアイソタイプの別の抗体のフレームワークを含む抗体である。

【0051】

「多重特異性抗体」とは、1つまたは複数の抗原上の2つ以上のエピトープを認識する抗体である。このタイプの抗体のサブクラスは、同じまたは異なる抗原上の2つの明確に区別できるエピトープを認識する「二重特異性抗体」である。

【0052】

抗原結合タンパク質は、それが1ナノモル以下の解離定数( $K_d$ )で抗原に結合するとき、その抗原(例えば、ヒトミオスタチン)に「特異的に結合する」。抗原結合タンパク質はまた、第1の抗原に対する解離定数が第2の抗原に対する解離定数より大幅に低い場合、第2の抗原に比べて、第1の抗原に「選択的に」または「優先的に」結合することができる。「選択性」とは、抗原結合タンパク質が第2の抗原(例えば、高度に近縁性の抗原)に結合する度合いと比較したときの、その抗原結合タンパク質が特定の抗原に結合する度合いを指す。例えば、「ミオスタチン特異的アンタゴニスト」は、1ナノモル以下の $K_d$ でミオスタチンに結合し、かつ10nM以上の $K_d$ でGDF-11に結合するものである。したがって、GDF-11に対比して、ミオスタチンに対するミオスタチンアンタゴニストの選択性は10倍またはそれを上回るものであり得る。

【0053】

「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」、または「抗原結合部位」は、抗原と相互作用して、その抗原に対する抗原結合タンパク質の特異性および親和性に寄与する、アミノ酸残基(または他の構成成分)を含む抗原結合タンパク質の部分である。抗原に特異的に結合する抗体では、それはそのCDRドメインの少なくとも1つの少なくとも一部を含む。

【0054】

「エピトープ」とは、抗原結合タンパク質(例えば、抗体)によって結合される(またはそれと相互作用する)分子の部分である。エピトープはその分子の不連続な部分で構成されてもよい(例えば、ポリペプチドでは、ポリペプチドの一次配列において連続していないが、ポリペプチドの三次および四次構造の状況では、抗原結合タンパク質によって結合されるまたはそれと相互作用するのに十分互いに接近している、アミノ酸残基で構成され得る)。

【0055】

2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の「同一性パーセント」は、デフォルトパラメータを使用するGAPコンピュータプログラム(GCG Wisconsinパッケージの一部、バージョン10.3(Accelrys社, San Diego, CA))を用いてこれらの配列を比較することによって決定される。

【0056】

用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は全体を通して交換可能に用いられ、DNA分子(例:cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例:mRNA)、ヌクレオチド類似体を用いて生成されたDNAまたはRNAの類似体(例:ペプチド核酸および非天然ヌクレオチド類似体)、およびそれらのハイブリッドを包含する。核酸分子は一本鎖であってもまたは二本鎖であってもよい。一態様では、本発明の核酸分子は、本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導體、突然変異タンパク質、もしくは変異体をコードする連続したオープンリーディングフレームを含む。

【0057】

2つの一本鎖ポリヌクレオチドは、一方のポリヌクレオチドのあらゆるヌクレオチドが、ギャップの導入なしに、かついずれの配列の5'または3'末端にも不對ヌクレオチドなしに、他方のポリヌクレオチドのその相補ヌクレオチドに向かい合うように、それらの配列を逆平行方向にアライメントすることができれば、互いの「相補体」である。2つのポリヌクレオチドが適度にストリンジェントな条件下で相互にハイブリダイズすることができる場合、一方のポリヌクレオチドはもう一方のポリヌクレオチドに「相補的」である。し

10

20

30

40

50

たがって、あるポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドの相補体でないのに、その別のポリヌクレオチドに相補的であり得る。

【0058】

「ベクター」は、それに連結された別の核酸を細胞に導入するために用いることができる核酸である。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは追加の核酸セグメントをライゲートすることができる直鎖状または環状の二本鎖DNA分子を指す。ベクターの別のタイプはウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)であり、この種のベクターでは追加のDNAセグメントをウイルスのゲノムに導入することができる。特定のベクターはそれらが導入される宿主細胞内で自律複製することができる(例えば、細菌の複製起点を含む細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主のゲノムと一緒に複製される。「発現ベクター」は、所定のポリヌクレオチドの発現を指令することができるタイプのベクターである。

10

【0059】

ヌクレオチド配列は、調節配列がそのヌクレオチド配列の発現(例えば、発現のレベル、タイミングまたは場所)に影響を及ぼす場合には、その調節配列に「機能的に連結」されている。「調節配列」は、それが機能的に連結されている核酸の発現(例えば、発現のレベル、タイミングまたは場所)に影響を及ぼす核酸である。調節配列は、例えば、調節される核酸に直接、または1つまたは複数の他の分子(例えば、調節配列および/または核酸に結合するポリペプチド)の作用を介して、その効果を発揮することができる。調節配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント(例：ポリアデニル化シグナル)が挙げられる。調節配列のさらなる例は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CAおよびBaron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06に記載されている。

20

【0060】

「宿主細胞」は、核酸、例えば本発明の核酸、を発現させるために用いることができる細胞である。宿主細胞は原核生物、例えば大腸菌(*E. coli*)であってもよいし、あるいは真核生物、例えば、単細胞の真核生物(例：酵母または他の真菌)、植物細胞(例：タバコまたはトマト植物細胞)、動物細胞(例：ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞)、またはハイブリドーマであってもよい。宿主細胞の例としては、以下が挙げられる：サル腎細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175参照)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはそれらの誘導体、例えばVeggie CHOおよび無血清培地で増殖する関連細胞株(Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31参照)またはDHFRが欠損しているCHO DX-B11株(Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20参照)、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞株、アフリカミドリザル腎細胞株CV1(ATCC CCL 70)に由来するCV1/EBNA細胞株(McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821参照)、ヒト胚性腎細胞、例えば293、293 EBNAまたはMSR 293、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換された霊長類細胞株、通常の二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養から誘導された細胞株、一次外植片、HL-60、U937、HaKまたはJurkat細胞。一般的に、宿主細胞は、あとでその宿主細胞において発現させることができる、ポリペプチドをコードする核酸で形質転換され得るまたは該核酸をトランスフェクトされ得る培養細胞である。用語「組換え宿主細胞」は、発現される核酸で形質転換されたまたは該核酸をトランスフェクトされた宿主細胞を表すために用いることができる。宿主細胞はまた、核酸を含むが、調節配列が該核酸と機能的に連結されるように宿主細胞に導入されない限り、所望のレベルで該核酸を発現しない細胞であり得る。宿主細胞という用語は、特定の対象細胞を指すだけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的子孫をも指すことが理解される。特定の改変が、例えば突然変異または環境の影響のため、後続世代で起こる可能性があるため、そうした子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、それでも本明細書中で用い

30

40

50

るこの用語の範囲内に含まれる。

【0061】

#### 抗原結合タンパク質

一局面において、本発明は、ミオスタチン、例えばヒトミオスタチン、に結合する抗原結合タンパク質(例えば、抗体、抗体フラグメント、抗体誘導體、抗体突然変異タンパク質、および抗体変異体)を提供する。

【0062】

本発明による抗原結合タンパク質は、ミオスタチンの生物学的活性を阻害する抗原結合タンパク質を包含する。そうした生物学的活性の例には、ミオスタチン受容体へのミオスタチンの結合、およびそのようなミオスタチン受容体を発現している細胞への結合が含まれる。他の生物学的活性には、インビボでミオスタチンにより媒介されるもの、例えば骨格筋増殖の負の調節が含まれる。

10

【0063】

異なる抗原結合タンパク質は、ミオスタチンの異なるドメインもしくはエピトープに結合するか、または異なる作用機序で作用することが可能である。例としては、ミオスタチン受容体に対するミオスタチンの能力を妨げる抗原結合タンパク質またはそのサブユニットが含まれるが、これらに限定されない。抗原結合タンパク質は、本発明で使用するために、ミオスタチン誘発活性を完全に阻害する必要はない；それどころか、ミオスタチンの特定の活性を低下させる抗原結合タンパク質も同様に使用が意図される。(特定疾患の処置におけるミオスタチン結合性の抗原結合タンパク質の特定の作用機序に関する本明細書での考察は単なる例示にすぎず、本明細書に提示される方法がそれによって拘束されることはない。)

20

【0064】

本発明の範囲内の抗ミオスタチン抗体の他の誘導體には、例えば、抗ミオスタチン抗体ポリペプチドのN末端またはC末端に融合された異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質を発現させることによる、抗ミオスタチン抗体またはそのフラグメントと他のタンパク質またはポリペプチドとの共有結合または凝集コンジュゲートが含まれる。例えば、コンジュゲートされるペプチドは異種シグナル(またはリーダー)ポリペプチド、例えば酵母因子リーダー、またはエピトープタグなどのペプチドであり得る。抗原結合タンパク質含有融合タンパク質は、抗原結合タンパク質の精製または同定を容易にするために追加されたペプチド(例えば、ポリHisなどのタグタンパク質)を含むことができる。抗原結合タンパク質はまた、Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988および米国特許第5,011,912号に記載されるようなFLAG(登録商標)ペプチドに連結することもできる。FLAG(登録商標)ペプチドは高度に抗原性であって、特異的なモノクローナル抗体(mAb)と可逆的に結合するエピトープを提供し、発現された組換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。FLAG(登録商標)ペプチドが所定のポリペプチドに融合された融合タンパク質を調製するのに有用な試薬類は市販されている(Sigma-Aldrich社, St. Louis MO)。

30

【0065】

1つまたは複数の抗原結合タンパク質を含むオリゴマーは、ミオスタチンアンタゴニストとして利用することができる。オリゴマーは共有結合型または非共有結合型の二量体、三量体、またはそれ以上のオリゴマーの形態であり得る。2つ以上の抗原結合タンパク質を含むオリゴマーは使用が意図されており、一例はホモ二量体である。他のオリゴマーとしては、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ四量体、ヘテロ四量体などが挙げられる。

40

【0066】

一態様は、抗原結合タンパク質に融合されたペプチド成分間の共有結合または非共有結合相互作用を介して連結された複数の抗原結合タンパク質を含むオリゴマーに向けられる。そうしたペプチドはペプチドリンカー(スペーサー)、またはオリゴマー化を促進する性質があるペプチドであり得る。ロイシンジッパーおよび抗体由来の特定のポリペプチドは、以下で詳細に説明するように、それに結合された抗原結合タンパク質のオリゴマー化を

50

促進することができるペプチドの一部である。

【0067】

特定の態様では、オリゴマーは2~4つの抗原結合タンパク質を含む。オリゴマーの抗原結合タンパク質は、先に記載した形態のいずれかのような任意の形態、例えば変異体またはフラグメントであり得る。好ましくは、オリゴマーはミオスタチン結合活性のある抗原結合タンパク質を含む。

【0068】

一態様では、オリゴマーは免疫グロブリン由来のポリペプチドを用いて調製される。抗体由来のポリペプチドのさまざまな部分(Fcドメインを含む)に融合された特定の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の調製は、例えば、Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; およびHollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11に記載されている。

10

【0069】

本発明の一態様は、抗ミオスタチン抗体のミオスタチン結合フラグメントを抗体のFc領域に融合させることによって作製された、2つの融合タンパク質を含む二量体に向けられる。その二量体を作製するには、例えば、融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクターに挿入し、その組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞において該遺伝子融合体を発現させ、そして発現された融合タンパク質を抗体分子とほぼ同様に集合させると、鎖間ジスルフィド結合がFc成分間に形成されて、二量体をもたらす。

20

【0070】

本明細書中で用いる用語「Fcポリペプチド」には、抗体のFc領域に由来するポリペプチドの天然型および変異型が含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含むこのようなポリペプチドの切断型も含まれる。Fc部分を含む融合タンパク質(およびそれから形成されたオリゴマー)は、プロテインAまたはプロテインGカラムでアフィニティクロマトグラフィーにより容易に精製できるという利点を提供する。

【0071】

PCT出願WO 93/10151(参照により本明細書に組み入れられる)に記載される、1つの適切なFcポリペプチドは、ヒトIgG1抗体のN末端のヒンジ領域からFc領域の天然のC末端まで延びている一本鎖ポリペプチドである。別の有用なFcポリペプチドは、米国特許第5,457,035号およびBaum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001に記載されるFc突然変異タンパク質である。この突然変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaに変更されており、アミノ酸20がLeuからGluに変更されており、そしてアミノ酸22がGlyからAlaに変更されていることを除けば、WO 93/10151に提示された天然のFc配列のそれと同一である。この突然変異タンパク質はFc受容体に対して低減した親和性を示す。

30

【0072】

他の態様では、抗ミオスタチン抗体の重鎖および/または軽鎖の可変部分が、ある抗体の重鎖および/または軽鎖の可変部分に取って代わってもよい。

【0073】

あるいは、オリゴマーは、ペプチドリンカー(スペーサーペプチド)の有無にかかわらず、複数の抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質である。適切なペプチドリンカーの中には、米国特許第4,751,180号および第4,935,233号に記載されるものがある。

40

【0074】

オリゴマーの抗原結合タンパク質を調製するための別の方法は、ロイシンジッパーの使用を含む。ロイシンジッパードメインは、それらが見いだされるタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、もともとは数種のDNA結合タンパク質で同定されたものであり(Landschulz et al., 1988, Science 240:1759)、それ以来、さまざまな異なるタンパク質中に発見されている。既知のロイシンジッパーの中には、天然のペプチドおよび二量体化または三量体化しているその誘導体がある。可溶性のオリゴマータンパク質を生成するのに適したロイシンジッパードメインの例は、PCT出願WO 94/1

50

0308に記載されており、肺サーファクタントタンパク質D(SPD)由来のロイシンジッパーは、参照により本明細書に組み入れられるHoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191に記載されている。改変型ロイシンジッパー(それに融合された異種タンパク質の安定した三量体化を可能にする)の使用は、Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78に記載される。1つのアプローチでは、ロイシンジッパーペプチドに融合された抗ミオスタチン抗体フラグメントまたは誘導体を含む組換え融合タンパク質が適当な宿主細胞において発現され、そして生成された可溶性のオリゴマー抗ミオスタチン抗体フラグメントまたは誘導体が培養上清から回収される。

#### 【0075】

一局面において、本発明は、ミオスタチン受容体またはそのサブユニットへのミオスタチンの結合を妨げる抗原結合タンパク質を提供する。例えば、抗原結合タンパク質はミオスタチンとALK4との相互作用をブロックすることができるが、ActRIIBと複合体化されたミオスタチンおよび/またはActRIIAと複合体化されたミオスタチンとは共結合することができる。このような抗原結合タンパク質をミオスタチン、またはそのフラグメント、変異体もしくは誘導体に対して作製して、ミオスタチン受容体(または該受容体を発現している細胞)を妨げる能力について従来のアッセイでスクリーニングすることができる。適切なアッセイの例としては、ミオスタチン受容体を発現している細胞へのミオスタチンの結合を阻害する能力について抗原結合タンパク質を試験するアッセイ、または該受容体とミオスタチンとの相互作用から生じる生物学的応答または細胞応答を低減させる能力について抗原結合タンパク質を試験するアッセイ(すなわち、細胞ベースのアッセイ、およびインビトロ結合アッセイ、例えば本明細書の実施例に記載されるアッセイ)がある。抗原結合タンパク質を試験するさらなるアッセイには、ミオスタチンポリペプチドへの抗原結合タンパク質の結合を、ミオスタチンポリペプチドへの既知の抗原結合タンパク質の結合と定性的または定量的に比較するアッセイが含まれ、こうしたアッセイのいくつかの例が本明細書で開示される。

#### 【0076】

別の局面において、本発明は、種選択性を示す抗原結合タンパク質を提供する。一態様では、抗原結合タンパク質は1種または複数種の哺乳類ミオスタチンに結合し、例えば、ヒトミオスタチンと、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、および非ヒト霊長類ミオスタチンのうちの1種または複数種とに結合する。別の態様では、抗原結合タンパク質は1種または複数種の霊長類ミオスタチン、例えば、ヒトミオスタチンと、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、タマリンおよびチンパンジーミオスタチンのうちの1種または複数種とに結合する。別の態様では、抗原結合タンパク質はヒト、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、タマリンまたはチンパンジーミオスタチンに特異的に結合する。別の態様では、抗原結合タンパク質はマウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、および非ヒト霊長類ミオスタチンのうちの1種または複数種に結合しない。別の態様では、抗原結合タンパク質はマーモセットなどの新世界サル種には結合しない。

#### 【0077】

別の態様において、抗原結合タンパク質はミオスタチン以外の天然に存在するどのようなタンパク質に対しても特異的な結合を示さない。別の態様では、抗原結合タンパク質は哺乳類ミオスタチン以外の天然に存在するどのようなタンパク質に対しても特異的な結合を示さない。別の態様では、抗原結合タンパク質は霊長類ミオスタチン以外の天然に存在するどのようなタンパク質に対しても特異的な結合を示さない。別の態様では、抗原結合タンパク質はヒトミオスタチン以外の天然に存在するどのようなタンパク質に対しても特異的な結合を示さない。別の態様では、抗原結合タンパク質は少なくとも1種の非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル)由来のミオスタチンおよびヒトミオスタチンに特異的に結合する。別の態様では、抗原結合タンパク質は非ヒト霊長類、カニクイザル、およびヒトミオスタチンに同様の結合親和性で特異的に結合する。別の態様では、抗原結合タンパク質

10

20

30

40

50

は非ヒト霊長類、カニクイザル、およびヒトミオスタチンの活性をブロックする。別の態様では、抗原結合タンパク質は、本明細書に記載されるアッセイで、非ヒト霊長類、カニクイザル、およびヒトミオスタチンに対して同様の $IC_{50}$ または $EC_{50}$ を有する。

【0078】

ミオスタチンに対する抗原結合タンパク質の選択性は、当技術分野で周知の方法を用いて、かつ本明細書の教示に従って測定することができる。例えば、その選択性は、ウェスタンブロット、FACS、ELISA、RIAを用いて、または結合定数の測定を可能にする任意の適切な方法、例えば、Biacore(登録商標)(表面プラズモン共鳴を利用)もしくは動力学排除アッセイ(kinetic exclusion assay)のKinexA(登録商標)(例えば、Ohmura et al., Anal. Chem. 73: 3392-3399, 2001参照)によって、測定可能である。

10

【0079】

別の局面において、本発明は、以下の特性の1つまたは複数を含むミオスタチン結合性の抗原結合タンパク質(例えば、抗ミオスタチン抗体)を提供する：ヒトミオスタチンと非ヒト霊長類ミオスタチンの両方に結合する；ミオスタチン受容体へのミオスタチンの結合を阻害する；ALK4へのミオスタチンの結合を阻害する；ミオスタチン/ActRIIBと共結合する；ミオスタチン/ActRIIAと共結合する；筋肉量を負に調節するミオスタチンの能力を阻害する。

【0080】

本発明の抗原結合タンパク質の抗原結合フラグメントは従来の技術によって作製することができる。このようなフラグメントの例には、限定するものではないが、Fabおよび $F(a b')_2$ フラグメントが含まれる。遺伝子工学技術により作製される抗体フラグメントおよび誘導体も企画される。

20

【0081】

さらなる態様には、キメラ抗体、例えば、非ヒト(例：マウス)モノクローナル抗体のヒト化型が含まれる。このようなヒト化抗体は公知の技術で調製することができ、その抗体をヒトに投与するとき免疫原性の低下という利点を提供することができる。一態様では、ヒト化モノクローナル抗体はマウス抗体の可変ドメイン(またはその抗原結合部位の全部もしくは一部)とヒト抗体由来の定常ドメインとを含む。あるいは、ヒト化抗体フラグメントはマウスモノクローナル抗体の抗原結合部位とヒト抗体由来の可変ドメインフラグメント(抗原結合部位を欠く)とを含むことができる。キメラ型およびさらなる改変型モノクローナル抗体を作製するための方法としては、Riechmann et al., 1988, Nature 332:323、Liu et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439、Larrick et al., 1989, Bio/Technology 7:934、およびWinter et al., 1993, TIPS 14:139に記載される方法が含まれる。一態様では、キメラ抗体はCDRグラフト化抗体である。抗体をヒト化するための技術は、例えば、米国特許出願第10/194,975号(2003年2月27日公開)、米国特許第5,869,619号、第5,225,539号、第5,821,337号、第5,859,205号、Padlan et al., 1995, FASEB J. 9:133-39、およびTamura et al., 2000, J. Immunol. 164:1432-41に記載される。

30

【0082】

ヒトまたは部分的ヒト抗体を非ヒト動物において生成させる方法が開発されている。例えば、1つまたは複数の内因性免疫グロブリン遺伝子がさまざまな手段によって不活性化されたマウスが作製されている。不活性化されたマウス遺伝子を置き換えるために、ヒト免疫グロブリン遺伝子が該マウスに導入されている。該動物で産生された抗体は、該動物に導入されたヒト遺伝物質によりコードされるヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖を組み込んでいる。一態様では、トランスジェニックマウスなどの非ヒト動物がミオスタチンポリペプチドで免疫され、その結果として、ミオスタチンポリペプチドに対する抗体が該動物において生成される。適切な免疫原の一例は、可溶性のヒトミオスタチン、例えばミオスタチンのタンパク質分解切断部位を含むポリペプチド、または他の免疫原性ミオスタチンフラグメントである。適切な免疫原の別の例は、高レベルのミオスタチンを発現している細胞、またはそれに由来する細胞膜調製物である。

40

【0083】

50

ヒトまたは部分的ヒト抗体の産生用のトランスジェニック動物を作製して使用するための技術の例は、以下の文献に記載されている：米国特許第5,814,318号、第5,569,825号、および第5,545,806号、Davis et al., 2003, Production of human antibodies from transgenic mice, Lo編, Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, N J:191-200、Kellermann et al., 2002, Curr Opin Biotechnol. 13:593-97、Russel et al., 2000, Infect Immun. 68:1820-26、Gallo et al., 2000, Eur J Immun. 30:534-40、Davis et al., 1999, Cancer Metastasis Rev. 18:421-25、Green, 1999, J Immunol Methods. 231:11-23、Jakobovits, 1998, Adv Drug Deliv Rev 31:33-42、Green et al., 1998, J Exp Med. 188:483-95、Jakobovits A, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14、Tsuda et al., 1997, Genomics 42:413-21、Mendez et al., 1997, Nat Genet. 15:146-56、Jakobovits, 1994, Curr Biol. 4:761-63、Arbones et al., 1994, Immunity. 1:247-60、Green et al., 1994, Nat Genet. 7:13-21、Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-58、Jakobovits et al., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A. 90:2551-55、Chen, J. et al., 1993, Int Immunol 5:647-656、Choi et al., 1993, Nature Genetics 4:117-23、Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol 14:845-51、Harding et al., 1995, Ann NY Acad Sci、Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-59、Lonberg, 1994, Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies, Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101、Lonberg et al., 1995, Int Rev Immunol 13:65-93、Neuberger, 1996, Nat Biotechnol 14:826、Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20:6287-95、Taylor et al., 1994, Int Immunol 6:579-91、Tomizuka et al., 1997, Nat Gen 16:133-43、Tomizuka et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A. 97:722-27、Tuaille et al., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A. 90:3720-24、およびTuaille et al., 1994, J Immunol 152:2912-20。これらおよび他の例は、2007年5月3日に公開された米国特許出願公開第2007-0098715号にも説明されている。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 8 4 】

別の局面において、本発明はミオスタチンに結合するモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体は、当技術分野で知られた任意の技術を用いて、例えば、免疫化スケジュールの完了後にトランスジェニック動物から採取した脾細胞を不死化することによって、作製することができる。脾細胞は、当技術分野で公知の技術を用いて、例えば、ハイブリドーマを作出するためにそれらをミエローマ細胞と融合させることによって、不死化することができる。ハイブリドーマ作出融合法で使用するためのミエローマ細胞は、非抗体産生性であり、高い融合効率を有し、かつ、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの生育を支持する特定の選択培地でミエローマ細胞を生育できなくする酵素欠損を有するものである。マウスの細胞融合で使用するのに適した細胞株の例としては、Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7 およびS194/5XX0 BuIが挙げられる；ラットの細胞融合で用いられる細胞株の例としては、R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983Fおよび4B210が挙げられる。細胞融合に有用な他の細胞株はU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2およびUC729-6である。

#### 【 0 0 8 5 】

一態様において、ハイブリドーマ細胞株を作出するには、動物(例えば、ヒト免疫グロブリン配列を有するトランスジェニック動物)をミオスタチン免疫原で免疫する；免疫した動物から脾細胞を採取する；採取した脾細胞をミエローマ細胞株に融合させ、それによってハイブリドーマ細胞を作製する；ハイブリドーマ細胞からハイブリドーマ細胞株を樹立する；およびミオスタチンポリペプチドに結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定する。このようなハイブリドーマ細胞株、およびそれらによって産生された抗ミオスタチンモノクローナル抗体は、本発明に包含される。

#### 【 0 0 8 6 】

ハイブリドーマ細胞株によって分泌されたモノクローナル抗体は、当技術分野で公知の任意の技術を用いて精製することができる。ハイブリドーマまたはmAbは、ミオスタチン誘発活性をブロックする能力のような、特定の性質をもつmAbを識別するために、さらに

スクリーニングしてもよい。そのようなスクリーニングの例は下記の実施例に記載される。

【0087】

モノクローナル抗体はまた、遺伝子免疫法と呼ばれる方法を用いて産生させることも可能である。例えば、関心対象の抗原をコードする核酸をウイルスベクター(例えば、アデノウイルスベクター)に組み込む。次に、得られたベクターを用いて、適切な宿主動物(例えば、非肥満糖尿病またはNODマウス)において関心対象の抗原に対する免疫応答を発現させる。この技術は、Ritter et al., *Biodrugs* 16(1):3-10 (2002)に十分に説明されており、その開示内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0088】

抗体結合部位の中心にある相補性決定領域(CDR)の分子進化もまた、Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551に記載されるように、親和性を向上させた抗体、例えばc-erbB-2に対する親和性を向上させた抗体、を単離するために用いられている。したがって、このような技術はミオスタチンに対する抗体を作製する上で有用である。

【0089】

ミオスタチンに対する抗原結合タンパク質は、例えば、ミオスタチンポリペプチドまたはミオスタチンを発現している細胞の存在をインビトロまたはインビボで検出するアッセイで、用いることができる。抗原結合タンパク質はまた、ミオスタチンタンパク質をイムノアフィニティクロマトグラフィーで精製する際にも利用することができる。ミオスタチンとミオスタチン受容体(またはそのサブユニット)との相互作用をさらにブロックできる抗原結合タンパク質は、そのような相互作用から生じる生物学的活性を阻害するために使用することができる。ブロッキング抗原結合タンパク質は本発明の方法において使用され得る。ミオスタチンアンタゴニストとして機能する、このような抗原結合タンパク質は、サルコペニア、悪液質および筋肉消耗の状態を含むがこれらに限定されない、ミオスタチンによって誘発される状態を処置する際に利用することができる。一態様では、トランスジェニックマウスの免疫化を含む方法により作製されたヒト抗ミオスタチンモノクローナル抗体は、そうした状態の処置に用いられる。別の態様では、ヒト化抗ミオスタチンモノクローナル抗体がそうした状態の処置に利用される。

【0090】

抗原結合タンパク質は、ミオスタチンにより誘発される生物学的活性を阻害するために、インビトロ法で利用したり、またはインビボで投与したりすることができる。したがって、ミオスタチンが(直接または間接的に)引き起こすまたは悪化させる障害(それらの例が本明細書に提供される)は処置可能である。一態様では、本発明は、ミオスタチンをブロックする抗原結合タンパク質を、それを必要とする哺乳動物に、ミオスタチン誘発生物学的活性を低減させるのに有効な量でインビボ投与することを含む、治療方法を提供する。

【0091】

本発明の抗原結合タンパク質は、ミオスタチンの生物学的活性を阻害する、部分的ヒトモノクローナル抗体および完全ヒトモノクローナル抗体を含む。一態様は、ヒトミオスタチンとミオスタチン受容体(またはそのサブユニット)との相互作用を少なくとも部分的にブロックするモノクローナル抗体に向けられる。一態様では、前記抗体がトランスジェニックマウスをミオスタチン免疫原で免疫することによって作製される。別の態様では、免疫原がヒトミオスタチンポリペプチド(例えば、ミオスタチンを発現するように形質転換されたもしくはトランスフェクトされた細胞、またはミオスタチンを天然で発現する細胞)である。そのような免疫したマウスに由来するハイブリドーマ細胞株(該ハイブリドーマはミオスタチンに結合するモノクローナル抗体を分泌する)も本明細書で提供される。

【0092】

ヒト抗体、部分的ヒト抗体、またはヒト化抗体は、多くの用途、特にヒト対象への該抗体の投与を含む用途に適すると考えられるが、特定の用途には他のタイプの抗原結合タンパク質が適すると考えられる。本発明の非ヒト抗体は、例えば、マウス、ラット、ウサギ

10

20

30

40

50

、ヤギ、ロバ、または非ヒト霊長類(例えば、サル(例：カニクイザル、アカゲザル)または類人猿(例：チンパンジー))など、任意の抗体産生動物に由来するものであり得る。本発明の非ヒト抗体は、例えば、インビトロおよび細胞培養ベースの用途で、または本発明の抗体に対する免疫応答が起こらないか、ほんのわずかであるか、防止され得るか、問題にならないか、もしくは所望される他のいずれかの用途で、用いることができる。一態様では、本発明の非ヒト抗体は非ヒト対象に投与される。別の態様では、非ヒト抗体は非ヒト対象において免疫応答を誘発しない。別の態様では、非ヒト抗体は非ヒト対象と同じ種に由来し、例えば、本発明のマウス抗体はマウスに投与される。特定の種に由来する抗体は、例えば、その種の動物を所望の免疫原(例えば、ミオスタチンを発現している細胞、または可溶性のミオスタチンポリペプチド)で免疫するか、もしくはその種の抗体を生成するための人工システム(例えば、特定の種の抗体を生成するための細菌もしくはファージディスプレイに基づくシステム)を用いることによって、または、例えばある種由来の抗体の定常領域を他種由来の定常領域で置き換えるか、もしくはそれが他種由来の抗体の配列に密接に似るように抗体の1個または複数個のアミノ酸残基を置き換えることにより、ある種由来の抗体を別種由来の抗体に変換することによって、作製することができる。一態様では、抗体は2つ以上の異なる種に由来する抗体からのアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。

10

#### 【0093】

抗原結合タンパク質は多くの従来技術のいずれかによって調製することができる。例えば、それらは、当技術分野で公知の任意の技術を用いて、それらを天然で発現している細胞から精製する(例えば、抗体はそれを産生するハイブリドーマから精製される)か、または組換え発現系で産生させることができる。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al.(編), Plenum Press, New York (1980); およびAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land (編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)を参照されたい。

20

#### 【0094】

当技術分野で公知の発現系はどれも、本発明の組換えポリペプチドを作製するために使用することができる。一般的には、所望のポリペプチドをコードするDNAを含む組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する。用いることができる宿主細胞の中には、原核生物、酵母または高等真核生物の細胞がある。原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば大腸菌もしくは桿菌が含まれる。高等真核細胞には、昆虫細胞および哺乳動物由来の樹立細胞株が含まれる。適切な哺乳動物宿主細胞株の例としては、サル腎細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175)、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、BHK (ATCC CRL 10)細胞株、およびMcMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821に記載されるアフリカミドリザル腎細胞株CVI(ATCC CCL 70)由来のCVI/EBNA細胞株が挙げられる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主と共に使用するのに適したクローニングおよび発現ベクターは、Pouwelsら(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)によって記載されている。

30

#### 【0095】

形質転換された細胞は、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養し、該ポリペプチドを従来 of タンパク質精製法により回収することができる。1つのそうした精製法は、例えばミオスタチンの全部または一部を結合させたマトリックス上での、アフィニティクロマトグラフィーの使用を含む。本明細書での使用を意図されるポリペプチドには、混入の内因性物質を実質的に含まない、実質的に均質な組換え哺乳動物抗ミオスタチン抗体ポリペプチドが含まれる。

40

#### 【0096】

抗原結合タンパク質は、多くの公知技術のいずれかによって、調製して、所望の特性についてスクリーニングすることができる。こうした技術のいくつかは、関心対象の抗原結合タンパク質(例えば、抗ミオスタチン抗体)のポリペプチド鎖(またはその一部)をコード

50

する核酸を単離し、該核酸を組換えDNA技術により操作することを含む。その核酸は、関心対象の別の核酸に融合したり、例えば1個または複数個のアミノ酸残基を付加、欠失または置換するために(例えば、変異誘発または他の従来技術によって)変更したりすることが可能である。

【0097】

一局面において、本発明は、本発明の抗ミオスタチン抗体の抗原結合フラグメントを提供する。そうしたフラグメントは完全に抗体由来の配列から成ってもよいし、追加の配列を含んでもよい。抗原結合フラグメントの例としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ダイアポディ、トリアポディ、テトラポディ、およびドメイン抗体が挙げられる。他の例はLunde et al., 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06に記載される。

10

【0098】

一本鎖抗体は、重鎖および軽鎖可変ドメイン(Fv領域)フラグメントを、アミノ酸架橋(短いペプチドリンカー)を介して連結して、単一のポリペプチド鎖を得ることによって形成することができる。こうした一本鎖Fv(scFv)は、2つの可変ドメインポリペプチド(V<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>)をコードするDNA間に、ペプチドリンカーをコードするDNAを融合することによって調製されている。結果として生じるポリペプチドはそれ自体に折り重なって抗原結合単量体を形成することができるか、あるいはそれらは、2つの可変ドメイン間の柔軟性リンカーの長さに応じて、多量体(例えば、二量体、三量体または四量体)を形成することができる(Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108)。異なるV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>含有ポリペプチドを組み合わせることによって、異なるエピトープに結合するscFvの多量体を形成することが可能である(Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40)。一本鎖抗体の作製のために開発された技術には、米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544; de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87に記載されたものが含まれる。

20

【0099】

本発明の抗原結合タンパク質(例えば、抗体、抗体フラグメント、および抗体誘導体)は、当技術分野で知られている任意の定常領域を含むことができる。軽鎖の定常領域は、例えば、 $\kappa$ 型軽鎖定常領域、例えばヒト $\kappa$ 型軽鎖定常領域であり得る。重鎖の定常領域は、例えば、 $\gamma$ 型重鎖定常領域、例えばヒト $\gamma$ 型重鎖定常領域、または $\mu$ 型重鎖定常領域であり得る。一態様では、軽鎖または重鎖の定常領域は、天然に存在する定常領域のフラグメント、誘導体、変異体、または突然変異タンパク質である。

30

【0100】

関心対象の抗体とは異なるサブクラスまたはアイソタイプの抗体を誘導するための技術、すなわち、サブクラススイッチング(subclass switching)が知られている。かくして、IgG抗体は、例えば、IgM抗体から誘導することができ、その逆も可能である。こうした技術は、所定の抗体(親抗体)の抗原結合特性を保持するが、親抗体とは異なる抗体アイソタイプまたはサブクラスに関連した生物学的特性をも示す、新しい抗体の作製を可能にする。組換えDNA技術が使用可能である。特定の抗体ポリペプチドをコードするクローン化DNA、例えば、所望のアイソタイプの抗体の定常ドメインをコードするDNAは、こうした方法で用いることができる。Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16をも参照されたい。さらに、IgG4が望まれる場合は、IgG4抗体の不均質性につながる可能性があるH鎖内ジスルフィド結合を形成する傾向を緩和するために、Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407(参照により本明細書に組み入れられる)に記載されるような点突然変異(CPSCP -> CPPCP)をヒンジ領域に導入することが望ましいこともある。

40

【0101】

さらに、異なる特性(すなわち、抗原結合タンパク質が結合する抗原に対するさまざまな親和性)を有する抗原結合タンパク質を誘導するための技術もまた知られている。鎖シャuffling(chain shuffling)と呼ばれる、1つのそうした技術は、系状バクテリオファー

50

ジの表面に免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーをディスプレイすることを含み、しばしばファージディスプレイと呼ばれている。鎖シャフリングは、Marks et al., 1992, BioTechnology, 10:779に記載されるように、ハプテン、2-フェニルオキサゾール-5-オンに対する高親和性抗体を調製するために使用されてきた。

#### 【0102】

別の態様において、本発明は、ミオスタチンからの解離定数が低い抗原結合タンパク質を提供する。一態様では、その抗原結合タンパク質は200pMの $K_d$ 、または100pMもしくはそれより低い $K_d$ を有する。別の態様では、 $K_d$ は10pMもしくはそれより低い；別の態様では、それは5pMもしくはそれより低く、つまりそれは4pM、3pM、2pMもしくはそれより低い。別の態様では、 $K_d$ は本明細書中の実施例に記載した抗体と実質的に同じである。別の態様では、抗原結合タンパク質は、本明細書中の実施例に記載した抗体と実質的に同じ $K_d$ でミオスタチンに結合する。

10

#### 【0103】

別の態様において、本発明は、GDF-11に対する解離定数より実質的に低いミオスタチンに対する解離定数( $K_d$ )を有する抗原結合タンパク質を提供する。別の態様では、ミオスタチンに対する解離定数はGDF-11に対するそれよりも1,000倍低く、あるいはそれはGDF-11よりもミオスタチンに対して2,500、5,000、7,500、8,000、9,000、9,500、9,700、9,800、9,900または10,000倍低い。別の態様では、ミオスタチンへの結合の選択性は、GDF-11への結合の1,000、2,500、5,000、7,500、8,000、9,000、9,500、9,700、9,800、9,900または10,000倍である。別の態様では、GDF-11に対する $K_d$ は10nMもしくはそれより高い；別の態様では、それは25nMもしくはそれより高く、つまりそれは50nM、100nM、150nM、175nM、180nMもしくはそれより高い。別の態様では、ミオスタチンへの結合の選択性は、GDF-11への結合の1,000、2,500、5,000、7,500、8,000、9,000、9,500、9,700、9,800、9,900または10,000倍である。

20

#### 【0104】

別の態様において、本発明は、GDF-11に対する結合親和性より実質的に高いミオスタチンに対する結合親和性を有する抗原結合タンパク質を提供する。一態様では、ミオスタチンに対する抗原結合タンパク質の親和性はGDF-11に対するよりも500倍高い。別の態様では、ミオスタチンに対する親和性はGDF-11に対するそれより1,000倍高く、あるいはそれはGDF-11よりもミオスタチンに対して2,500、5,000、7,500、8,000、9,000、9,500、9,700、9,800、9,900または10,000倍高い。

30

#### 【0105】

別の局面において、本発明は、ミオスタチンの活性、例えば、ミオスタチン受容体(またはそのサブユニット)への結合、ミオスタチン受容体を発現している細胞への結合、またはALK4へのミオスタチンの結合、を阻害する抗原結合タンパク質を提供する。一態様では、抗原結合タンパク質は1000pMもしくはそれより低い $IC_{50}$ を有する。別の態様では、 $IC_{50}$ は500pMもしくはそれより低い；別の態様では、 $IC_{50}$ は300pMもしくはそれより低いか、それは200pMもしくはそれより低いか、それは100pMもしくはそれより低い。別の態様では、 $IC_{50}$ は本明細書中の実施例に記載した抗体のそれと実質的に同じである。別の態様では、抗原結合タンパク質は本明細書中の実施例に記載した抗体と実質的に同じ $IC_{50}$ でミオスタチンの活性を阻害する。

40

#### 【0106】

一態様において、本発明の抗原結合タンパク質は、1000pMもしくはそれより低いミオスタチン(またはミオスタチンを発現している細胞)に対する見かけの親和性を有する。他の態様では、抗原結合タンパク質は、500pM以下、300pM以下、200pM以下、100pM以下、または80pM以下の見かけの親和性を示す。別の態様では、抗原結合タンパク質は、本明細書中の実施例に記載した抗体のそれと実質的に同じ見かけの親和性を示す。別の態様では、抗原結合タンパク質は、本明細書中の実施例に記載した抗体のそれと実質的に同じ見かけの親和性を有する。

#### 【0107】

50

別の態様において、本発明は、ミオスタチンへの結合について本明細書に開示した抗体と競合する抗原結合タンパク質を提供する。そうした競合能力は、当技術分野で周知の方法によって、例えば、蛍光活性化セルソーティング(FACS)法もしくは他の同様のアッセイを用いて観察されるミオスタチン発現細胞への結合における競合により、BIACore(登録商標)もしくはKinExA(登録商標)アッセイなどのアッセイでの競合により、または本明細書に記載の別のアッセイでの競合により、測定することができる。一局面では、ミオスタチンへの結合について本明細書に開示した抗体と競合する抗原結合タンパク質は、その抗体と同じエピトープまたは重複(もしくは隣接)エピトープに結合する。別の局面では、ミオスタチンへの結合について本明細書に開示した抗体と競合する抗原結合タンパク質は、ミオスタチンの活性を阻害する。

10

**【0108】**

別の局面において、本発明は、インビトロまたはインビボ(例えば、ヒト対象に投与したとき)で少なくとも1日の半減期を有する抗原結合タンパク質を提供する。一態様では、抗原結合タンパク質は少なくとも3日の半減期を有する。別の態様では、抗原結合タンパク質は4日またはそれより長い半減期を有する。別の態様では、抗原結合タンパク質は8日またはそれより長い半減期を有する。別の態様では、抗原結合タンパク質は、非誘導体化または非修飾抗原結合タンパク質と比較して、より長い半減期をもつように、誘導体化または修飾される。別の態様では、抗原結合タンパク質は、例えば2000年2月24日公開のWO 00/09560(参照により本明細書に組み入れられる)に記載されるような、血清半減期を増大させる1つまたは複数の点突然変異を含む。

20

**【0109】**

本発明はさらに、多重特異性抗原結合タンパク質、例えば、二重特異性抗原結合タンパク質、例えば2つの異なる抗原結合部位または領域を介して、ミオスタチンの2つの異なるエピトープに、またはミオスタチンのエピトープと別の分子のエピトープに結合する抗原結合タンパク質を提供する。また、本明細書に開示した二重特異性抗原結合タンパク質は、他の刊行物を参照することによって本明細書で説明したものを含めて、本明細書に記載の抗体の1つ由来のミオスタチン結合部位と、本明細書に記載の抗体の別のもの由来の第2のミオスタチン結合領域とを含むことができる。あるいは、二重特異性抗原結合タンパク質は、本明細書に記載の抗体の1つ由来の抗原結合部位と、当技術分野で公知の別のミオスタチン抗体由来の、または公知の方法もしくは本明細書に記載の方法により作製される抗体由来の第2の抗原結合部位とを含んでもよい。

30

**【0110】**

二重特異性抗体を作製するための多くの方法が当技術分野で知られており、2001年4月20日出願の米国特許出願第09/839,632号(参照により本明細書に組み入れられる)に説明されている。こうした方法には、Milstein et al., 1983, Nature 305:537、およびその他(米国特許第4,474,893号、米国特許第6,106,833号)に記載されるハイブリッド-ハイブリドーマの使用、および抗体フラグメントの化学的結合(Brennan et al., 1985, Science 229:81; Glennie et al., 1987, J. Immunol. 139:2367; 米国特許第6,010,902号)が含まれる。また、二重特異性抗体は、組換え手段を介して、例えばロイシンジッパー部分(すなわち、優先的にヘテロ二量体を形成するFosおよびJunタンパク質由来; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547)または米国特許第5,582,996号に記載されるような他の鍵と鍵穴相互作用ドメイン構造を用いることによって、作製することができる。さらなる有用な技術には、Kortt et al., 1997, 前掲; 米国特許第5,959,083号; および米国特許第5,807,706号に記載されるものが含まれる。

40

**【0111】**

別の局面において、本発明の抗原結合タンパク質は抗体の誘導体を含む。誘導体化された抗体は、例えば特定の用途での半減期の増加など、所望の特性を抗体に付与する任意の分子または物質を含むことができる。誘導体化された抗体は、例えば、検出可能(または標識)成分(例えば、放射性分子、発色性分子、抗原もしくは酵素分子、検出可能ビーズ(例えば、磁性もしくは高電子密度(例:金)ビーズ)、または別の分子に結合する分子(例:

50

ビオチンもしくはストレプトアビジン))、治療もしくは診断成分(例えば、放射性、細胞毒性、または薬理活性成分)、または特定の用途(例えば、ヒト対象などの対象への投与、または他のインビボもしくはインビトロ用途)に対する抗体の適合性を増大させる分子を含むことができる。抗体の誘導体化に用いることができる分子の例には、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)およびポリエチレングリコール(PEG)が含まれる。抗体のアルブミン結合型およびPEG化誘導体は、当技術分野で周知の技術を用いて調製することができる。一態様では、抗体はトランスサイレチン(TTR)またはTTR変異体にコンジュゲートされるか、または他の方法で結合される。TTRまたはTTR変異体は、例えば、デキストラン、ポリ(n-ビニルピロリドン)、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールからなる群より選択される化合物を用いて、化学的に修飾することができる。米国特許出願第20030195154号。

10

20

30

40

50

#### 【0112】

本発明のさらなる局面は、本明細書に記載した抗体の変異体を含む。特定の変異体は、本明細書に、例えば配列番号10および20に、示されるコンセンサス配列によって包含される。追加の変異体には、1個または複数個のアミノ酸によって本明細書に開示した抗体と異なる抗体が含まれ、例えば、変異型抗体の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸が開示した抗体配列のものと異なる。別の態様では、変異体は、開示した抗体の1つとアミノ酸配列において90%同一である。別の態様では、変異型抗体の配列は、本明細書に開示した抗体の1つの配列と91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。変異体には、抗体配列から1個または複数個のアミノ酸が欠失されているものも含まれ、例えば、1、2、3、4または5個のアミノ酸を抗体ポリペプチドのいずれかの末端から欠失させたり、あるいはそのような欠失を内部的に行ったりすることが可能である。

#### 【0113】

さらなる態様は用語「変異体」によって包含される。例えば、アミノ酸残基は、以下を含むがこれらに限定されない、翻訳後修飾を受けることができる：グルタミン(特に、N末端のグルタミン)はピログルタミン酸に環化または変換することができる；追加的にまたは代替的に、アミノ酸は脱アミド化、異性化、糖化および/または酸化を受けることができる。本発明のポリペプチドは、当技術分野で周知の部位で、グリコシル化(例えば、N-結合型またはO-結合型グリコシル化)を含めて、追加の翻訳後修飾を受けることができる。したがって、変更は、このような改変を排除または最小限にするために、あるいはそのようなプロセッシングが有益である状況ではそれらを促進するために、ポリペプチドのアミノ酸配列で行うことができる。

#### 【0114】

別の局面において、本発明は、ミオスタチンに結合する分子を、本発明の抗原結合タンパク質を用いてスクリーニングする方法を提供する。適切であれば、どのようなスクリーニング技術を用いてもよい。一態様では、ミオスタチン分子、または本発明の抗原結合タンパク質が結合するそのフラグメントを、本発明の抗原結合タンパク質および別の分子と接触させる；その際、別の分子がミオスタチンへの抗原結合タンパク質の結合を減少させる場合に、該分子はミオスタチンに結合する。抗原結合タンパク質の結合は、任意の適切な方法、例えばELISAを用いて検出することができる。ミオスタチンへの抗原結合タンパク質の結合の検出は、上述したように、抗原結合タンパク質を検出可能に標識することによって簡略化することができる。別の態様では、ミオスタチン結合分子は、それがミオスタチン活性化および/またはシグナル伝達を阻害するかどうかを判定するために、さらに分析される。

#### 【0115】

また、有効量の本発明のポリペプチド産物を、ミオスタチン療法に有用な、薬学的に許容される希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび/または担体と共に含む薬学的組成物は本発明によって包含される。このような組成物は、さまざまなバッファ

ー内容(例:Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩)、pHおよびイオン強度の希釈剤;添加剤、例えば、界面活性剤および可溶化剤(例:ツイーン80、ポリソルベート80)、抗酸化剤(例:アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、防腐剤(例:チメロサル、ベンジルアルコール)および増量物質(例:ラクトース、マンニトール);タンパク質へのポリマー(例:ポリエチレングリコールまたは他の成分)などの成分の共有結合(上述したとおり、また、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,179,337号参照);ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー化合物の粒状製剤への、またはリポソームへの物質の取り込みを含む。こうした組成物はミオスタチンの物理的状態、安定性、インビボ放出速度、およびインビボクリアランス速度に影響を与える。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版(1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)1435-1712ページを参照されたい(参照により本明細書に組み入れられる)。

10

**【0116】**

一般的に、本発明のミオスタチン阻害ポリペプチドの有効量は、レシピエントの年齢、体重および疾患の状態または重症度によって決まる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 前掲, 697-773ページを参照されたい(参照により本明細書に組み入れられる)。典型的には、約0.001g/kg体重~約1g/kg体重の投与量が使用されるが、当業者には認識されるように、それより多いまたは少ない量を用いてもよい。局所適用などの局部的(非全身的)な使用では、投与は約0.001g/cm<sup>2</sup>~約1g/cm<sup>2</sup>であり得る。投与は1日1回またはそれ以上、つまりそれほど頻繁でなくてよく、本明細書に記載される他の組成物と一緒にあってもよい。なお、本発明は、本明細書に記載の投与量に限定されるものではないことに留意すべきである。

20

**【0117】**

本発明は、ミオスタチン結合物質(またはミオスタチン結合ポリペプチド、例えば抗体)を含むミオスタチンアンタゴニストを用いて、さまざまな疾患を処置するための薬学的組成物および方法を提供する。本発明は、治療に有効な量の少なくとも1種のミオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、処置を必要とする対象における性腺機能低下症の影響の処置方法を提供する。一態様では、性腺機能低下症はアンドロゲン除去療法に起因する。第二の態様では、性腺機能低下症は生殖腺機能の加齢による低下に起因する。

30

**【0118】**

本発明はまた、治療に有効な量の少なくとも1種のミオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、悪液質に罹患している対象における悪液質の処置方法を提供する。悪液質は原発性の悪液質であってもまたは二次性の悪液質であってもよい。一態様では、対象はリウマチ悪液質を患っているか、あるいは別の自己免疫疾患または炎症性疾患(慢性閉塞性肺疾患、つまりCOPDを含む)の結果もしくは合併症として発症する悪液質を患っている。本発明はまた、治療に有効な量の少なくとも1種のミオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、処置を必要とする対象における火傷による悪液質の処置方法を提供する。本発明はまた、過剰な腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  を特徴とする炎症性疾患に罹患している対象においてTNF- $\alpha$  を低減させる方法を提供する。

40

**【0119】**

本発明はまた、治療に有効な量の少なくとも1種のミオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、そのような処置を必要とする対象における化学療法剤などの化学物質を用いた処置による悪液質の処置方法を提供する。本発明はまた、悪液質が癌もしくは腫瘍性疾患に起因するか、癌もしくは腫瘍性疾患のためのいずれかの処置に起因するか、または該疾患と該処置の複合的影響である場合に、癌もしくは腫瘍性疾患を患っている個体における悪液質の処置方法を提供する。

**【0120】**

本発明はまた、治療に有効な量の少なくとも1種のミオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、そのような処置を必要とする

50

対象における糖尿病に起因する悪液質の処置方法を提供する。本発明はまた、治療に有効な量の少なくとも1種のみオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、糖尿病性腎症に罹患している対象における糖尿病性腎症の処置方法を提供する。

【0121】

また、治療に有効な量の少なくとも1種のみオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、心臓悪液質および/または腎臓悪液質の処置方法が本発明によって提供される。悪液質は慢性心不全(CHF)のよく見られる合併症であり、それはTNF- などの炎症性サイトカインの血漿濃度の上昇、および異化/同化経路の不均衡と関連している。慢性腎不全(CRF)および/または末期腎疾患(ESRD)を患う対象もまた悪液質に罹ることが多く、これも炎症性物質のレベルの上昇に起因しうる。

10

【0122】

さらに、心臓萎縮および/または心臓発育不全の処置方法が本明細書に提供される。心臓萎縮は癌を患う個体に起こることがあり、また、ベッドで長期療養しているか、または随意筋の萎縮をもたらす他の状況もしくは状態にある個体にも起こり得る。さらに、本発明の選択的のみオスタチンアンタゴニストは、心筋の有効性が低下する他の状態、例えば心不全(例：うっ血性心不全)を処置するためにも使用することができる。本発明はまた、摂食障害または飢餓で起こる心臓の異常の処置にも有用であり得る。

【0123】

また、本発明は、以前は成長ホルモン、インスリン成長因子-1(IGF-1)、成長ホルモン分泌促進因子、および成長ホルモン-IGF-1軸に関係した他の物質により処置された疾患または状態を処置する代替方法を提供する。のみオスタチンアンタゴニストは、これらの物質の潜在的に危険な副作用なしに、こうした疾患を処置する方法を提供する。のみオスタチンアンタゴニストはまた、成長ホルモン抵抗性(老化の認識された問題)を処置するための方法を提供する。一態様では、本発明は、治療に有効な量の少なくとも1種のみオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、プラダー・ウィリー症候群に罹患している対象における該症候群の影響の処置方法を提供する。

20

【0124】

本発明はまた、治療に有効な量の少なくとも1種のみオスタチンアンタゴニストを薬学的に許容される担体と混合して対象に投与する段階を含む、サルコペニア(高齢者のサルコペニアを含む)および他の筋疾患または状態の処置方法を提供する。本発明はさらに、リハビリ療法での使用、筋力および/またはバランストレーニングとの併用、ならびに転倒削減または防止での使用を含めて、高齢者の虚弱性の処置方法を提供する。

30

【0125】

また、外傷性骨折の治癒、骨粗鬆症性骨折の修復、ならびに一般的な骨量減少(例えば、骨粗鬆症および/または骨減少症)および付随する長期の無活動もしくは床上安静、および/または手足の固定化の結果としての骨量減少の処置を促進する方法が本発明によって提供される。

【0126】

のみオスタチンアンタゴニストの投与が有益であると考えられる他の状態としては、以下が挙げられる：アジソン病、筋萎縮性側索硬化症または運動ニューロン疾患(ALS、MND、ルー・ゲーリグ病)、ベル麻痺(および/または顔面神経の問題)、ポツリヌス中毒、脳性麻痺、シャルコー・マリー・トゥース病および他の末梢神経障害、クッシング症候群、糖尿病性神経障害、ギラン・バレー症候群、多発性硬化症、筋萎縮(進行性および脊髄性筋萎縮を含む)、筋ジストロフィー(多くの型がある；筋緊張性ジストロフィーを含む)、重症筋無力症、灰白髄炎、多発性筋炎、筋肉、腱および/または靭帯の捻挫および挫傷、脳卒中、ならびに長期の無活動または床上安静、手足の固定化(例えば、ギプス包帯固定および/または副子固定による)、および宇宙飛行など、筋肉の消耗をもたらす他の状態。

40

【0127】

本発明のみオスタチン結合タンパク質は、診断方法での用途を見つけることもできる。

50

例えば、本発明の抗原結合タンパク質は、検出可能なマーカー物質との会合(例えば、<sup>125</sup>Iによる放射性標識、または別の検出可能成分へのコンジュゲート化)によって「標識」することができ、固形組織サンプルおよび血液または尿などの液体サンプル中のミオスタチンの検出および定量に有用な試薬を提供する。このような標識物質を含むキットも本明細書において企画される。

【0128】

以下の実施例は、本発明の特定の態様または特徴を例示する目的のために提供されており、その範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0129】

実施例1

抗ミオスタチン抗体

いくつかの変異型抗ミオスタチン抗体を調製し、活性について試験した；それらの配列が以下の表1および2に示される。

【0130】

(表1) 抗ミオスタチン抗体の重鎖配列

HC	FR1	CDR1	FR2
12A5-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NYWMN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NYWCN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	RYWMN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	RYWMN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR	NYWCN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR	NYWCN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR	NYWCN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NYWLN	WVRQAPGKGLEWVA
12A5-18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR	NYWCN	WVRQAPGKGLEWVA

10

HC	CDR2	FR3
12A5-1	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
12A5-3	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-5	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-6	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-8	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-9	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-10	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-12	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE
12A5-18	QIRLKSDNYATHYAESVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTE

20

HC	CDR3	FR4
12A5-1	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-3	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-5	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-6	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-8	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-9	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-10	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-12	GLDY	WGQGTTVTVSS
12A5-18	GLDY	WGQGTTVTVSS

30

【 0 1 3 1 】

(表2) 抗ミオスタチン抗体の軽鎖配列

LC	FR1	CDR1	FR2	CDR2
12A5-1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSTLQP
12A5-3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSFLQP
12A5-5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSWLQP
12A5-6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSFLQP
12A5-8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTKTLQP
12A5-9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTRLQP
12A5-10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSTLQP
12A5-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSWLQP
12A5-18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	KASQDINKYVA	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSHLQP

10

LC	FR3	CDR3	FR4
12A5-1	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK
12A5-3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK
12A5-5	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK
12A5-6	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDALLYT	FGQGTKLEIK
12A5-8	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK
12A5-9	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK
12A5-10	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNKLYT	FGQGTKLEIK
12A5-12	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK
12A5-18	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LQYDNLLYT	FGQGTKLEIK

20

## 【 0 1 3 2 】

## 実施例2

## インビトロアッセイ

抗ミオスタチン抗体の活性がいくつかのアッセイで評価される。

## 【 0 1 3 3 】

## C2C12細胞ベースのミオスタチン活性アッセイ

このアッセイでは、ミオスタチン受容体へのミオスタチンの結合が阻害される程度を測定することによって、試験される該阻害物質のミオスタチン中和能力が実証される。

30

## 【 0 1 3 4 】

ミオスタチン応答性のレポーター細胞株は、C2C12筋芽細胞(ATCC番号CRL-1772)にpMARE-luc構築物をトランスフェクトすることによって作製した。pMARE-luc構築物は、ミオスタチン/アクチビン応答要素(Dennler et al. EMBO 17: 3091-3100 (1998))を表す、CAGA配列の12の反復配列を、pLuc-MCSレポーターベクター(Stratagene社カタログ番号219087)にTATAボックスの上流でクローニングすることによって作製した。C2C12筋芽細胞はもともその細胞表面にミオスタチン/アクチビン受容体を発現する。ミオスタチンがその細胞受容体に結合すると、Smad経路が活性化され、そしてリン酸化されたSmadが該応答要素に結合し(Macias-Silva et al. Cell 87:1215 (1996))、ルシフェラーゼ遺伝子の発現をもたらす。その後、ルシフェラーゼ活性を、市販のルシフェラーゼレポーターアッセイキット(カタログ番号E4550, Promega社, Madison, WI)を用いてメーカーのプロトコルに従って測定する。pMARE-lucをトランスフェクトされたC2C12細胞の安定株(C2C12/pMAREクローン#44)を用いて、以下の手順に従ってミオスタチン活性を測定した。

40

## 【 0 1 3 5 】

等しい数のレポーター細胞(C2C12/pMAREクローン#44)を96ウェル培養プレートに播種する。組換え成熟ミオスタチンを、試験される抗体と室温で1時間プレインキュベートする。レポーター細胞培養物は、抗体を含むまたは含まないミオスタチンで6時間処理する。処理した培養物におけるルシフェラーゼ活性を測定することによってミオスタチン活性を測定する。このアッセイは、ミオスタチンのシグナル伝達活性を阻害する抗体を最初に同

50

定するために用いることができる；タイトレーション曲線は、ミオスタチンの濃度を一定にして、さまざまな濃度の抗体を用いて作成することができる。このようなタイトレーション曲線は、以下の表3に示すような、多くの抗体の $IC_{50}$ 値を決定するために用いられる。

【 0 1 3 6 】

(表3) 種々の抗ミオスタチン抗体変異体の $IC_{50}$

抗体	$IC_{50}$ (nM)
12A5-1	473.0
12A5-3	2.53
12A5-5	1.85
12A5-6	1.64
12A5-8	4.96
12A5-9	3.98
12A5-10	3.08
12A5-12	1.45
12A5-18	1.45

10

20

モノクローナル抗体12A5-5がさらなる解析のために選択された。

【 0 1 3 7 】

KinExA(商標) 溶液平衡アッセイでのミオスタチンの結合

KinExA(登録商標)法(Sapidyne Instruments社)を用いる溶液ベースの平衡結合アッセイは、抗体分子に結合するミオスタチンの解離平衡( $K_d$ )を決定するために用いられる。この溶液ベースのアッセイは、場合によっては、BIAcore(登録商標)アッセイよりも感度が高いと考えられる。Reacti-Gel 6X(アミン含有リガンドを固定化するための高度に反応性の架橋6%アガロースビーズ; Thermo Scientific Pierce社, Rockford, IL)を約50  $\mu$ g/mlのミオスタチンで一晩プレコーティングし、次にウシ血清アルブミン(BSA; 1mg/ml)でブロックする。抗体サンプル(10pMおよび30pM)は、0.1mg/mlのBSAを含むサンプルバッファー中の各種濃度(0.5pM~5nM)のミオスタチンと室温で8時間インキュベートしてから、ミオスタチン被覆ビーズを通過させた。ビーズに結合した抗体の量は、SuperBlock(登録商標)(過剰の結合部位をブロックするための最適化されたタンパク質ベースの溶液; Thermo Scientific Pierce社, Rockford, IL)中の1mg/mlの蛍光(Cy5)標識ヤギ抗ヒトFc抗体によって定量化される。結合シグナルは、所定のミオスタチン濃度と平衡状態にある遊離抗体の濃度に比例する。 $K_d$ は、KinExA(商標)ソフトウェア(Sapidyne Instruments社)で提供される双対曲線1部位ホモジニアス結合モデル(dual-curve one-site homogeneous binding model)を用いて競合曲線の非線形回帰から得られる。抗体12A5-5はこのアッセイで約2pMの $K_d$ を示した。

30

40

【 0 1 3 8 】

Biacore(商標)を用いた選択性アッセイ

結合特異性解析は、生体分子の相互作用をリアルタイムで研究するための標識フリーの表面プラズモン共鳴(SPR)に基づいた技術であるBiacore(商標)(GE Healthcare社, Chalfont St. Giles, UK)を用いて12A5-5について実施した。12A5-5とActRIIB/Fcは社内で作製されたものであり、TGFRIII/FcとBMPRII/FcはR & D Systems社(Minneapolis, MN)から得られたものであった。Mab 12A5-5と受容体は両方とも、リサーチグレード(research gr

50

ade)のセンサーチップに、メーカーが推奨するプロトコルに従って共有結合で結合させた。10ナノモルの各リガンドを、固定化した抗体および受容体の高密度表面上に流した。ミオスタチン、GDF11、GDF3、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンAC、TGF- $\beta$ 1、BMP4、BMP9、およびBMP10の、それらに対応する受容体への結合を試験して、12A5-5とその他の受容体に結合するリガンドのシグナルを正規化するための対照として用いた。データは、Mab 12A5-5がGDF3、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンAC、TGF- $\beta$ 1、BMP4、BMP9、またはBMP10に結合しないことを、はっきりと示した。抗体12A5-5は、別の実験で180nMと推定された親和性( $K_d$ )でGDF11に弱く結合することが示された。これらの結果から、抗体12A5-5はミオスタチンに特異的であり、かつGDF11と比べてミオスタチンに対し約10,000倍の選択性を示すことが判明した。

10

【0139】

実施例3追加のインビトロアッセイミオスタチンの阻害とGDF-11の阻害を比較する細胞ベースのアッセイ

細胞ベースのアッセイは実質的に先に記載したとおりに実施し、ミオスタチンの結合阻害の $IC_{50}$ をGDF-11のそれに対比する。結果を以下の表4に示す。

【0140】

(表4) ミオスタチンまたはGDF-11活性の阻害

細胞アッセイ( $IC_{50}$ )	12A5-5	対照ペプチド
ミオスタチン	1.2 nM	1.1 nM
GDF-11	中和せず	1.2 nM

20

【0141】

これらの結果から、12A5-5はこのアッセイでミオスタチンの活性を阻害し、対照ポリペプチド(米国特許第7,511,012号に記載)も同様であったが、対照ペプチドはGDF-11の活性をも阻害したのに対し、抗体12A5-5は阻害しなかったことが示される。

【0142】

ALK4、ActRIIA、およびActRIIB/Fc表面での結合アッセイ

ミオスタチン結合アッセイは、固定化ALK4/Fc、ActRIIA/Fc、およびActRIIB/Fc (R&D Systems社, Minneapolis, MN)表面を備えたBiacore(商標)システムを用いて、実質的にミオスタチンについて先に記載したとおりに実施した。固定化受容体へのミオスタチンの結合シグナルは、溶液中の抗体の存在下または非存在下で測定し、抗体の非存在下でのミオスタチンの結合シグナル(100%(対照)と指定された)と比較した。結合応答の減少は、ミオスタチンに結合する抗体が受容体サブユニットへのミオスタチンの結合をブロックしたことを示す一方で、結合応答の増加は、ミオスタチン/受容体複合体への抗体の共結合を示した。結果を以下の表5に示す。

30

【0143】

(表5) ミオスタチン受容体サブユニットへのミオスタチンの結合に及ぼす12A5-5の影響

40

	Alk4-Fc	ActRIIA-Fc	ActRIIB-Fc
10nM ミオスタチン単独(myo)	100%	100%	100%
myo+20nM MAb 12A5-5	13%	617%	807%
myo+20nM 対照ポリペプチド	11%	565%	560%

【0144】

50

これらの結果から、12A5-5および対照ポリペプチド(前述)はミオスタチン/ALK4相互作用をブロックしたが、ミオスタチン/ActRIIBおよびミオスタチン/ActRIIAと共結合したことが示される。

【0145】

#### KinExA(商標)溶液平衡アッセイでのプロミオスタチンへの結合

先に記載したものと同様のKinExA(商標)アッセイを、成熟ミオスタチンの代わりにプロミオスタチンを用いて、実施した。Reacti-Gel 6Xを約50 μg/mlのプロミオスタチンで一晩プレコーティングし、次にBSAでブロックした。10pMの抗体サンプルをサンプルバッファ中の各種濃度(0.5pM~5nM)のプロミオスタチンと室温で8時間インキュベートしてから、プロミオスタチン被覆ビーズを通過させた。ビーズに結合した抗体の量を、実質的に先に記載したとおりに定量化する。K<sub>d</sub>は記載した非線形回帰から得られた；抗体12A5-5は約2pMのK<sub>d</sub>でプロミオスタチンに結合した。

10

【0146】

#### 実施例4

##### 抗体のインビボ同化活性

本発明のミオスタチン阻害物質のインビボ有効性を判定するために、C57BL6マウスモデル(Charles River Laboratories, Massachusetts)を使用する。このモデルは、乾いた筋肉量の増加と筋原線維タンパク質の増加と関連するが、体内の水分量の蓄積とは関連しない急速な同化応答によって、本発明の阻害物質に応答した。

20

【0147】

一例において、12A5-5のインビボ有効性は以下の実験により実証された。1群8匹の8週齢C57BL6マウスを10mg/kgの投与量(皮下注射)で週1回処置した。8週齢C57BL6マウスの対照群8匹はピヒクル(PBS)の週1回の(皮下)注射を受け取った。動物は毎週体重を測定し、除脂肪体重を0週目と4週目にNMRで測定した。結果を図1および2に示す。図1は、対照と比較した、抗体投与の4週間にわたるマウスの総体重の増加を示す。この図では、抗ミオスタチン抗体12A5-5が黒ひし形で表され、対照が白丸で表される；さまざまなデータ点のp値は次のとおりである：\* = p < 0.05；\*\* = p < 0.01；および\*\*\* = p < 0.001。図2は、核磁気共鳴(NMR)イメージング(EchoMRI 2003, Echo Medical Systems社, Houston, TX)で測定したときの4週目での除脂肪体重の変化を示す；p値は先に記載したとおりである。

30

【0148】

したがって、ミオスタチンアンタゴニスト12A5-5は、マウスにおいて体重の増加と除脂肪筋肉量の増加をもたらした；同様の結果がカニクイザルの実験でも実証された。

【0149】

#### 実施例5

##### 抗ミオスタチン中和モノクローナル抗体12A5-5に対するエピトープの同定

成熟型のヒトミオスタチンは、分子内および分子間ジスルフィド結合を形成する9個のシステインを分子中にもつ109アミノ酸のタンパク質である(図3に示される)。8員環構造がCys43-Cys106およびCys47-Cys108ジスルフィド結合を介して形成される。Cys15-Cys74ジスルフィド結合は、他のジスルフィド結合によって形成された環構造を貫通して、シスチンノット構造を作り出す。Cys6とCys16はジスルフィド結合をN末端領域で形成するが、これはシスチンノットの一部ではない。第1のミオスタチン単量体のCys73と第2のミオスタチン単量体のCys73の間に分子間ジスルフィド架橋が形成されて、共有結合で連結された二量体の天然ミオスタチンとなる。これら2つのミオスタチン単量体は天然の状態では逆平行構造体として三次元的に折りたたまれている(Cash et al., EMBO J (2009) 28, 2662-2676)。

40

【0150】

12A5-5の結合にとって重要なエピトープを特徴づけるための一般的なアプローチは、異なるプロテアーゼおよび/または化学物質を用いて、ヒトミオスタチンをペプチドに断片化し、種々のヒトミオスタチンペプチドの配列を決定し、これらのペプチドを単離し、そしてBIAcore(登録商標)による競合アッセイを用いて12A5-5に結合するペプチドの能力に

50

ついて各ペプチドを試験することを含んでいた。同様のタンパク質分解消化を用いたさらなる研究が、12A5-5とブレインキュベートしたヒトミオスタチンを用いて行われ、結果的にこれは結合領域(ペプチドマッピングにより検出された)付近のタンパク質分解部位の保護につながった。ヒトミオスタチンのタンパク質分解に対する抗体保護は、抗体によって分解から保護されるペプチドについてシグナルの減少を生じさせ、かつHPLC(高速液体クロマトグラフィー)ペプチドマッピングから単離された後で該抗体に結合するペプチドをもたらす。かくして、得られたデータは、ミオスタチンへの12A5-5の高親和性結合にとって重要な領域を決定することを可能にした。

#### 【0151】

##### ペプチドの単離および同定

ペプチド消化物をHPLCペプチドマッピングに供した；個々のピークを回収した；ならびにエレクトロスプレーイオン化(ESI)LC-MS/MS(液体クロマトグラフィー - 質量分析/質量分析)ペプチドマッピング解析により、マトリックス支援レーザー脱離質量分析法(MALDI-MS)により、および/またはN末端配列決定により、ペプチドを同定してマッピングした。これらの研究のためのHPLC分析はすべて、逆相C18カラム(内径0.5mm x 長さ25cm; Zorbax(登録商標)300SB; 5ミクロン; Agilent Technologies社, Santa Clara, CA)を用いて行った。HPLCペプチドマッピング解析は、0.1%トリフルオロ酢酸(移動相A)から0.1%トリフルオロ酢酸中の90%アセトニトリル(移動相B)までの多段階直線勾配を用いて展開させた。カラムを98%移動相A/2%移動相Bで平衡化させ、以下に記載される15  $\mu$ l/分の流速での100分にわたる計画勾配溶出にかけた：2%移動相Bでのアイソクラティック溶出を5分、続いて2つの直線勾配溶出、2%から50%移動相Bの直線勾配溶出を90分、および50%から100%移動相Bの直線勾配溶出を5分。

#### 【0152】

##### CNBr、エンドプロテイナーゼLysCおよびキモトリプシン消化：

成熟ヒトミオスタチンは、Metの後のペプチド結合を化学的に切断するCNBrを用いて；リシンの後のペプチド結合を切断するエンドプロテイナーゼLysCを用いて；またはPhe、Tyr、Trp、LeuおよびHisの後を切断するキモトリプシンを用いて消化した。化学的切断では、約20~35  $\mu$ gのヒトミオスタチン(0.5mg/ml)を、約0.5mgのCNBrを含有する70%ギ酸中で暗所にて室温で16時間インキュベートした。プロテアーゼ消化では、約20~35  $\mu$ gのヒトミオスタチン(0.5mg/ml)を、10mM酢酸アンモニウム(pH6.5)中でLysCまたはキモトリプシンのいずれかと共に、ミオスタチン対プロテアーゼ比を20：1(重量対重量ベース)として、37  $^{\circ}$ Cで20時間インキュベートした。CNBr切断およびタンパク質分解消化実験から得られた1~3マイクログラム量のサンプルを、LC-MS/MSペプチドマッピング解析にかけた。また、ESI-MS検出からオフラインで同様のペプチドマッピング解析を行って、MALDI-MS分析および結合アッセイのための個々のペプチド画分を回収した。

#### 【0153】

抗ミオスタチン抗体保護実験では、ミオスタチン(20  $\mu$ g ; 0.5mg/ml)を2つの異なる量の抗体(30および120  $\mu$ g ; それぞれ、ミオスタチン二量体/Abの概算モル比 = 4 : 1および1 : 1)と共に、0.1M酢酸アンモニウム(pH6.5)中で室温にて1時間ブレインキュベートした。次にサンプルを上記のようにLysCおよびキモトリプシンで消化した。少量の抗体も消化される可能性があるので、同じ濃度の抗体単独をも消化して、対照として用いた。

#### 【0154】

##### TCEP[トリス(2-カルボキシエチル)-ホスフィン]還元：

天然ミオスタチン、ならびにCNBr切断およびLysC消化サンプルからのHPLC単離されたシスチンノットペプチドのジスルフィド結合は、100mM TCEPを用いて、0.05%トリフルオロ酢酸中37  $^{\circ}$ Cで4時間、完全に還元した。次に、LC-MS/MSペプチドマッピングと同一の条件を用いて、TCEP還元サンプルをLC-MS/MS分析によって分析した。還元されたペプチドは、ESI-MS検出からオフラインでペプチドマッピング解析から回収した。

#### 【0155】

##### CNBr切断：

10

20

30

40

50

ヒトミオスタチンのCNBr切断のHPLCクロマトグラフィーは、それぞれ58分と80分の保持時間をもつ2つの主ピークをもたらした。HPLCピークのペプチドの正体は、ペプチドBおよびCと指定されたサンプル識別を用いて決定された(表6)。ペプチドBはMet84およびMet101の切断から生成された小さいフラグメントである。ペプチドCは、天然ミオスタチンのHPLC分析から回収された非切断型ミオスタチンのペプチドAよりも約5分速く溶出した。N末端配列決定、MALDI-MSおよびLC-MS/MS分析によって、ペプチドCは、1~80(分子量9022ダルトン)および102~109(分子量836ダルトン)からの配列を含むシスチンノットフラグメントとして同定された。決定されたペプチドCの分子量は約19.7kDであり、それが二量体であることを示している。CNBr切断サンプルのTCEP還元と、これに続くHPLCペプチドマッピングの後で、表6に示されるペプチドDおよびEが回収された。58分の保持時間で溶出されたペプチドDはペプチドBと同じ配列をもつと確認された；および80分で溶出されたペプチドEは1~80の配列を含むことが確認され、配列102~109位のペプチドに連結されたジスルフィド結合のみならず分子間ジスルフィド結合も完全に還元されていたことが示された。

10

【0156】

LysC消化：

LysC消化物のHPLCクロマトグラフィーからは、4つのピークが得られたにすぎない。8分および38分の保持時間のペプチドピークは、それぞれ37~39および91~97位に割り当てられた配列をもつペプチドであると確認された。これら2つのペプチドピークは結合アッセイのためには回収されなかった。61分で回収されたペプチドFは79~90に割り当てられた配列を有していた(表2)。N末端配列決定およびMALDI-MSで確認したところ、76分で回収されたペプチドGは、配列1~36、40~54、55~78および98~109位に割り当てられた、ジスルフィド結合で連結された4つの配列を含んでおり、シスチンノット構造が無傷であることが示された。このペプチドピークは19.5kDの分子量をもつと決定され、二量体の存在が確認された。4つのペプチド間にジスルフィド架橋を有するペプチドGの一次構造は図4に示される。

20

【0157】

LysC消化物のTCEP還元と、これに続くLC-MS/MSペプチドマッピングの後で、6つのペプチドが回収され、さらに解析された(表6)。38分で回収されたペプチドHは、上記のような非システイン含有ペプチドであって、配列91~97を含む。43分、49分、60分および79分の保持時間から回収された、ペプチドI、J、KおよびMは、それぞれ配列55~78位、98~109位、40~54位および1~36位に割り当てられた。これらのペプチドは、明らかにペプチドGのTCEP還元から誘導されたものである。73分のペプチドLは混じった配列を含んでおり、配列の割り当てを行わなかった。

30

【0158】

抗体保護実験(ここでは、2つの異なる抗体濃度の抗体と共にブレインキュベートされたミオスタチンがLysCによるタンパク質分解を受けた)では、これらの実験から得られたペプチドマップはミオスタチン単独の消化から得られたものと同一であった。78分の主ピークの構造は、上述したようなLysC処理シスチンノットペプチドであるペプチドGと完全に同一である。これらのデータから、12A5-5はミオスタチンのタンパク質分解に対して保護効果を及ぼさないこと、すなわち、この抗体はLysC消化時にタンパク質分解からの保護を与えないことが示された。

40

【0159】

キモトリプシン消化：

キモトリプシン消化物のHPLCクロマトグラフィーからは、多数のピークが得られた。HPLCから回収されたペプチドピークに対して配列解析を行った。HPLCにより分離されたペプチドの正確な質量を決定するために、ペプチド消化物のオンラインESI LC-MS分析も行った。キモトリプシン切断は、以下の保持時間で検出された短いジペプチドからヘプタペプチドまでを含む、多くのペプチドピークをもたらす：27.1分(配列53~57および53~59位)、29分(配列30~31位)、32.3分(配列52~57位)、41分(配列53~60位)、44分(配列52~60位)、50分(配列87~95位)、53分(配列30~38位)、57分(配列28~31位)および58分(配列21

50

~27位)。67~73分付近の大きな分子量の幅広いペプチドピーク(ペプチドNと指定)は、N末端配列決定で確認したところ4つのペプチド(配列1~20位、25~38位、39~82位および96~109位)から構成される、シスチンノット構造を含むことが判明した。MALDI-MS分析から、ペプチドNは14.4kDの分子量をもつことが示され、二量体の存在が確認された。一方、ジスルフィド結合のMALDI-インソース部分的断片化によって、このペプチドピークは図5に示される配列位置に対応した予想分子量をもつ4つのペプチドを含むことが確認された。

#### 【0160】

抗体保護実験(ここでは、12A5-5とブレインキュベートされたミオスタチンがキモトリプシンによるタンパク質分解を受けて、LC-MS/MSペプチドマッピングにより解析された)では、低い抗体モル比で、配列30~31位、28~31位および32~38位のペプチドに対応するペプチドピークがペプチドマッピング時にそれぞれのUV吸光度検出シグナルの低下を示し、このことは、28位と38位の間の配列を有するペプチドがキモトリプシン消化から抗体によって容易に保護されたことを示している。高い抗体対ミオスタチンのモル比(1:1に近い)では、タンパク質分解部位の大部分が保護された。ペプチドピークの大幅な減少が配列21~27位、30~31位、28~31位、32~38位および52~60位のペプチドについて観察され、そしてわずかな減少がペプチド87~95に観察された。その結果、高いUV吸光度を示す75分の新たなピーク(表6のペプチドP)が観察された。これらのデータは、21~31位および50~60位付近の配列に位置する、ミオスタチンにおける2つの領域が、上記ペプチドでのペプチド結合のキモトリプシン切断を防止するように抗体と密接に相互作用しており、したがって、ミオスタチンへの12A5-5の結合のために必要であることを示している。

10

20

#### 【0161】

(表6) CNBr、エンドプロテイナーゼLysCおよびキモトリプシン消化からの消化物のHP LCペプチドマッピング解析から単離されたミオスタチンペプチド

ペプチド ID	ペプチド名	保持時間 (分)	配列
A	天然ミオスタチン	85	1-109 (二量体)
B	CNBr処理ペプチド	58	85-101
C	CNBr処理ペプチド(シスチンノット)	80	1-80 & 102-109 (二量体)
D	還元CNBr処理ペプチド	58	85-101
E	還元CNBr処理ペプチド	80	1-80
F	LysC処理ペプチド	61	79-90
G	LysC処理ペプチド(シスチンノット)	76	1-36, 40-54, 55-78 & 98-109 (二量体)
H	還元LysC処理ペプチド	38	91-97
I	還元LysC処理ペプチド	43	55-78
J	還元LysC処理ペプチド	49	98-109
K	還元LysC処理ペプチド	60	40-54
L	還元LysC処理ペプチド	73	混ざった配列
M	還元LysC処理ペプチド	79	1-36
N	キモトリプシン処理ペプチド(シスチンノット)	67-77	1-20, 39-51, 63-82 & 96-109 (二量体)
O	還元ミオスタチン	83	1-109 (単量体)
P	キモトリプシン処理ペプチド (Ab保護シスチンノット)	75	1-20, 21-82 & 96-109 (二量体)

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 2 】

BIAcore(登録商標)結合アッセイ:

抗ミオスタチン中和モノクローナル抗体によって結合されるエピトープを特徴づけるための戦略は、CNBr、LysCおよびキモトリプシンにより生成された種々のヒトミオスタチンペプチドを使用すること、およびどのペプチドが該抗体によって結合され得るかを判定することであった。一側面において、それはBIAcore(登録商標)競合結合アッセイで試験され、そこでは、BIAcore(登録商標)チップ上に固定化されたヒトミオスタチンへの12A5-5の結合が、単離されたさまざまなHPLCペプチド画分のそれぞれの存在下または非存在下で測定された。競合ペプチドの非存在下では、12A5-5はチップ上のヒトミオスタチンに結合してRU(レゾナンスユニット)応答を生成することができた。溶液中のインタクトなヒトミオスタチンと12A5-5とのプレインキュベーションと、これに続くチップへの結合の試験は、溶液中のヒトミオスタチンへの抗体の結合がチップ上のヒトミオスタチンへの抗体の結合を阻止したことを実証したので、競合アッセイの一般原理が検証された。この一般的な手法を各ペプチドに対して個別に繰り返した。強いRU応答は、試験されている特定のペプチドが溶液中で12A5-5に結合できなかった(それゆえ、12A5-5はチップ上に固定化されていたヒトミオスタチンに自由に結合できた)ことを示す、と解釈された。反対に、強いRU応答がない場合は、12A5-5が溶液中のミオスタチンペプチドに結合できた(それゆえ、固定化されたミオスタチンに結合できなかった)ことを示した。これらの結合パターンは、種々のミオスタチンペプチドの既知の正体と合わせて、ミオスタチンのどの領域が抗体12A5-5の結合にとって重要(または必要)であるかを判定するために使用された。

## 【 0 1 6 3 】

図6は、非還元およびTCEP還元ペプチドサンプルについての結合アッセイをまとめたものである。ペプチドA(HPLCから回収されたミオスタチン二量体)、ペプチドC(シスチンノット二量体を含むCNBr処理ペプチド)、ペプチドE(還元CNBr処理ペプチド、配列1~80位)、ペプチドD(還元インタクトミオスタチン単量体;配列1~109位)、ペプチドG(シスチンノット二量体を含むLysC処理ペプチド、配列1~36、40~54、55~78および98~109位)、およびペプチドP(シスチンノット二量体を含む、抗体によって保護されたキモトリプシン処理ペプチド、配列1~20、21~82および96~109位)はすべて、BIAcore(登録商標)競合アッセイに基づいて、抗体に結合できる。ペプチドN(シスチンノット二量体を含むキモトリプシン処理ペプチド、配列1~20、39~51、63~82および96~109位)は抗体に結合できず、ペプチドGのTCEP還元から得られたペプチドを含めて、試験した他のペプチドのいずれも結合できなかった。また、同じことがペプチドM(結合に参与している、抗体保護アッセイで同定された配列を含む)についても言え、アミノ酸21と31の間の領域はミオスタチンへの12A5-5の結合のために必要であるが、十分ではないことが示される。

10

20

30

40

#### 【0164】

ペプチドA、C、EおよびGに結合する12A5-5の能力は、直接結合解析でさらに確認され、そこでは、これらのペプチドがBIAcore(登録商標)チップ上にペプチド表面を形成するために共有結合で固定化された。この実験では、25nMの抗体をペプチド表面上に80 $\mu$ l/分で2.5分間流し、続いてバッファを15分間流した。図7は、この解析のセンサーグラムを示す。抗体が固定化ペプチドと結合する結合相は約200秒で終了し、その時点は表面からの抗体の解離相の開始点であった。ペプチドA、C、Eおよびミオスタチンの平坦な解離相は、抗体とこれらのペプチドとの安定な複合体形成を示す一方で、ペプチドG表面上での解離相のシグナル減少は、抗体とペプチドGの間で形成された複合体がそれほど安定していないことを示した。ペプチドGをペプチドCと比較すると、抗体/ペプチドG複合体の安定性の減少は、ペプチドGのK54でのLysC切断が主な原因であるらしい(図4)が、ペプチドC(M78とM101の間のフラグメントを欠落している)のアミノ酸50~60付近の領域にはCNBr切断が存在しなかった。

#### 【0165】

ミオスタチンのK54の直前の配列がEFVFLQであるのに対し、GDF-11の対応する配列がEYMFQMであることは、注目に値する。以前の实验では、ミオスタチンのこの領域をGDF-11由来の対応領域で置き換えると、そのキメラ分子と抗体との相互作用が著しく減少した。このデータは、ミオスタチンのこの領域付近の切り出しが、12A5-5抗体と複合体を形成するその能力を低減させはするが、それが完全にその能力を無効にするわけではないことを示している。ミオスタチンに対する12A5-5の結合親和性が約2pMであるのに対し、GDF-11に対しては約180nMであることを考慮すると、この領域はミオスタチンへの抗体の特異的結合のために必要とされるようである。

#### 【0166】

上記のデータを合わせると、抗ミオスタチン中和抗体12A5-5へのミオスタチンの結合のために必要とされるミオスタチンにおける領域は、(図8に示される)21~31位および50~60位付近の配列に位置している。これら2つの領域は一次配列レベルでは距離的に遠いように見える。しかし、それらは、ミオスタチン/フォリスタチン複合体の共結晶構造により実証されるように(Cash et al., 前掲)、二量体の三次元構造では一緒に集合する。図8は、各ミオスタチン単量体が典型的なシスチンノット構造を形成している、三次元のミオスタチン二量体および単量体構造を示す。2つの単量体は互いに逆平行であり、2つの単量体間のCys73-Cys73ジスルフィド結合によってミオスタチン二量体を形成している。ミオスタチン二量体の逆平行構造は、一方の単量体からのL52/L60付近の領域を、他方の単量体のF27/W31付近の領域にごく接近させる。上記のデータは、抗体12A5-5がその強い結合活性を達成するために両方の領域を必要とすることを示唆している。



【配列表】

2013537425000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2011/047805

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/22 A61P19/08 A61P21/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/116269 A2 (PFIZER [US]; AMGEN FREMONT INC [US]; CHIN EVA ROSE [US]; IBEBUNJO CHIK) 2 November 2006 (2006-11-02) claim 15; figures 6,18; examples 8,12-15 -----	1-10, 13-21
X	WO 2004/037861 A2 (WYETH CORP [US]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; VELDMAN GEERTRUIDA M [U] 6 May 2004 (2004-05-06) examples 13,14 -----	1-10, 13-21
A	WO 2007/067616 A2 (AMGEN INC [US]; HAN HQ [US]; DEPAOLI ALEXANDER [US]; LU JOHN ZHAO-NIAN) 14 June 2007 (2007-06-14) examples 1-16 ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 November 2011		Date of mailing of the international search report 06/12/2011
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 Le Flao, Katell

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/047806

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/047805
---

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/101511 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; BALASA BALAJI [US]; TSURUSHITA NAOYA [US] 25 November 2004 (2004-11-25) example 6; sequence 46 -----	1-21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/047806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006116269	A2	02-11-2006	AR 053067 A1 18-04-2007
			AU 2006239860 A1 02-11-2006
			BR PI0610248 A2 08-06-2010
			CA 2605723 A1 02-11-2006
			CN 101272802 A 24-09-2008
			CR 9466 A 13-02-2008
			DO P2006000093 A 31-01-2007
			EA 200702327 A1 28-04-2008
			EP 1877075 A2 16-01-2008
			EP 2295466 A2 16-03-2011
			JP 2008539241 A 13-11-2008
			KR 20080011403 A 04-02-2008
			MA 29524 B1 02-06-2008
			NL 1031674 A1 27-10-2006
			NL 1031674 C2 26-04-2007
			NL 1033650 A1 16-05-2007
			NL 1033650 C2 12-01-2009
			NL 2002255 A1 26-03-2009
			NL 2002255 C2 24-09-2009
			PE 13952006 A1 15-01-2007
			US 2006263354 A1 23-11-2006
			US 2011091455 A1 21-04-2011
			WO 2006116269 A2 02-11-2006
ZA 200709291 A 28-01-2009			
WO 2004037861	A2	06-05-2004	AR 047392 A1 18-01-2006
			AU 2003274448 A1 13-05-2004
			BR 0315598 A 06-09-2005
			CA 2500490 A1 06-05-2004
			CN 1788019 A 14-06-2006
			CN 101220098 A 16-07-2008
			CN 101230102 A 30-07-2008
			CR 7786 A 21-10-2005
			EC SP055739 A 11-08-2005
			EC SP105739 A 29-06-2010
			EP 1554312 A2 20-07-2005
			IS 7770 A 23-03-2005
			JP 2006519583 A 31-08-2006
			JP 2010148513 A 08-07-2010
			KR 20050049558 A 25-05-2005
			MX PA05004225 A 20-09-2005
			NZ 539084 A 30-05-2008
			RU 2360925 C2 10-07-2009
			TW 201029665 A 16-08-2010
			TW 201029666 A 16-08-2010
			WO 2004037861 A2 06-05-2004
			ZA 200503249 A 28-11-2007
			WO 2007067616
AU 2010214673 A1 16-09-2010			
AU 2010214691 A1 16-09-2010			
CA 2632544 A1 14-06-2007			
EP 1968621 A2 17-09-2008			
JP 2009518422 A 07-05-2009			
WO 2007067616 A2 14-06-2007			
WO 2004101511	A2	25-11-2004	NONE

## 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 C 0 8 6
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハン エイチキュー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウザンド オークス クロスランド ストリート 3 3 5  
3

(72)発明者 アローラ タルナ

- アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウザンド オークス ピア ピサ 5380  
 (72)発明者 チェン チン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カマリロ エル キャピタン プレイス 4595  
 (72)発明者 ルー シェン セン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウエストレイク ビレッジ レインフィールド アベニュー  
 2758  
 (72)発明者 チョウ シャオラン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ニューベリー パーク ローディーン ストリート 387  
 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA04 DA02 EA04 GA11  
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44  
 4C084 AA13 MA01 NA14 ZA012 ZA022 ZA202 ZA222 ZA362 ZA812 ZA942  
 ZA962 ZA972 ZB212 ZC372 ZC412 ZC542  
 4C085 AA14 BB11 CC23 EE01  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA20  
 ZA22 ZA36 ZA81 ZA94 ZA96 ZA97 ZB21 ZC37 ZC41 ZC54  
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA01 NA14 ZA01 ZA02 ZA20 ZA22  
 ZA36 ZA81 ZA94 ZA96 ZA97 ZB21 ZC37 ZC41 ZC54  
 4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74