

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-105729

(P2011-105729A)

(43) 公開日 平成23年6月2日(2011.6.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-276055 (P2010-276055)	(71) 出願人	504196975
(22) 出願日	平成22年12月10日 (2010.12.10)		セルテック アール アンド ディー,
(62) 分割の表示	特願2006-517261 (P2006-517261)		インコーポレイテッド
原出願日	平成16年6月15日 (2004.6.15)		アメリカ合衆国 ワシントン 98021
(31) 優先権主張番号	60/478,977		, ボセル, 220ティーエイチ スト
(32) 優先日	平成15年6月16日 (2003.6.16)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨の鉱化作用を増大させるためのスクレロスチンに特異的な抗体および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 T G F - β 結合タンパク質に特異的に結合する抗体に関する組成物および方法を提供する。

【解決手段】 T G F - β 結合タンパク質スクレロスチンと、 T G F - β スーパーファミリーのメンバー (骨形態形成タンパク質) との間の相互作用を妨害することによる骨ミネラル密度の変化に係するスクレロスチン (S O S T) ポリペプチドを含む免疫原、あるいは S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはそのフラグメント。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S O S T ポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該 S O S T ポリペプチドは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含み、ここで、該抗体は、(i) 骨形態形成タンパク質 (BMP) I 型レセプター結合部位、および (ii) BMP II 型レセプター結合部位のうちの少なくとも 1 つに対する該 S O S T ポリペプチドの結合を競合的に阻害し、該 BMP I 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 NM_004329 (配列番号 71) ; D89675 (配列番号 72) ; NM_001203 (配列番号 73) ; S75359 (配列番号 74) ; NM_030849 (配列番号 75) ; D38082 (配列番号 76) ; NP_001194 (配列番号 77) ; BAA19765 (配列番号 78) ; および AAB33865 (配列番号 79) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP I 型レセプターポリペプチドに結合し得、該 BMP II 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 U25110 (配列番号 80) ; NM_033346 (配列番号 81) ; Z48923 (配列番号 83) ; CAA88759 (配列番号 84) ; および NM_001204 (配列番号 82) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP II 型レセプターポリペプチドに結合し得る、抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

前記抗体または前記その抗原結合フラグメントが、配列番号 2、3、4、5、6、12、13、14、15、21、22、25、26、47、48、49、および 50 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 3】

配列番号 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、47、48、49、および 50 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも 20 個のアミノ酸かつ多くても 75 個のアミノ酸のペプチドを用いて非ヒト動物を免疫することによって産生される、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体は、S O S T ポリペプチドに特異的に結合し、該 S O S T ポリペプチドは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 5】

請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該抗体は、(i) 骨形態形成タンパク質 (BMP) I 型レセプター結合部位、および (ii) BMP II 型レセプター結合部位のうちの少なくとも 1 つに対する該 S O S T ポリペプチドの結合を競合的に阻害し、該 BMP I 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 NM_004329 (配列番号 71) ; D89675 (配列番号 72) ; NM_001203 (配列番号 73) ; S75359 (配列番号 74) ; NM_030849 (配列番号 75) ; D38082 (配列番号 76) ; NP_001194 (配列番号 77) ; BAA19765 (配列番号 78) ; および AAB33865 (配列番号 79) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP I 型レセプターポリペプチドに結合し得、該 BMP II 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 U25110 (配列番号 80) ; NM_033346 (配列番号 81) ; Z48923 (配列番号 83) ; CAA88759 (配列番号 84) ; および NM_001204 (配列番号 82) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP II 型レセプターポリペプチドに結合し得る、抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 6】

50

配列番号 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、47、48、49、および 50 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも 20 個のアミノ酸かつ多くても 75 個のアミノ酸のペプチドを用いて非ヒト動物を免疫することによって産生される、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体は、SOST ポリペプチドに特異的に結合し、該 SOST ポリペプチドは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含み、該抗体は、(i) 骨形態形成タンパク質 (BMP) I 型レセプター結合部位、および (ii) BMP II 型レセプター結合部位のうちの少なくとも 1 つに対する該 SOST ポリペプチドの結合を競合的に阻害し、該 BMP I 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 NM_004329 (配列番号 71) ; D89675 (配列番号 72) ; NM_001203 (配列番号 73) ; S75359 (配列番号 74) ; NM_030849 (配列番号 75) ; D38082 (配列番号 76) ; NP_001194 (配列番号 77) ; BAA19765 (配列番号 78) ; および AAB33865 (配列番号 79) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP I 型レセプターポリペプチドに結合し得、該 BMP II 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 U25110 (配列番号 80) ; NM_033346 (配列番号 81) ; Z48923 (配列番号 83) ; CAA88759 (配列番号 84) ; および NM_001204 (配列番号 82) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP II 型レセプターポリペプチドに結合し得る、抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

20

【請求項 7】

SOST ポリペプチドに特異的に結合して、SOST ホモ二量体の形成を妨害する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該 SOST ポリペプチドは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記抗体が、配列番号 29、30、31、33、34、35、36、41、42、43、51、52、53、および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

配列番号 29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、51、52、53、および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも 20 個のアミノ酸かつ多くても 75 個のアミノ酸のペプチドを用いて非ヒト動物を免疫することによって産生される、抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 10】

前記抗体または前記その抗原結合フラグメントが、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含む SOST ポリペプチドに特異的に結合する、請求項 9 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

前記抗体または前記その抗原結合フラグメントが、SOST ホモ二量体の形成を妨害する、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 12】

配列番号 29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、51、52、53、および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも 20 個のアミノ酸かつ多くても 75 個のアミノ酸のペプチドを用いて非ヒト動物を免疫することによって産生される、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体または該その抗原結合フラグメントは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含む SOST ポリペプチドに特異的に結合し、該抗体は、SOST ホモ二量体の形成を妨害する、抗

50

体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

前記抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記モノクローナル抗体が、マウスモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、およびハムスターモノクローナル抗体からなる群より選択される。請求項 14 に記載の抗体。

10

【請求項 16】

請求項 14 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の抗体を発現し得る宿主細胞。

【請求項 18】

前記抗体が、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の抗体を発現し得る宿主細胞。

20

【請求項 20】

前記抗原結合フラグメントが、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F d$ 、および $F v$ からなる群より選択される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 21】

単鎖抗体を含む、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の抗体を発現し得る宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに生理学的に受容可能なキャリアを含有する組成物。

30

【請求項 24】

S O S T ポリペプチドの 6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、または 12 個の連続アミノ酸を含むペプチドを含む免疫原であって、該 S O S T ポリペプチドは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含み、ここで、該ペプチドは、S O S T ポリペプチドに特異的に結合して、(i) 骨形態形成タンパク質 (BMP) I 型レセプター結合部位、および (ii) BMP II 型レセプター結合部位のうちの少なくとも 1 つに対する該 S O S T ポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体を、非ヒト動物中で誘発し得、該 BMP I 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 NM_004329 (配列番号 71) ; D89675 (配列番号 72) ; NM_001203 (配列番号 73) ; S75359 (配列番号 74) ; NM_030849 (配列番号 75) ; D38082 (配列番号 76) ; NP_001194 (配列番号 77) ; BA A19765 (配列番号 78) ; および A A B33865 (配列番号 79) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP I 型レセプターポリペプチドに結合し得、該 BMP II 型レセプター結合部位は、GenBank 登録番号 U25110 (配列番号 80) ; NM_033346 (配列番号 81) ; Z48923 (配列番号 83) ; C A A88759 (配列番号 84) ; および NM_001204 (配列番号 82) からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含む BMP II 型レセプターポリペプチドに結合し得る、免疫原。

40

【請求項 25】

S O S T ポリペプチドの少なくとも 21 個の連続アミノ酸かつ多くても 50 個の連続ア

50

ミノ酸を含むペプチドを含む免疫原であって、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、ここで、該ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合して、(i)骨形態形成タンパク質(BMP)I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位のうちの少なくとも1つに対する該SOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体を、非ヒト動物中で誘発し得、該BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329(配列番号71); D89675(配列番号72); NM_001203(配列番号73); S75359(配列番号74); NM_030849(配列番号75); D38082(配列番号76); NP_001194(配列番号77); BAA19765(配列番号78); およびAAB33865(配列番号79)からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合し得、該BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110(配列番号80); NM_033346(配列番号81); Z48923(配列番号83); CAA88759(配列番号84); およびNM_001204(配列番号82)からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチドに結合し得る、免疫原。

10

【請求項26】

配列番号2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、47、48、49、および50からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも20個のアミノ酸かつ多くても75個のアミノ酸のペプチドを含む免疫原。

20

【請求項27】

前記ペプチドが、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を非ヒト動物中で誘発し得る、請求項26に記載の免疫原であって、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含む、免疫原。

【請求項28】

前記抗体が、(i)骨形態形成タンパク質(BMP)I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位のうちの少なくとも1つに対する前記SOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する、請求項27に記載の免疫原であって、ここで、該BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329(配列番号71); D89675(配列番号72); NM_001203(配列番号73); S75359(配列番号74); NM_030849(配列番号75); D38082(配列番号76); NP_001194(配列番号77); BAA19765(配列番号78); およびAAB33865(配列番号79)からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合し得、該BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110(配列番号80); NM_033346(配列番号81); Z48923(配列番号83); CAA88759(配列番号84); およびNM_001204(配列番号82)からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチドに結合し得る、免疫原。

30

40

【請求項29】

配列番号2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、47、48、49、および50からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも20個のアミノ酸かつ多くても75個のアミノ酸のペプチドを含む免疫原であって、ここで、該ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を非ヒト動物中で誘発し得、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、該抗体は、(i)骨形態形成タンパク質(BMP)I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位のうちの少なくとも1つに対する該SOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害し、該BMP I型レセプター結

50

合部位は、GenBank登録番号NM__004329（配列番号71）；D89675（配列番号72）；NM__001203（配列番号73）；S75359（配列番号74）；NM__030849（配列番号75）；D38082（配列番号76）；NP__001194（配列番号77）；BAA19765（配列番号78）；およびAAB33865（配列番号79）からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合し得、該BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110（配列番号80）；NM__033346（配列番号81）；Z48923（配列番号83）；CAA88759（配列番号84）；およびNM__001204（配列番号82）からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合し得る、免疫原。

10

【請求項30】

配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、51、52、53、および54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも20個のアミノ酸かつ多くても75個のアミノ酸のペプチドを含む免疫原。

【請求項31】

前記ペプチドが、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を非ヒト動物中で誘発し得る、請求項30に記載の免疫原であって、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含む、免疫原。

【請求項32】

20

前記抗体が、SOSTホモ二量体の形成を妨害する、請求項31に記載の免疫原。

【請求項33】

配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、51、52、53、および54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも20個のアミノ酸かつ多くても75個のアミノ酸のペプチドを含む免疫原であって、ここで、該ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を非ヒト動物中で誘発し得、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、該抗体は、SOSTホモ二量体の形成を妨害する、免疫原。

【請求項34】

30

SOSTポリペプチドの6個、7個、8個、9個、10個、11個、または12個の連続アミノ酸を含むペプチドを含む免疫原であって、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、ここで、該ペプチドは、該SOSTポリペプチドに特異的に結合して、SOSTホモ二量体の形成を妨害する抗体を非ヒト動物中で誘発し得る、免疫原。

【請求項35】

SOSTポリペプチドの少なくとも21個の連続アミノ酸かつ多くても50個の連続アミノ酸を含むペプチドを含む免疫原であって、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、ここで、該ペプチドは、該SOSTポリペプチドに特異的に結合してSOSTホモ二量体の形成を妨害する抗体を非ヒト動物中で誘発し得る、免疫原。

40

【請求項36】

前記ペプチドが、キャリア分子と会合している、請求項24～35のいずれか1項に記載の免疫原。

【請求項37】

前記キャリア分子が、キャリアポリペプチドである、請求項36に記載の免疫原。

【請求項38】

前記キャリアポリペプチドが、キーホールリンペットヘモシアニンである、請求項37に記載の免疫原。

【請求項39】

50

S O S Tポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法であって、該方法は、請求項24～29のいずれか1項に記載の免疫原で非ヒト動物を免疫する工程を包含し、ここで、(a)該S O S Tポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み；(b)該抗体は、(i)骨形態形成タンパク質(BMP)I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位のうちの少なくとも1つに対する該S O S Tポリペプチドの結合を競合的に阻害し；(c)該BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329(配列番号71)；D89675(配列番号72)；NM_001203(配列番号73)；S75359(配列番号74)；NM_030849(配列番号75)；D38082(配列番号76)；NP_001194(配列番号77)；BAA19765(配列番号78)；およびAAB33865(配列番号79)からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合し得；そして(d)該BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110(配列番号80)；NM_033346(配列番号81)；Z48923(配列番号83)；CAA88759(配列番号84)；およびNM_001204(配列番号82)からなる群より選択される配列に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチドに結合し得る、方法。

10

【請求項40】

S O S Tポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法であって、該S O S Tポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、該方法は、請求項30～35のいずれか1項に記載の免疫原で非ヒト動物を免疫する工程を包含し、ここで、該抗体は、S O S Tホモ二量体の形成を妨害する、方法。

20

【請求項41】

TGF- β シグナル伝達経路を調節する抗体を同定するための方法であって、該方法は、

(a)抗体/S O S Tペプチド複合体を形成させるために十分な条件下および時間の間、配列番号1、20、58、60、62、および68のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むS O S Tポリペプチドに特異的に結合する抗体と、配列番号2～19、および21～54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのS O S Tポリペプチドとを接触させる工程；ならびに

30

(b)抗体/S O S Tペプチド複合体の濃度を検出して、それにより、TGF- β シグナル伝達経路を調節する抗体の存在を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項42】

S O S Tポリペプチドに対するBMPの結合を妨害する抗体を同定するための方法であって、該方法は、

(a)抗体/S O S Tペプチド複合体を形成させるために十分な条件下および時間の間、(i)配列番号1、20、58、60、62、および68のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むS O S Tポリペプチドに特異的に結合する抗体と、(ii)配列番号2～19、21～28、および47～50からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのS O S Tペプチドとを接触させる工程；ならびに

40

(b)抗体/S O S Tペプチド複合体の濃度を検出して、それにより、S O S Tポリペプチドに対するBMPの結合を妨害する抗体の存在を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項43】

S O S Tホモ二量体の形成を妨害する抗体を同定するための方法であって、該方法は、(a)(i)抗体/S O S Tペプチド複合体を形成させるために十分な条件下および時間の間、配列番号1、20、58、60、62、および68のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むS O S Tポリペプチドに特異的に結合する抗体と、(ii)配列番号29

50

～46、および51～54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのSOSTペプチドとを接触させる工程；ならびに

(b) 抗体／SOSTペプチド複合体の濃度を検出し、それにより、SOSTホモ二量体の形成を妨害する抗体の存在を検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項44】

骨のミネラル含有量を増大させる抗体を同定するための方法であって、該方法は、

(a) 抗体／SOSTペプチド複合体を形成させるために十分な条件下および時間の間、
(i) 配列番号1、20、58、60、62、および68のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むSOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体と、(ii) 配列番号2～19、および21～54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのSOSTペプチドとを接触させる工程；ならびに

(b) 抗体／SOSTペプチド複合体の濃度を検出し、それにより、骨のミネラル含有量を増大させる抗体の存在を検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項45】

前記抗体が、生物学的サンプル中に存在する抗体、および精製された抗体からなる群より選択される、請求項41～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

前記精製された抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および抗体の抗原結合フラグメントからなる群より選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記ポリペプチドが、配列番号5、6、および14からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項2に記載の抗体。

【請求項48】

前記ペプチドが、配列番号5、6、10、11、14、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項3～6のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項49】

前記ペプチドが、配列番号5、6、10、11、14、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項26～29のいずれか1項に記載の免疫原。

【請求項50】

SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生する方法であって、該方法は、請求項49に記載の免疫原を用いて非ヒト動物を免疫する工程を包含し、ここで、該SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、28、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項51】

前記SOSTペプチドが、配列番号5、6、10、11、14、および18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項41、42、および44のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全体的に、医薬品および方法、そしてさらに具体的には、骨のミネラル含有量を増大することに適している方法およびスクレロスチン(sclerostin)特異的抗体に関する。このような組成物および方法は、例えば、骨減少症、骨粗鬆症、骨折、および骨ミネラル密度が低いことが疾患の特徴である他の障害を含む広い範囲の種々の状態を処置するために使用することができる。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

個体の生涯全体にわたって、骨量が増加する時期は2または3期存在する（R i g g s , W e s t J . M e d . 1 5 4 : 6 3 - 7 7 (1 9 9 1) 参照。）。第1期は男性と女性のいずれにも存在し、骨量がピークに到達するように進行する。この第1期は、軟骨成長板の直線方向の成長と、骨周辺の接合速度に応じた放射方向の成長とを通じて達成される。第2期は、骨梁（脊椎および骨盤のような扁平骨）についてはおよそ30歳で、皮質骨（例えば、手足に見られる長い骨）についてはおよそ40歳で始まり、老年期まで続く。この期はゆっくりとした骨量の減少が特徴的であり、男性および女性のいずれにも存在する。女性には、骨量が減少する第3期もまた存在し、これは、ほぼおそらく、閉経後のエストロゲンの不足が原因である。この期の間だけで、女性は皮質骨の骨量のさらに10%を、そして骨梁部分からは25%を失う（R i g g s , 前出を参照のこと。）。 10

【0003】

骨ミネラル含有量の減少は、広い範囲の種々の状態によって引き起こされ得、そして有意な医学的問題を生じる場合がある。例えば、骨粗鬆症は、ヒトにおいては衰弱性疾患であり、骨格の骨量とミネラル密度の顕著な減少、骨の構造の変質（骨微細構造の崩壊およびこれに対応する骨形成不全の増大を含む）、ならびに罹患個体の骨折しやすさによって特徴付けられる。ヒトの骨粗鬆症には、臨床的な骨減少症が先に生じ（若い成人の骨についての骨のミネラル密度の平均値より1標準偏差以上大きく2.5標準偏差未満である骨ミネラル密度）この状態は、米国においておよそ2500万人に見られる。米国ではさらに700～800万人の患者が臨床的な骨粗鬆症であると診断されている（若い成人の骨の骨ミネラル密度よりも2.5標準偏差以上大きい骨ミネラル密度として定義される）。 20
骨粗鬆症は、医療制度に関して最も費用のかかる疾患の一つであり、米国においては毎年数十億ドルの負担となっている。医療に関するコストに加えて、長期間にわたる治療、および休業日数が、この疾患の財務費用および社会的費用を増大させている。世界中では、およそ7500万人が骨粗鬆症のリスクを有している。

【0004】

ヒトの集団における骨粗鬆症の頻度は年齢とともに増大する。白人については、骨粗鬆症は、女性に顕著であり、米国においては、骨粗鬆症患者の集団のうちの80%を占める。高齢者における骨形成不全の増加と、骨格の骨の骨折しやすさは、この集団における不慮の落下のリスクがより大きいことによりいっそう追い討ちをかけられる。150万以上の骨粗鬆症に関連する骨折が、毎年米国において報告されている。腰、手首、および脊椎の骨折は、中でも、骨粗鬆症に関係している最も一般的なけがである。腰椎の骨折は特に、患者にとって極めて厄介であり、お金がかかり、女性にとっては死亡率および罹患率の高さに関係している。 30

【0005】

骨粗鬆症は、骨量の減少が原因で骨折のリスクが増大すると認識されているが、成人の骨密度を実質的に増大させることができる骨障害について有効な処置は現在存在していない。多くの医師の間では、成人において、特に、骨減少症や骨粗鬆症のリスクがある手首、脊柱、および腰の骨において、骨密度を増大させることができる薬剤が必要とされているとの強い認識がある。 40

【0006】

骨粗鬆症の予防のための現在の方針は、個体にいくらかの利点をもたらす得るが、疾患の解決を確実にすることはできない。これらの方針には、高齢の始まりに伴う身体活動（特に、体重の負荷がかかる活動）を調節すること、食事に適正なカルシウムを供給すること、およびアルコールまたはタバコを含む製品の消費を避けることが含まれる。臨床的な骨減少症または骨粗鬆症を示している患者については、一般的な現行の治療薬と方針が、常時行われる骨再形成のプロセスについての自然なままの局面である骨吸収のプロセスを阻害することにより、骨量のさらなる減少を少なくするように行われる。 40

【0007】

例えば、エストロゲンは、現在、骨量の減少を遅らせるために処方されている。しかし、患者が何らかの長期的な利点を獲得したかどうか、およびエストロゲンが75歳以上の 50

患者に対して全く効果がないのではないかという点に関して、いくつかの議論がある。さらには、エストロゲンの使用は、乳ガンおよび子宮内膜ガンのリスクを増大させると考えられている。カルシトニン、ビタミンKを伴うオステオカルシン、またはビタミンDを伴う高用量の食事療法用のカルシウム、ビタミンDを伴わない高用量の食事療法用のカルシウムもまた、閉経後の女性について提案されている。しかし、高用量のカルシウムは、多くの場合に不快な胃腸の副作用を生じ得、血清カルシウム濃度と尿中カルシウム濃度を持続的にモニターしなければならない（例えば、Khosla and Riggs, Mayo Clin. Proc. 70:978-982, 1995を参照のこと）。

【0008】

骨粗鬆症についての他の治療アプローチとしては、ビスホスフォネート（例えば、フォサマックス（Fosamax）TM、アクトネル（Actonel）TM、ボンビバ（Bonviva）TM、ゾメタ（Zometa）TM、オルパドロネート、ネリドロネート、スケリド（skelid）、ボネフォス）、副甲状腺ホルモン、カルシウム拮抗分子（calcilytics）カルシウム受動体作動薬（calcimimetics）（例えば、シナカルセット）、スタチン、アナボリックステロイド、ランタン塩およびストロンチウム塩、ならびにフッ化ナトリウムが挙げられる。しかし、このような治療薬には、多くの場合、望ましくない副作用が伴い（例えば、骨密度は穏やかに増大させるが、カルシトニンやステロイドは吐き気を引き起こし、免疫反応を誘発する場合があります、ビスホスフォネートやフッ化ナトリウムは骨折の修復を阻害する場合があります）、これは、それらの有効な使用の妨げとなり得る（例えば、Khosla and Riggs、前出を参照のこと）。

【0009】

過剰なまたは不十分な骨鉱化作用に関係している状態、例えば、骨粗鬆症または骨鉱化作用が少ないことを特徴とする他の障害を処置するための現在行われている治療方針には、骨量を変化させる（すなわち、統計学的に有意な様式で増加もしくは減少させる）薬剤は含まれていない。特に、現行の方針では、新しい骨量の成長を治療的に刺激または増強させてはいない。本発明は、骨鉱化作用を増加させるために使用することができ、したがって、骨量の増加が望まれる広い範囲の種々の状態を処置するために使用されるであろう組成物および方法を提供する。本発明はまた、他の関連する利点を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

簡潔に述べると、本発明により、TGF- β 結合タンパク質であるスクロスチン（SOST）に特異的に結合する抗体が提供され、骨形態形成タンパク質のようなTGF- β スーパーファミリーのメンバーと相互作用するSOSTの領域に由来するSOSTペプチドを含む免疫原が提供される。1つの実施形態においては、本発明により、SOSTポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。SOSTポリペプチドには、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列が含まれる。ここでは抗体は、(i)骨形態形成タンパク質（BMP）I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位の少なくとも1つに対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する。BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329（配列番号71）；D89675（配列番号72）；NM_001203（配列番号73）；S75359（配列番号74）；NM_030849（配列番号75）；D38082（配列番号76）；NP_001194（配列番号77）；BAA19765（配列番号78）；またはAAB33865（配列番号79）に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合することができる。BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110（配列番号80）；NM_033346（配列番号81）；Z48923（配列番号83）；CAA88759（配列番号84）；またはNM_001204（配列番号82）に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチ

ドに結合することができる。特定の実施形態においては、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 2～6、12～15、21、22、25、26、47、48、49、または 50 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合し、そして他の特定の実施形態においては、抗体は、配列番号 5、6、または 14 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する。

【0011】

1つの実施形態においては、本発明により、配列番号 2～19、21～28、または 47～50 のアミノ酸配列を含む、少なくとも 20 個のアミノ酸であって 75 個を超えないアミノ酸のペプチドで、非ヒト動物を免疫することによって産生される、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。ここで、抗体は、SOST ポリペプチドに特異的に結合し、SOST ポリペプチドには、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列が含まれる。ここでは抗体は、(i) 骨形態形成タンパク質 (BMP) I 型レセプター結合部位、および (ii) BMP II 型レセプター結合部位の少なくとも 1 つに対する SOST ポリペプチドの結合を競合的に阻害する。BMP I 型レセプター結合部位は、BMP I 型レセプターポリペプチド (本明細書中に提供される GenBank 配列のいずれか 1 つに示される) に結合することができ、BMP II 型レセプター結合部位は、BMP II 型レセプターポリペプチド (本明細書中に提供される GenBank 配列のいずれか 1 つに示される) に結合することができる。特定の実施形態においては、抗体は、配列番号 5、6、10、11、14、または 18 のアミノ酸配列を含む、少なくとも 20 個のアミノ酸であって 75 個を超えないアミノ酸のペプチドで、非ヒト動物を免疫することによって産生される。

【0012】

本発明により、さらに、SOST ポリペプチドに特異的に結合して SOST ホモ二量体の形成を妨害する、抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。SOST ポリペプチドには、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列が含まれ、抗体は、配列番号 29～31、33～36、41～43、または 51～54 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する。

【0013】

別の実施形態においては、本発明により、配列番号 29～46、51、52、53、または 54 のアミノ酸配列を含む少なくとも 20 個のアミノ酸であって 75 個を超えないアミノ酸のペプチドで、非ヒト動物を免疫することによって産生される、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。ここで、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示されるアミノ酸配列を含む SOST ポリペプチドに特異的に結合し、抗体は SOST ホモ二量体の形成を妨害する。

【0014】

本発明の特定の具体的な実施形態においては、抗体はポリクローナル抗体である。他の実施形態においては、抗体はモノクローナル抗体であり、これはマウス、ヒト、ラット、またはハムスターのモノクローナル抗体である。本発明により、また、モノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞または宿主細胞も提供される。本発明の他の実施形態においては、抗体はヒト化抗体またはキメラ抗体である。本発明により、さらに、ヒト化抗体またはキメラ抗体を産生する宿主細胞が提供される。特定の実施形態においては、抗体の抗原結合フラグメントは、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fd 、または Fv フラグメントである。本発明により、また、単鎖抗体である抗体が提供され、そして単鎖抗体を発現することができる宿主細胞も提供される。別の実施形態においては、本発明により、このような抗体と生理学的に受容可能なキャリアを含む組成物が提供される。

【0015】

本発明により、SOST ポリペプチドの 6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、または 12 個の連続しているアミノ酸を含むペプチドを含む免疫原が提供される。ここで、

SOSTポリペプチドには、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列が含まれ、ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合して、(i) 骨形態形成タンパク質(BMP) I型レセプター結合部位、および(ii) BMP I型レセプター結合部位の少なくとも1つに対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体を、非ヒト動物中で誘発することができる。BMP I型レセプター結合部位は、BMP I型レセプターポリペプチドに結合することができ、BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329(配列番号71); D89675(配列番号72); NM_001203(配列番号73); S75359(配列番号74); NM_030849(配列番号75); D38082(配列番号76); NP_001194(配列番号77); BAA19765(配列番号78); またはBAB33865(配列番号79)に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合することができる。BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110(配列番号80); NM_033346(配列番号81); Z48923(配列番号83); CAA88759(配列番号84); またはNM_001204(配列番号82)に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチドに結合することができる。

【0016】

別の実施形態においては、免疫原には、SOSTポリペプチドの少なくとも21個の連続しているアミノ酸であって、50個を超えない連続しているアミノ酸を含むペプチドが含まれる。上記SOSTポリペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含み、ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合して、(i) 骨形態形成タンパク質(BMP) I型レセプター結合部位、および(ii) BMP II型レセプター結合部位の少なくとも1つに対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体を、非ヒト動物中で誘発することができる。BMP I型レセプター結合部位は、BMP I型レセプターポリペプチド(本明細書中に提供されるGenBank配列のいずれか1つに示される)に結合することができ、BMP II型レセプター結合部位は、BMP II型レセプターポリペプチド(本明細書中に提供されるGenBank配列のいずれか1つに示される)に結合することができる。

【0017】

特定の実施形態においては、本発明により、配列番号2~19、21~28、または47、48、49、50のアミノ酸配列を含む、少なくとも20個のアミノ酸であって75個を超えないアミノ酸のペプチドを含む免疫原が提供される。ペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含むSOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を非ヒト動物中で誘発することができ、抗体は、(i) 骨形態形成タンパク質(BMP) I型レセプター結合部位、および(ii) BMP II型レセプター結合部位の少なくとも1つに対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する。BMP I型レセプター結合部位は、BMP I型レセプターポリペプチドに結合することができ、BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329(配列番号71); D89675(配列番号72); NM_001203(配列番号73); S75359(配列番号74); NM_030849(配列番号75); D38082(配列番号76); NP_001194(配列番号77); BAA19765(配列番号78); またはBAB33865(配列番号79)に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合することができる。BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110(配列番号80); NM_033346(配列番号81); Z48923(配列番号83); CAA88759(配列番号84); またはNM_001204(配列番号82)に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチドに結合することができる。特定の実施形態においては、本発明により、配列番号5、6、10、11、14、または18のアミノ酸配列を含む、少なくとも20個のアミノ酸であって75個を超えないアミノ酸のペプチドを含む免疫原が提供される。

【0018】

本発明により、また、配列番号29～46、51、52、53、または54のアミノ酸配列を含む少なくとも20個のアミノ酸であって75個を超えないアミノ酸のペプチドを含む免疫原が提供される。ペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含むSOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を非ヒト動物中で誘発することができる。抗体は、SOSTホモ二量体の形成を妨害する。別の実施形態においては、免疫原には、SOSTポリペプチドの6個、7個、8個、9個、10個、11個、または12個の連続しているアミノ酸を含むペプチドが含まれる。SOSTポリペプチドには、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列が含まれ、ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合してSOSTホモ二量体の形成を妨害する抗体を非ヒト動物中で誘発することができる。特定の実施形態においては、本発明により、配列番号1、20、58、60、62、または68を含むSOSTポリペプチドの少なくとも21個の連続しているアミノ酸であって、50個を超えない連続しているアミノ酸を含むペプチドを含む免疫原が提供される。ペプチドは、SOSTポリペプチドに特異的に結合してSOSTホモ二量体の形成を妨害する抗体を非ヒト動物中で誘発することができる。

10

【0019】

特定の具体的な実施形態においては、本発明の免疫原は、キャリア分子と会合させられる。特定の実施形態においては、キャリア分子は、キャリアポリペプチドであり、特定の実施形態においては、キャリアポリペプチドはキーホールリンペットヘモシアニンである。

20

【0020】

本発明により、また、配列番号1、20、58、60、62、または68に示される配列を有しているSOSTポリペプチドの6個、7個、8個、9個、10個、11個、または12個の連続しているアミノ酸のペプチド、あるいは、少なくとも21個の連続しているアミノ酸であって50個を超えない連続しているアミノ酸を含む免疫原で非ヒト動物を免疫することを含む、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法が提供される。この免疫原は、SOSTポリペプチドに特異的に結合して、(i)骨形態形成タンパク質(BMP)I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位の少なくとも1つに対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体を、非ヒト動物中で誘発することができる。BMP I型レセプター結合部位は、BMP I型レセプターポリペプチドに結合することができ、BMP I型レセプター結合部位は、BMP I型レセプターポリペプチドに結合することができ、BMP I型レセプター結合部位は、GenBank登録番号NM_004329(配列番号71)；D89675(配列番号72)；NM_001203(配列番号73)；S75359(配列番号74)；NM_030849(配列番号75)；D38082(配列番号76)；NP_001194(配列番号77)；BAA19765(配列番号78)；またはAAB33865(配列番号79)に示されるアミノ酸配列を含むBMP I型レセプターポリペプチドに結合することができる。BMP II型レセプター結合部位は、GenBank登録番号U25110(配列番号80)；NM_033346(配列番号81)；Z48923(配列番号83)；CAA88759(配列番号84)；またはNM_001204(配列番号82)に示されるアミノ酸配列を含むBMP II型レセプターポリペプチドに結合することができる。別の実施形態においては、本発明により、配列番号2～19、21～28、47、48、49、または50のアミノ酸配列を含む少なくとも20個のアミノ酸であって75個を超えないアミノ酸のペプチドを含む免疫原で、非ヒト動物を免疫することを含む、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法が提供される。ペプチドは、配列番号1、20、58、60、62、または68に示されるアミノ酸配列を含むSOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体を、非ヒト動物中で誘発することができる。抗体は、(i)骨形態形成タンパク質(BMP)I型レセプター結合部位、および(ii)BMP II型レセプター結合部位の少なくとも1つに対す

30

40

50

る S O S T ポリペプチドの結合を競合的に阻害する。B M P I 型レセプター結合部位は、B M P I 型レセプターポリペプチドに結合することができる。特定の実施形態においては、免疫原には、配列番号 5、6、10、11、14、または 18 のアミノ酸配列を含む少なくとも 20 個のアミノ酸であって 75 個を超えないアミノ酸のペプチドが含まれる。

【0021】

他の好ましい実施形態においては、本発明により、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 に示される配列を有している S O S T ポリペプチドの 6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、または 12 個の連続しているアミノ酸のペプチド、あるいは、少なくとも 21 個の連続しているアミノ酸であって 50 個を超えない連続しているアミノ酸を含む免疫原で非ヒト動物を免疫することを含む、S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法が提供される。この免疫原は、S O S T ポリペプチドに特異的に結合して S O S T ホモ二量体の形成を妨害することができる抗体を、非ヒト動物中で誘発することができる。別の実施形態においては、本発明により、配列番号 29～46、51、52、53、または 54 のアミノ酸配列を含む少なくとも 20 個のアミノ酸であって 75 個を超えないアミノ酸のペプチドを含む免疫原で非ヒト動物を免疫することを含む、S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法が提供される。ペプチドは、S O S T ポリペプチドに特異的に結合して S O S T ホモ二量体の形成を妨害する抗体を非ヒト動物中で誘発することができる。

【0022】

本発明により、また、T G F - β シグナル伝達経路を調節する抗体を同定するための方法が提供される。この方法には、配列番号 1、20、58、60、62、または 68 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、配列番号 2～19、または 21～54 のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの S O S T ペプチドと、抗体 / S O S T ペプチド複合体を形成させるために十分な条件下で、十分な時間の間、接触させること；ならびに、抗体 / S O S T ペプチド複合体の濃度を検出すること、そしてそれにより、T G F - β シグナル伝達経路を調節する抗体の存在を検出することが含まれる。別の実施形態においては、本発明により、B M P の S O S T ポリペプチドに対する結合を妨害する抗体を同定するための方法が提供される。この方法には、(i) 配列番号 1、20、58、60、62、または 68 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、(i i) 配列番号 2～19、21～28、または 47～50 のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの S O S T ペプチドと、抗体 / S O S T ペプチド複合体を形成させるために十分な条件下で、十分な時間の間、接触させること；ならびに、抗体 / S O S T ペプチド複合体の濃度を検出すること、そしてそれにより、S O S T ポリペプチドに対する B M P の結合を妨害する抗体の存在を検出することが含まれる。T G F - β シグナル伝達経路を調節する抗体を同定するため、および S O S T ポリペプチドに対する B M P に結合を妨害する抗体を同定するための方法の特定の実施形態においては、S O S T ペプチドには、配列番号 5、6、10、11、14、または 18 のアミノ酸配列が含まれる。

【0023】

別の実施形態においては、本発明により、S O S T ホモ二量体の形成を妨害する抗体を同定するための方法が提供される。この方法には、(i) 配列番号 1、20、58、60、62、または 68 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、(i i) 配列番号 29～46 または 51～54 のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの S O S T ペプチドと、抗体 / S O S T ペプチド複合体を形成させるために十分な条件下で、十分な時間の間、接触させること；ならびに、抗体 / S O S T ペプチド複合体の濃度を検出すること、そしてそれにより、S O S T ホモ二量体の形成を妨害する抗体の存在を検出することが含まれる。

【0024】

別の実施形態においては、本発明により、骨ミネラル密度を増大させる抗体を同定する

ための方法が提供される。この方法には、(i) 配列番号 1、20、58、60、62、または 68 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む SOST ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、(ii) 配列番号 2~19、または 21~54 のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの SOST ペプチドと、抗体/SOST ペプチド複合体を形成させるために十分な条件下で、十分な時間の間、接触させること；ならびに、抗体/SOST ペプチド複合体の濃度を検出すること、そしてそれにより、骨ミネラル含有量を増大させる抗体の存在を検出することが含まれる。特定の実施形態においては、ペプチドには、配列番号 5、6、10、11、14、または 18 のアミノ酸配列が含まれる。

【0025】

TGF- β シグナル伝達経路を調節する抗体を同定するため、SOST ポリペプチドに対する BMP の結合を妨げる抗体を同定するため、SOST ホモ二量体の形成を妨害する抗体を同定するため、または骨ミネラル含有量を増大させる抗体を同定するためのある特定の実施形態においては、抗体は、生物学的サンプル中に存在するか、または抗体は精製された抗体である。特定の実施形態においては、精製された抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはこれらの抗体のいずれかの抗原結合フラグメントである。

【0026】

本発明のこれらおよび他の実施形態は、以下の詳細な説明と添付の図面を参照して明らかにされる。本明細書中で開示される全ての参考文献は、それぞれが個々に組み込まれているかのように、それらの全体に関して引用により本明細書中に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図 1】図 1 は、SOST ポリペプチドとその最も近いホモログについて、特徴的なシスチンノットを含む領域のアラインメントを示す。シスチンノットを形成する 3 つのジスルフィド結合が実線で示される。点線で示されるそれ以外のジスルフィド結合は、このファミリーに特有のものであり、これにより 3D 構造中の 2 つの β -ヘアピンチップを繋ぐ。示されるポリペプチドは、SOST：スクレロスチン（配列番号 95）；CGHB：ヒト絨毛性ゴナドトロピン β （配列番号 96）；FSHB：卵胞刺激ホルモン β サブユニット（配列番号 97）；TSHB：甲状腺刺激ホルモン β 鎖前駆体（配列番号 98）；VWF：フォン・ヴィレブランド因子（配列番号 99）；MUC2：ヒトムチン 2 前駆体（配列番号 100）；CER1：ケルベロス 1（Cerberus 1）（アフリカツメガエルホモログ）（配列番号 101）；DRM：グレムリン（gremlin）（配列番号 102）；DAN：（配列番号 103）；CTGF：結合組織成長因子前駆体（配列番号 104）；NOV：NovH（腎芽細胞種で過剰発現される遺伝子タンパク質ホモログ）（配列番号 105）；CYR6：（配列番号 106）である。

【図 2】図 2 は、SOST のコア領域の 3D モデルを示す。（SOST__Core）

【図 3】図 3 は、SOST ホモ二量体のコア領域の 3D モデルを示す。

【図 4A】図 4A および B により、5 種類の動物に由来するノギンのアミノ酸配列のアラインメントが提供される：ヒト（NOGG__HUMAN（配列番号 107）；ニワトリ（NOGG__CHICK、配列番号 108）；アフリカツメガエル（NOGG__XENLA、配列番号 109）；NOGG__FUGRU、配列番号 110）；およびゼブラフィッシュ（NOGG__ZEBRA、配列番号 111）；ならびに、ヒト由来の SOST（SOST__HUMAN、配列番号 1）、ラット（SOST__RAT、配列番号 20）、およびマウス（SOST__Mouse、配列番号 112）。

【図 4B】図 4A および B により、5 種類の動物に由来するノギンのアミノ酸配列のアラインメントが提供される：ヒト（NOGG__HUMAN（配列番号 107）；ニワトリ（NOGG__CHICK、配列番号 108）；アフリカツメガエル（NOGG__XENLA、配列番号 109）；NOGG__FUGRU、配列番号 110）；およびゼブラフィッシュ（NOGG__ZEBRA、配列番号 111）；ならびに、ヒト由来の SOST（SOST__HUMAN、配列番号 1）、ラット（SOST__RAT、配列番号 20）、およびマ

ウス (S O S T _ M o u s e、配列番号 1 1 2)。

【図 5】図 5 は、ノギン／B M P－7 複合体の構造を示す。B M P ホモ二量体が、表面形態の図の下部に示される。ノギンホモ二量体は、漫画風に、B M P 二量体の上部に示される。円は、N 末端結合領域、コア領域、および N 末端とコア領域との間のリンカーの輪郭である。

【図 6】図 6 は、S O S T N 末端領域に存在する可能性のある B M P 結合フラグメントの 3 D モデルを示す。B M P 二量体が表面形態で示され、可能性のある B M P 結合フラグメントがスティック形態で示される。B M P 表面上の疎水性ポケットにフィットするフェニルアラニン残基が示される。

【発明を実施するための形態】

10

【0 0 2 8】

本発明により、S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体、このような抗体を使用するための方法が提供される。本発明により、また、これらの抗体の作成および分析のために使用することができる、S O S T ポリペプチド免疫原も提供される。抗体は、T G F－ β 結合タンパク質である S O S T ポリペプチドの、リガンド、具体的には、骨形態形成タンパク質に対する結合をブロックするかまたは妨害する、そしてさらに、1 つ以上の他のリガンドに対する S O S T ポリペプチドの結合をブロックするかまたは妨害するために有用であり得る。

【0 0 2 9】

本発明は、B M P に対するスクレロスチンポリペプチドの結合を競合的に阻害することができる抗スクレロスチン抗体によって特異的に認識される特異的な短いペプチド配列を、スクレロスチンポリペプチド配列中で思いがけず発見したことに、一部関係する。このようなスクレロスチン－B M P 結合は、そうでなければ、B M P I 型レセプター結合部位および／または B M P I I 型レセプター結合部位を介して生じる。1 つ以上の骨形態形成タンパク質 (B M P) を含む T G F－ β ファミリーのタンパク質の 1 つ以上のメンバーに対する T G F－ β 結合タンパク質の結合を阻害する抗体のような分子には、例えば、T G F－ β ファミリーのメンバーもしくは B M P を活性化することができる分子、あるいは、T G F－ β 結合タンパク質への結合から T G F－ β メンバーをはずすこと、もしくは妨げることによって、それらのそれぞれのレセプターに対する 1 つ以上の B M P を含む T G F－ β ファミリーのメンバーの結合を可能にする分子が含まれることが理解されるはず

20

30

【0 0 3 0】

本発明により、また、ペプチドおよびポリペプチド免疫原が提供される。これらは、思いがけず、1 つ以上の B M P に対する T G F－ β 結合タンパク質である S O S T の結合を阻害する、妨げる、または妨害することができる (例えば、統計学的に有意な様式で減少させる) ことができる抗体またはそのフラグメントを作成および／または同定するために使用することができる。例示的なペプチド免疫原には、本明細書中で提供されるようなスクレロスチンポリペプチド (またはその変異体) の、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、2 0～2 5 個、2 1～5 0 個、2 6～3 0 個、3 1～4 0 個、4 1～5 0 個、5 1～6 0 個、6 1～7 0 個、または 7 1～7 5 個の連続しているアミノ酸が含まれ得る。この

のようなペプチドには、例えば、配列番号 2～1 9、2 1～5 3、および 5 4 に示されるようなアミノ酸配列が含まれる。本発明により、また、S O S T ホモ二量体の形成を阻害する、妨げる、または妨害することができる抗体またはそのフラグメントを作成および／または同定するために使用することができる、ペプチドおよびポリペプチド免疫原が提供される。本発明の抗体は、骨のミネラル含有量およびミネラル密度を増大させるために有用であり、それにより、骨が使用できないことになってしまう (例えば、骨折が原因で) 疾患、遺伝的素因、事故を含む、骨のミネラル含有量の減少を生じる多数の状態を緩和する。本発明により、骨の再吸収に有効であるか、または骨形成細胞を死滅させ、そして正常な加齢を行う治療薬が提供される。

40

【0 0 3 1】

50

（骨硬化症）

骨硬化症は、ヒトにおいて異常な骨ミネラル密度に関係している疾患である。骨硬化症は、Hansenによって、ファン・ブッフム骨化過剰症と類似しているが、おそらく、骨の変化が放射線によって現れる点、ならびに、多くの症例においては人差し指および中指の非対称性の皮膚多合脂症が存在する点で異なる障害に対して、与えられた名前である（Hansen, H. G., Sklerosteose in: Opitz et al., eds. Handbuch der Kinderheilkunde, (Berlin: Springer 1967) 351-355）。骨硬化症は、現在は、成人の骨の広い範囲に広がる硬化性病変を特徴とする、常染色体不完全優性障害であると理解されている。この状態は進行性である。骨硬化症は、また、多合脂症（2本以上の指が互いに融合する）を伴うという局面を有する。骨硬化症症候群には高い身長が関係しており、多くの患者は、6フィート以上の身長に達している。さらに、この状態を有しているヒトの顎は、異常な四角の概観を有する。ホモ接合型の骨ミネラル含有量は、正常な個体よりも1倍から6倍高くなり得、骨ミネラル密度は、上記の正常な値よりも1倍から4倍高くなり得る（例えば、罹患していない兄弟と比較して）。

【0032】

骨硬化症症候群は、最初に、南アフリカのオランダ人の家系であるアフリカ人に生じた。アフリカ人の集団においては、およそ140人に1人が変異した遺伝子（ヘテロ接合型）のキャリアである。この変異は100%遺伝浸透度がある。事例報告では、高い骨ミネラル密度がヘテロ接合型において観察されているが、彼らは病気（例えば、多合脂症または頭蓋骨の過剰な成長）にはかかっていないことが示されている。

【0033】

下垂体視床下部索の異常が、骨硬化症の患者において観察されていない。具体的には、成長ホルモンとコルチゾンの過剰な産生はなく、性ホルモンの濃度は患者においては正常である。骨の代謝回転のマーカー（例えば、骨芽細胞特異的アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、1型プロコラーゲンCプロペプチド（PICP）、および全てのアルカリホスファターゼ（Comier, Curr. Opin. in Rheu. 7:243 (1995)）は、非常に高い造骨活性がこの疾患に関係していることを示しているが、正常よりもわずかに低い破骨細胞の活性が、骨再吸収のマーカー（ピリジノリン、デオキシピリジノリン、N-テロペプチド、尿中のヒドロキシプロリン、血漿中の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ、およびガラクトシルヒドロキシリジン（Comier、前出を参照のこと））によって測定した際に観察される。

【0034】

骨硬化症は、患者の生涯にわたる骨格の全体にわたる骨の持続的な堆積を特徴とする。ホモ接合型においては、骨ミネラルの持続的な堆積により、機械受容器が存在しない骨格の領域（例えば、頭蓋骨、顎骨、頭蓋）において骨の過剰な成長が導かれる。骨硬化症のホモ接合型においては、頭蓋骨の骨の過剰な成長により、脳幹に対する過剰な静水圧が原因で、頭蓋の圧迫が生じ、最終的には死に至る。一般的な広範性の硬化症は、骨格の他の部分の全てにおいて観察される。長骨の皮質領域は大幅に厚みを増し、その結果、骨の強度が実質的に増大する。小柱の連結部分は厚みを増し、これにより、次いで、骨梁の強度が高まる。硬化性骨は、異常なx線を通さないものとして現れる。

【0035】

骨硬化症症候群の原因である稀な遺伝的変異は、ヒトの17番染色体の領域に存在する。この領域内の遺伝子は、TGF- β 結合タンパク質ファミリーの新規のメンバーをコードする（例えば、米国特許第6,395,511号、同第6,489,445号、および同第6,495,736号；Brunkow et al., Am. J. Hum. Genet. 68:577-89 (2001)を参照のこと）。したがって、スクレロスチンの濃度を変化させるかまたは調節することに関係する治療は、異常な骨の発達または損傷に関係している状態および疾患を処置することにおいて有用であり得る。以下にさらに詳細に記載されるように、このTGF- β 結合タンパク質であるスクレロスチン（本明細書中

では、BeerまたはSOSTとも記載される)に特異的に結合する抗体は、骨ミネラルの含有量を増加させるために使用することができ、したがって、多数の疾患の兆候を処置する、予防する、その進行を遅らせる、または緩和するために使用することができる。

【0036】

(TGF- β スーパーファミリー)

本明細書中で参照される重要な分子の中には、骨形態形成タンパク質(BMP)を含む形質転換成長因子- β (TGF- β)スーパーファミリーの任意の既知のメンバーまたは新規のメンバーが含まれる。また、TGF- β スーパーファミリーには、TGF- β レセプター(これは、TGF- β スーパーファミリー(BMPを含む)の特定のメンバーに特異的である1つ以上のレセプターをいうと理解されるはずである)、およびTGF- β 結合タンパク質(これは、TGF- β スーパーファミリー(BMPを含む)の特定のメンバーまたは複数のメンバーのサブセットに対して特異的結合親和性を有している1つ以上のポリペプチドをいうと理解されるはずである)も含まれる。TGF- β 結合タンパク質の特異的な例としては、スクレロスチン、すなわちSOSTが挙げられる。ヒトを含む種々の動物のSOSTおよびSOST変異体をコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書中では、配列番号55、56、57、59、61、63、65、および67、および69に提供される(コードされるポリペプチド配列は、配列番号1、20、58、60、62、64、66、68、および70にそれぞれ提供される)。(例えば、米国特許第6,395,511号、同第6,489,445号、および同第6,495,736号を参照のこと;また、例えば、Balemans et al., 2002 Dev. Biol. 250:231; Schmitt et al., 1999 J. Orthopaed. Res. 17:269; Khalil, 1999 Microbes Infect. 1:1255; Miyazono et al., 1993 Growth Factors 8:11; von Bubnoff et al., 2001 Dev. Biol. 239:1; Koli et al., 2001 Microsc. Res. Tech. 52:354; Ebara et al., 2002 Spine 27(16 Suppl. 1):S10; Bondestam 2002, Ligands & Signaling Components of the Transforming Growth Factor β Family, Helsinki University Biomedical Dissertations No. 17も参照のこと)。

【0037】

TGF- β スーパーファミリーには、共通の配列エレメントと、二次および三次の両方のレベルで構造モチーフを共有している種々の成長因子が含まれる。このタンパク質のファミリーは、広い範囲の生物学的応答を発揮し、これによって多くの種類の細胞型に影響を与える。TGF- β ファミリーのメンバーの多くは、胚発生の中のパターン形成と組織指定において重要な機能を有している。成体においては、TGF- β ファミリーのメンバーは、例えば、創傷の治癒、骨の修復、および骨再形成に、さらには、免疫系の調節にも関係している。TGF- β ポリペプチドに加えて、このスーパーファミリーには、BMP、アクチビン、インヒビン、成長および分化因子(Growth and Differentiation Factors)(GDF)、ならびに神経膠由来神経栄養因子(GDNF)が含まれる。一次的な分類は、一般的なサブファミリーに特異的タンパク質を分類分けする一般的な配列の特徴を通じて行われる。サブファミリー内でのさらなる層化は、より小さいグループのメンバーの間での重点的な配列保存により可能である。場合によっては、BMP-5、BMP-6、およびBMP-7のように、アミノ酸のパーセント同一性が、より小さいグループのメンバーの間で75%程度の高い度合いの場合もある。この同一性のレベルにより、1つの代表的な配列について、より大きなファミリーの他のメンバーとそれを分けるサブグループの鍵となる生化学的エレメントを説明することができる。

【0038】

TGF- β 2の結晶構造が決定されている。TGF- β 2単量体の通常の折り畳みには

、3個のジスルフィド架橋によって形成される安定な、コンパクトなシステインノット様の構造が含まれる。1つのジスルフィド架橋によって安定化される二量体化は、逆平行である。

【0039】

TGF- β ファミリーのメンバーは、ヘテロオリゴマーレセプター複合体の形成を誘導することによって情報を伝達する。TGF- β シグナル伝達の導入には、膜貫通型セリン／スレオニンキナーゼレセプターI型およびII型の2つの異なるサブファミリーが関係している。少なくとも7個のI型レセプターと5個のII型レセプターが同定されている(Kawabata et al., Cytokine Growth Factor Rev. 9:49-61 (1998); Miyazono et al., Adv. Immunol. 75:115-57 (2000)を参照のこと)。TGF- β ファミリーのそれぞれのメンバーは、I型およびII型レセプターの特徴的な組み合わせに対して結合し、これらのいずれもがシグナル伝達に必要である。TGF- β レセプターの活性化についての現行のモデルにおいては、TGF- β リガンドは最初にII型レセプター(TbR-II)に結合し、これが次いで、I型レセプター(TbR-I)を動員して、リガンド／II型／I型三者複合体を形成する。I型レセプターは、TbR-IIが存在しない条件ではリガンドには結合できない。TbR-IIは、次いで、膜近傍の領域にあるグリシンとセリン残基を多く含むドメイン(GSDメイン)中を優先的にTbR-Iをリン酸化し、それによってTbR-Iを活性化する。活性化されたI型レセプターキナーゼは、次いで、Smadファミリーのタンパク質の特定のメンバーをリン酸化し、これは、特異的な遺伝子の転写を調節する核に転移する。

【0040】

(骨形態形成タンパク質(BMP)：骨ミネラル密度の鍵となる調節タンパク質)

骨形成の理解における主な前進は、BMPの同定であり、これは骨形成タンパク質(OP)としても知られており、生体内での軟骨および骨の分化を調節する。BMP／OPは、間葉幹細胞が骨組織によって再吸収されて置き換えられる軟骨構造を築く軟骨細胞へと分化する事象のカスケードを通じて、軟骨内の骨の分化を誘導する(Ballemans et al., Dev. Biol. 250:231-50 (2002)を参照のこと)。したがって、このプロセスには、軟骨の形成、軟骨の肥大および鉱化作用、血管浸潤、骨芽細胞の分化、ならびに骨の形成が含まれる。上記のように、BMP／OP(BMP2-14、ならびに骨形成タンパク質1および2、OP-1およびOP-2)(例えば、GenBank P12643(BMP-2); GenBank P12645(BMP3); GenBank P55107(BMP-3b、成長／分化因子10)(GDF-10)); GenBank P12644(BMP4); GenBank P22003(BMP5); GenBank P22004(BMP6); GenBank P18075(BMP7); GenBank P34820(BMP8); GenBank Q9UK05(BMP9); GenBank O95393(BM10); GenBank O95390(BMP11、成長／分化因子11前駆体(GDF-11)); GenBank O95972(BM15))は、TGF- β スーパーファミリーのメンバーである。BMP／OPサブファミリーのメンバーの間での特筆すべき進化的保存は、これらが動物の正常な発達および機能において重要であることを示唆している。さらに、胎児以降の軟骨形成および骨形成に加えて、BMP／OPは、頭蓋顔面および歯の組織の発達を含む骨格形成において複数の役割を果たしている。種々のBMPファミリーのメンバーは、また、単球、上皮細胞、間質細胞、および神経細胞を含む種々の他の細胞型中でも生物学的活性を有している。BMPは、細胞の増殖および分化、化学走査性、ならびにアポトーシスを調節し、また、基本的な役割、例えば、左右対称性、神経発生、中胚葉のパターン形成、および胚発生、ならびに、腎臓、消化管、肺、歯、手足、羊膜、および精巣を含む多数の器官形成の制御もしている(Ballemans、前出を参照のこと)。

【0041】

BMPは、大きな前駆体タンパク質として合成される。二量体化の際に、BMPは細胞

内でタンパク質分解的に切断されて、カルボキシ末端成熟タンパク質を生じ、これは次いで、細胞から分泌される。BMPは、他のTGF- β ファミリーのメンバーと同様に、I型およびII型のセリン／スレオニンキナーゼレセプターの両方に対して協力して結合することによって、シグナル伝達を開始する。BMPがリガンドとして作用し得るI型レセプターとしては、BMPRII (ALK-3としても知られている)、BMPRI (ALK-6としても知られている)、ALK-1、およびALK-2 (ActRIとしても知られている)が挙げられる。II型レセプターのうち、BMPはBMPRII型レセプター (BMPRII)、アクチビンII型 (ActRII)、およびアクチビンIIB型 (ActRIIB)に結合する (Balemans et al., 前出、および本明細書中で引用されている参考文献を参照のこと)。BMPRI型レセプターポリペプチドのポリヌクレオチド配列およびコードされるアミノ酸配列は、GenBankデータベース中に、例えば、GenBank NM_004329 (配列番号85によってコードされる配列番号71); D89675 (配列番号86によってコードされる配列番号72); NM_001203 (配列番号87によってコードされる配列番号73); S75359 (配列番号88によってコードされる配列番号74); NM_030849 (配列番号89によってコードされる配列番号75); およびD38082 (配列番号90によってコードされる配列番号76)に提供されている。I型レセプターの他のポリペプチド配列は、GenBankデータベース中に、例えば、NP_001194 (配列番号77); BAA19765 (配列番号78); およびAAB33865 (配列番号79)に提供されている。BMPRII型レセプターポリペプチドのポリヌクレオチド配列およびコードされるアミノ酸配列は、GenBankデータベースに提供されており、例えば、U25110 (配列番号91によってコードされる配列番号80); NM_033346 (配列番号92によってコードされる配列番号81); NM_001204 (配列番号93によってコードされる配列番号82); およびZ48923 (配列番号94によってコードされる配列番号83)が挙げられる。II型レセプターのさらなるポリペプチド配列も、GenBankデータベースに、例えば、CAA88759 (配列番号84)に提供されている。

【0042】

BMPは、他のシスチンノットタンパク質と同様に、ホモ二量体構造を形成する (Schuefler et al., J. Mol. Biol., 287:103-15 (1999))。BMP/TGF- β ファミリーについて行われた進化の軌跡の分析によれば、BMPRI型レセプター結合部位およびII型レセプター結合部位は、BMP構造の表面にマップされた (Innis et al., Protein Eng. 13:839-47 (2000))。BMP上でのI型レセプター結合部位の位置は、BMP-2/BMPレセプターIIA複合体のx線構造によって後に確認された (Nickel et al., J. Joint Surg. Am. 83A (Suppl 1 (Pt 1)): S7-S14 (2001))。予想されるII型レセプター結合部位は、TGF- β 3/TGF- β II型レセプター複合体のx線構造とうまく一致している (Hart et al., Nat. Struct. Biol. 9:203-208 (2002))。これは、BMP/BMPレセプターIIAシステムと非常によく類似している。

【0043】

BMPおよびアクチビンサブファミリーは、TGF- β 結合タンパク質による有意な翻訳後調節に供される。複雑な細胞外制御システムが存在し、それによって、親和性の高いアンタゴニストが合成され、運び出され、その後、BMPまたはアクチビンと選択的に複合体を形成して、それらの生物学的活性を破壊する (Smith, Trends Genet. 15:3-6 (1999))。多数のこのようなTGF- β 結合タンパク質が同定されており、配列の相違に基づく、アンタゴニストは、一次配列が保存されていないことが原因で別々に進化したようである。脊椎動物においては、アンタゴニストとしては、ノギン (noggin)、コーディン (chordin)、コーディン様、フォリストアチン (follistatin)、FSRP、DAN/ケルベロス (Cerberus) タ

ンパク質ファミリー、およびスクロスチン (SOST) が挙げられる (Bailemans et al., 前出、および本明細書中で引用されている参考文献を参照のこと)。アンタゴニズムの機構は、種々のアンタゴニストについて異なるようである (Iemura et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 9337-9342)。

【0044】

BMPアンタゴニストであるノギン上のI型およびII型レセプター結合部位もまた、マップされている。ノギンはBMPに対して高い親和性で結合する (Zimmerman et al., 1996)。ノギン/BMP-7複合体の構造の研究により、これらの2つのタンパク質の間での結合相互作用が明らかにされた (Groppe et al., Nature 420: 636-42 (2002))。BMPシグナル伝達複合体のモデルにノギン-BMP-7構造を重ね合わせることで、ノギンの結合が、BMP-7上の結合エピトープの両方の対 (すなわち、BMP I型およびII型レセプター結合部位) を効果的にマスクすることが示されている。ノギンのシステインを多く含む足場配列の前には、「クリップ」 (残基28~48) と呼ばれる約20個のアミノ酸残基のN末端セグメントが存在する。I型レセプター結合部位は、ノギンのクリップドメインのN末端部分によってふさがれ、そしてII型レセプター結合部位は、クリップドメインのカルボキシ末端部分によってふさがれる。ノギンのC末端付近のコア領域中の2つのβ鎖もまた、II型レセプター結合部位でBMP-7と接する。この結合形態により、ノギン二量体が、BMP二量体上の全てのレセプター結合部位を効率よくブロックすることができる (2つのI型と2つのII型レセプター結合部位)。

【0045】

(スクロスチンポリペプチドおよびスクロスチンコードポリヌクレオチド)

BMPアンタゴニストであるスクロスチン (米国特許第67, 395, 511号、同第6, 489, 445号、および同第6, 495, 736号; 配列番号1、20、58、60、62、64、66、68、および70もまた参照のこと) は、ヒトDAN、ヒトグレムリン (Gremelin)、およびヒトケルベロス (Cerberus)、およびSCGFと比較した場合にはほぼ同一のシステイン (ジスルフィド) 足場を有しているが (米国特許第5, 780, 263)、ヌクレオチドレベルではほとんど相同性はない (背景情報については、一般的には、Hsu et al., Mol. Cell 1: 673-683 (1998) を参照のこと)。スクロスチンはまた、このTGF-β結合タンパク質の変異体を含むと理解される (例えば、配列番号60および62)。本明細書中で使用される場合は、TGF-β結合タンパク質変異体ポリヌクレオチドは、配列番号55~57、59、61、63、65、67、または69の修飾体である (1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換) アミノ酸配列を有しているポリペプチドをコードする核酸分子をいう。このような変異体としては、TGF-β結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの自然界に存在している多型変異体または対立遺伝子変異体、さらには、これらのアミノ酸配列の保存的アミノ酸置換体をコードする合成のポリヌクレオチドが挙げられる。当業者に公知の種々の基準は、ペプチドまたはポリペプチド中の特定の位置のアミノ酸が似ているかどうかを示す。例えば、類似のアミノ酸または保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有しているアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似の側鎖を有しているアミノ酸としては、塩基性の側鎖を有しているアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン); 酸性の側鎖を有しているアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸); 電荷を有していない極性の側鎖を有しているアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、ヒスチジン); 非極性の側鎖を有しているアミノ酸 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン); β分岐側鎖を有しているアミノ酸 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、ならびに芳香族側鎖を有しているアミノ酸 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン) が挙げられる。プロリンは、分類がさらに難しいと考えられており、脂肪族側鎖を

有しているアミノ酸（例えば、L e u、V a l、I l e、およびA l a）と性質を共有している。特定の状況においては、グルタミン酸のグルタミンでの置換、またはアスパラギン酸のアスパラギンでの置換を、グルタミンおよびアスパラギンが、それぞれ、グルタミン酸およびアスパラギン酸のアミド誘導体であるという点で、類似の置換であると考えることができる場合もある。

【0046】

T G F- β 結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのさらなる変異体形態は、本明細書中に記載されているヌクレオチド配列中に見られる1つ以上のヌクレオチドの置換、挿入、または欠失を含む核酸分子である。T G F- β 結合タンパク質の変異体または突然変異体は、T G F- β 結合タンパク質の変化したバージョンが野生型のT G F- β 結合タンパク質と競合するように構築することができ、またそのように同定することもできる。このような競合は、好ましくは、野生型T G F- β 結合タンパク質の活性をブロックし、それにより、骨密度を増大させるように導く。

【0047】

単離されたポリヌクレオチドは、生物体のゲノムDNA中に組み込まれていない核酸分子（ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド）である。ポリヌクレオチドは、例えば、それが自然界の環境の一部ではないベクター中にクローニングされている場合に、単離されているとみなされる。例えば、真核生物細胞のゲノムDNAから分離されたT G F- β 結合タンパク質をコードするDNA分子は、単離されたDNA分子である。単離された核酸分子の別の例は、生物体のゲノム中に組み込まれていない化学的に合成された核酸分子である。単離された核酸分子は、DNA、cDNA、RNAであり得、また、核酸アナログの少なくとも一部を構成し得る。

【0048】

T G F- β 結合タンパク質変異体ポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドがストリンジェントな条件下で配列番号55～57、59、61、63、65、67、または69のヌクレオチド配列を有している核酸分子とハイブリダイズするかどうかを決定することによって同定することができる。さらに、T G F- β 結合タンパク質変異体ポリヌクレオチドは、システイン骨格を有しているタンパク質をコードする。T G F- β 結合タンパク質変異体ポリヌクレオチドは、また、配列比較によっても同定することができる。本明細書中で使用される場合は、2つのアミノ酸配列は、最大と対応のなるように並べられた時に、2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が同じである場合に、「100%のアミノ酸配列同一性」を有する。同様に、2つのヌクレオチド配列は、最大の対応となるように並べられた時に、2つのヌクレオチド配列のヌクレオチドが同じである場合に、「100%のヌクレオチド配列同一性」を有する。配列比較は、DNA STAR (Madison, Wisconsin) によって製造されているLASERGENE bioinformatics computing suite、またはNCBIウェブサイト([Internet] <:http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)で入手できるBLASTアルゴリズムに含まれるもののような、標準的なソフトウェアプログラムを使用して行うことができる。最適なアラインメントを決定することにより2つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者に周知である（例えば、Peruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu et al., (eds.), "Information Superhighway and Computer Database of Nucleic Acids and Proteins," in Methods in Gene Biotechnology, pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), and Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2nd Edition (Academic Press, Inc. 1998)を参照のこと）。

【0049】

変異体 TGF- β 結合タンパク質は、配列番号 1、20、58、60、62、64、66、および 68 に対して少なくとも 50% のアミノ酸配列同一性を有すべきであり、好ましくは、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 98% 以上の同一性を有する。あるいは、TGF- β 結合タンパク質変異体は、配列番号 55~57、59、61、63、65、67、または 69 に対して少なくとも 70% のヌクレオチド配列同一性を有することによって同定することができる。さらに、本発明により、配列番号 55 または 57 に対して 75%、80%、85%、90%、または 95% 以上の同一性を有している TGF- β 結合タンパク質ポリヌクレオチド変異体が意図される。TGF- β 結合タンパク質変異体ポリヌクレオチドまたは変異体 TGF- β 結合タンパク質を同定するために使用される特定の方法に関わらず、そのような変異体を、例えば、タンパク質の TGF- β ファミリーの選択されたメンバーに結合する、および／またはそのシグナル伝達を阻害するその能力、あるいは、抗 TGF- β 結合タンパク質抗体に特異的に結合するその能力によって機能的に特徴付けることができる。

【0050】

本発明の状況においては、TGF- β 結合タンパク質ポリヌクレオチドの「機能的フラグメント」とは、(1) 本明細書中に記載される機能的活性を有しているか、または (2) 抗 TGF- β 結合タンパク質抗体に特異的に結合するかのいずれかである TGF- β 結合タンパク質ポリペプチドの部分をコードする核酸分子をいう。例えば、本明細書中に記載される TGF- β 結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの機能的フラグメントには、配列番号 55~57、59、61、63、65、67、または 69 のヌクレオチド配列の一部が含まれる。

【0051】

「単離されたポリペプチド」は、本明細書中では、その自然界の環境から取り出されたポリペプチドをいう。例えば、自然界に存在しているタンパク質は、それが、自然界においてそのポリペプチドに付随している炭水化物、脂質、核酸、またはタンパク質様の不純物のような、自然界での系において同時に存在している物質のいくつかまたは全てから分離されている場合に、単離されている。好ましくは、このような単離されたポリペプチドは、少なくとも約 90% 純粋であり、さらに好ましくは、少なくとも約 95% 純粋であり、そして最も好ましくは、少なくとも約 99% 純粋である。

【0052】

(TGF- β 結合タンパク質に特異的な抗体)

本発明により、SOST に特異的に結合する抗体が提供され、また、これらの抗体の作成および分析に使用することができる SOST ポリペプチド免疫原もまた提供され、そしてまた、このような抗体を使用するための方法も提供される。本明細書中に記載される本発明の抗体は、SOST ポリペプチドに特異的に結合し、それによって、SOST ポリペプチドに対する BMP の結合をブロックするか、または阻害する、すなわち、BMP と SOST との間での相互作用を妨げるか、または妨害する。この相互作用をブロックすることの効果は、骨ミネラル密度を変化させる（統計学的に有意な様式で、増大させるかまたは減少させる）こと、好ましくは、骨ミネラル密度を増大させることである。

【0053】

免疫および／または SOST 特異的抗体の分析に有用なポリペプチドまたはペプチドは、また、当業者に公知であり、本明細書中に記載される方法に従って、宿主動物中で抗原性反応を生じる可能性が高いアミノ酸配列を決定するために、TGF- β 結合タンパク質の一次、二次、および三次構造を分析することによって選択することができる。例えば、Novotny, Mol. Immunol. 28: 201-207 (1991); Berzofsky, Science 229: 932-40 (1985) を参照のこと。モデリングおよび x 線結晶解析のデータもまた、TGF- β 結合タンパク質のどの部分またはどの領域が BMP のような TGF- β 結合タンパク質リガンドの一部と相互作用するかを推定および／または同定するために使用することができる。相互作用の部分または領域内またはその周辺のアミノ酸配列を含む TGF- β 結合タンパク質ペプチド免疫原を、設

計し調製することができる。これらの抗体は、同じリガンドに対するTGF- β 結合タンパク質の結合をブロックするかまたは妨害するために有用であり得、また、1つ以上の他のリガンドに対するTGF- β 結合タンパク質の結合をブロックするかまたは妨害することもできる場合がある。

【0054】

本発明によって想定される抗体またはその抗原結合フラグメントには、SOSTに特異的に結合することができ、BMPのようなTGF- β ポリペプチドのSOSTに対する結合を競合的に阻害することができる抗体が含まれる。例えば、本発明によって想定される抗体は、BMP上のBMP I型レセプター部位に対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害するか、またはBMP II型レセプター結合部位に対するSOSTの結合を競合的に阻害するか、あるいは、BMP上のI型レセプター結合部位とII型レセプター結合部位の両方に対するSOSTの結合を競合的に阻害する場合もある。いかなる理論にも束縛されることは望まないが、抗SOST抗体がBMPポリペプチドのI型および/またはII型結合部位のSOSTに対する結合を競合的に阻害し、それによってSOSTのアンタゴニスト活性をブロックする場合は、BMP上のレセプター結合部位はI型レセプターおよびII型レセプターのいずれに対する結合にも利用され、それによって骨鉱化作用が増大する。SOSTのようなTGF- β 結合タンパク質とBMPのようなTGF- β ポリペプチドとの間での結合相互作用は、通常は、リガンド対のそれぞれがホモ二量体を形成する際に生じる。したがって、BMPに対するSOSTの結合を競合的に阻害することによってBMPに対するSOSTの結合をブロックする、妨害する、または妨げるためにSOSTに特異的な抗体を使用する代わりに、あるいはそれに加えて、SOST特異的抗体は、SOSTホモ二量体の形成をブロックする、または妨害するためにも使用することができる。

【0055】

一例として、高い親和性でBMPに結合する能力を有しているBMPアンタゴニストであるヒトノギンの二量体の1つ(Zimmerman et al., 前出)は、ヒトBMP-7の1つの二量体との複合体として単離され、多波長異常分散法(MAD)によって分析された(Groppe et al., Nature 420: 636-42 (2002))。本明細書中で議論されるように、本研究により、ノギン二量体がBMP二量体上の全てのレセプター結合部位(2つのI型レセプター結合部位と2つのII型レセプター結合部位)を効率よくブロックすることができることが明らかにされた。BMP-7と接するノギンのアミノ酸位置は、他のTGF- β 結合タンパク質、例えば、スクレロスチン(SOST)とBMPとの間での相互作用をモデル化することにおいて有用であり得、したがってこのような相互作用をブロックするかまたは妨害する抗体を作成するための免疫原として使用することができるペプチドの設計の助けとなり得る。

【0056】

本発明の1つの実施形態においては、SOSTポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントは、BMP上に存在する骨形態形成タンパク質(BMP) I型レセプター結合部位、およびBMP II型レセプター結合部位の少なくとも1つまたはそれらの両方に対するSOSTポリペプチドの結合を競合的に阻害する。これらの抗体が結合するSOST上のエピトープには、SOSTポリペプチドのN末端に存在する連続しているアミノ酸配列(配列番号1の約1~56位)が含まれるか、または、エピトープはSOSTポリペプチドのN末端に存在する連続しているアミノ酸配列(配列番号1の約1~56位)に含まれる場合もある。ポリペプチドには、また、コア領域(例えば、配列番号47(ヒト)および配列番号48(ラット))において提供されているようなポリペプチド)に対してN末端領域を結合させる短いリンカーペプチド配列が含まれる場合もある。ヒトSOST(配列番号1)についての短い代表的なN末端ペプチド配列としては、配列番号2~6、そして代表的なラットSOST(例えば、配列番号20)についてのペプチド配列としては、配列番号12~15が挙げられる。

【0057】

S O S Tポリペプチドに特異的に結合し、BMPに対するS O S Tポリペプチドの結合を、例えば、I型レセプター結合部位およびII型レセプター結合部位の1つ以上に対応するBMPのアミノ酸に対する結合をブロックするかまたは阻害することによって、ブロックするかまたは競合的に阻害する抗体はまた、S O S Tのコア領域に対応するアミノ酸配列（配列番号1のおよそ57～146位のアミノ酸）を含むペプチドにも特異的に結合することができる。コア領域を含むポリペプチドには、また、例えば、キャリア分子に対してポリペプチドを結合させるために有用であり得るシステイン残基を含むように、N末端およびC末端のいずれかまたはそれらの両方にさらなるアミノ酸の伸張を含めることができる。ヒトおよびラットのS O S Tについての代表的なコアポリペプチドには、例えば、それぞれ、配列番号49および配列番号50に示されるアミノ酸配列が含まれる。このような抗体は、また、より短いポリペプチド配列に結合することができる場合もある。代表的なヒトS O S Tコアペプチド配列は、配列番号21～24に提供され、代表的なラットS O S Tコア配列は、配列番号25～28に提供される。

10

【0058】

別の実施形態においては、S O S Tポリペプチドに特異的に結合する抗体は、S O S Tホモ二量体の形成を妨害する（阻害する、妨げる、またはブロックする、例えば、統計的に有意な様式で減少させる）。S O S TとBMPとの間での相互作用には、S O S Tのホモ二量体、およびBMPのホモ二量体が関係しているため、S O S Tのホモ二量体の形成を妨げるかまたは妨害する抗体は、それによって、骨ミネラル密度を変化させる、好ましくは、骨のミネラル密度を増大させることができる。1つの実施形態においては、S O S Tのコア領域に結合する抗体は、ホモ二量体の形成を妨害する。このような抗体は、また、コア領域に対応する連続しているアミノ酸配列を含むペプチド、例えば、配列番号29、30、および53（ヒトS O S T）、ならびに配列番号31、および54（ラットS O S T）にも結合することができる。S O S TポリペプチドのC末端領域に存在するエピトープ（配列番号1または20のいずれかのおよそ147～190位のアミノ酸）に結合する抗体は、また、ホモ二量体の形成を妨害することができる。代表的なヒトS O S TおよびラットS O S TのC末端ポリペプチドには、例えば、それぞれ、配列番号51および配列番号52に示されるアミノ酸配列が含まれる。このような抗体は、また、より短いポリペプチド配列にも結合できる場合がある。代表的なヒトS O S T C末端ペプチド配列は、配列番号33～36に提供され、代表的なラットS O S T C末端配列は、配列番号41～43に提供される。

20

30

【0059】

本明細書中で開示される、抗体が特異的に結合するS O S Tポリペプチドおよびペプチドは、免疫原として有用である。本発明のこれらの免疫原は、体液性免疫応答を生じるように動物を免疫するために使用することができ、この体液性免疫応答により、S O S TのN末端領域に由来するペプチドを含む、いずれもBMP上に存在するI型レセプター結合部位またはII型レセプター結合部位に特異的に結合する抗体の産生を生じるか、またはS O S Tホモ二量体の形成を妨害する場合もある。

【0060】

免疫原として有用であるこのようなS O S Tポリペプチドおよびペプチドは、また、抗体を含むサンプル、例えば、精製された抗体、抗血清、または細胞培養上清のサンプル、あるいはS O S Tに特異的な1つ以上の抗体を含む任意の他の生物学的サンプルをスクリーニングするための方法において使用することができる場合もある。これらのペプチドは、また、生物学的サンプルから、S O S Tに特異的に結合する抗体を産生する1つ以上のB細胞を同定し、選択するための方法（例えば、ブランク形成アッセイなど）においても使用することができる場合もある。B細胞は、次いで、S O S T特異的抗体をコードするポリヌクレオチドの供給源として使用することができ、これは、当該分野で公知であり、本明細書中に記載されている組み換え分子生物学的技術によってクローニングすることができ、そして／または修飾することができる。

40

【0061】

50

「生物学的サンプル」は、本明細書中で使用される場合には、特定の実施形態においては、SOSTポリペプチドに特異的な少なくとも1つの抗体を含むサンプルを意味し、生物学的サンプルは、血液サンプル（それから血清または血漿を調製することができる）、生検標本、組織外植片、器官培養物、あるいは検体もしくは生物学的供給源に由来する任意の他の組織または細胞調製物を得ることによって、提供され得る。サンプルは、さらに、または形態学的完全性もしくは物理的状态が破壊されている、例えば、解剖、解離、可溶化、分画、ホモジナイゼーション、生化学的もしくは化学的抽出、粉碎、凍結乾燥、超音波処理、または検体もしくは生物学的供給源に由来するサンプルを処理するための任意の他の手段によって破壊されている、組織あるいは細胞調製物をも意味する。検体または生物学的供給源は、ヒト、または非ヒト動物、初代細胞培養物（例えば、生体外で免疫されたB細胞）、あるいは染色体に組み込まれたかまたはエピソーム組換え体である核酸配列を含むことができる遺伝子操作された細胞株、不死化細胞株または不死化することができる細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、分化した細胞株または分化させることができる細胞株、形質転換細胞株などを含むがこれらに限定されない培養に適応させられた細胞株であり得る。

10

【0062】

SOSTペプチド免疫原は、また、SOSTポリペプチドの全ポリペプチド配列を全体として呈し、それぞれがその枠組みにおいて別のペプチドと共通しているSOSTアミノ酸配列の部分を持している、一連のペプチドを合成することによって調製することもできる。この重複部分は、好ましくは、少なくとも4個のアミノ酸であり、より好ましくは、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のアミノ酸である。それぞれのペプチドは、動物を免疫するために使用することができ、動物から血清が回収され、どの動物がTGF- β タンパク質に対するSOSTの結合を妨害するかまたはブロックする抗体を産生するかを同定するためのアッセイにおいて試験される。次いで、抗体は、このように同定された免疫された動物から、当該分野で公知であって本明細書中に記載される方法に従って調製される。

20

【0063】

SOSTのような、TGF- β 結合タンパク質に特異的に結合するペプチド、ポリペプチド、および他の非ペプチド分子が、本発明によって想定される。本明細書中に記載される場合は、分子は、それがTGF- β 結合タンパク質と検出可能なレベルで反応し、無関係な配列または異なるTGF- β 結合タンパク質の配列を含むペプチドおよびポリペプチドとは検出できるようには反応しない場合に、TGF- β 結合タンパク質に対して「特異的に結合する」と言われる。好ましい結合分子としては、抗体が挙げられ、これは、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、抗イディオタイプ抗体、またはCDR移植免疫グロブリン、またはそのフラグメント、例えば、タンパク質分解によって作成されたかもしくは組み換えによって産生された免疫グロブリンF(a b')₂、Fab、Fab'、Fv、およびFdフラグメントであり得る。

30

【0064】

配列番号1、20、58、60、62、64、66、または68のTGF- β 結合タンパク質に「特異的に結合する」が、DAN、ケルベロス(Cerberus)、SCGF、またはグレムリン(Gremlin)のような他のTGF- β 結合タンパク質には結合しない、抗TGF- β 結合タンパク質抗体が特に有用である。抗体は、それらが、 10^4 M^{-1} 以上の K_a で結合する、より好ましくは、約 10^5 M^{-1} 以上の K_a で結合する、より好ましくは、約 10^6 M^{-1} 以上の K_a で結合する、なおさらに好ましくは、 10^7 M^{-1} 以上の K_a で結合する、そしてなおさらに好ましくは、 10^8 M^{-1} 以上の K_a で結合し、他のTGF- β 結合タンパク質には結合しない場合に、TGF- β 結合タンパク質に特異的に結合するか、または特異的なTGF- β ファミリーのメンバーに特異的に結合すると理解される。その同種の抗原に対する抗体の親和性はまた、解離定数 K_D として一般的に表現され、抗SOST抗体は、それが 10^{-4} M 以下の K_D で結合する、より好ましくは、約 10^{-5} M 以下の K_D で結合する、より好ましくは、約 10^{-6} M 以下の K

40

50

K_D で結合する、なおさらに好ましくは、 10^{-7} M以下の K_D で結合する、そしてなおさらに好ましくは、 10^{-8} M以下の K_D で結合する場合に、TGF- β ファミリーのメンバーに特異的に結合する。さらに、本発明の抗体は、TGF- β ファミリーのメンバーに対するTGF- β 結合タンパク質の結合を、ブロックする、妨害する、または阻害する（例えば、統計学的に有意に減少させる）ことが好ましい。

【0065】

抗体または結合パートナーの親和性、さらには、それに対する抗体の結合を阻害する程度は、従来技術、例えば、Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660-672 (1949))によって記載されている技術を使用して、または表面プラズモン共鳴 (SPR: BIACore, Biosensor, Piscataway, NJ) によって当業者が容易に決定することができる。表面プラズモン共鳴については、標的分子が固相上に固定され、フロー細胞と共に動く移動層中にリガンドに曝される。リガンドの固定された標的に対する結合が生じると、局所的な屈折率の変化が生じ、これによりSPR角の変化が誘導される。これは、反射光の強度の変化を検出することによってリアルタイムでモニターすることができる。SPRシグナルの変化率を分析することにより、結合反応の会合相と解離相についての見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比により、見かけの平衡定数（親和性）が得られる（例えば、Wolff et al., Cancer Res. 53:2560-65 (1993)を参照のこと）。

【0066】

本発明の抗体は、いずれかの免疫グロブリンのクラス、例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、またはIgAに属する場合がある。これは、動物、例えば、鳥類（例えば、ニワトリ）および哺乳動物（これらとしては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または他の齧歯類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ヒト、または他の霊長類が挙げられるがこれらの限定されない）から得ることができ、またはそれらに由来するものでもあり得る。抗体は、インターナライジング抗体である場合もある。

【0067】

当該分野で周知の方法を使用して、SOSTのようなTGF- β 結合タンパク質に特異的な抗体、ポリクローナル抗血清、またはモノクローナル抗体を作成することができる。抗体は、また、所望される特性を有するように設計された、遺伝子操作された免疫グロブリン (Ig) またはIgフラグメントとして産生することもできる。例えば、例としてであって、限定ではないが、抗体としては、第1の哺乳動物種に由来する少なくとも1つの可変 (V) 領域ドメインと、第2の別の哺乳動物種に由来する少なくとも1つの定常領域ドメインを有しているキメラ融合タンパク質である、組み換えIgGが挙げられる。最も一般的には、キメラ抗体は、マウスの可変領域配列とヒトの定常領域配列を有する。このような、マウス/ヒトキメラ免疫グロブリンは、マウス抗体に由来する相補性決定領域 (CDR) を繋ぐことによって「ヒト化」することができ、これにより、ヒトに由来するV領域フレームワーク領域およびヒトに由来する定常領域中に、抗原に対する結合特異性を与えることができる。これらの分子のフラグメントは、タンパク質分解的消化によって、または状況によっては、タンパク質分解的消化に続いて、ジスルフィド結合の穏やかな還元とアルキル化によって、作成することができる。あるいは、このようなフラグメントは、また、組み換え遺伝子操作技術によっても作成することができる。

【0068】

特定の好ましい抗体は、本明細書中に記載される生体外において、TGF- β 結合タンパク質の活性を阻害するかまたはブロックするそのような抗体である。TGF- β 結合タンパク質に対する抗体の結合特性は、通常、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、免疫沈降、免疫ブロット法、向流免疫電気泳動、放射免疫測定、ドットブロット法、阻害もしくは競合アッセイなどを含む免疫検出方法を使用して評価することができる。これらは、当業者であれば容易に行うことができる（例えば、米国特許第4,376,110号、および同第4,486,530号; Harlow et al., Antibod

ies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) を参照のこと)。

【0069】

免疫原は、例えば、SOSTポリペプチド、精製されたSOSTポリペプチドもしくは部分的に精製されたSOSTポリペプチド、またはそれらの変異体もしくはフラグメント(すなわち、ペプチド)、あるいはSOSTポリペプチドに由来するペプチドとして、TGF- β 結合タンパク質を発現する細胞から構成される場合もある。このようなペプチドは、大きなポリペプチドのタンパク質分解的切断によって、組み換え分子方法によっても作成することができ、または化学的に合成することもできる。例えば、SOSTポリペプチドをコードする核酸配列が本明細書中で提供され、その結果、免疫原として使用するためのSOSTポリペプチドを当業者は日常的に行われる手順によって調製することが出来る。ペプチドは、本明細書中に記載されており、当該分野で公知である方法によって化学的に合成することができる。あるいは、ペプチドは、SOSTポリペプチドのタンパク質分解的切断によって作成することができ、個々のペプチドを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または任意の回数の液体クロマトグラフィー、または他の分離方法のような、当該分野で公知の方法によって単離することができる。免疫原として有用なペプチドは、通常、本明細書中に記載されているようなSOSTポリペプチドのアミノ酸配列に由来する少なくとも4個または5個の連続しているアミノ酸のアミノ酸配列を有し得、好ましくは、SOSTポリペプチドの6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、14個、15個、16個、18個、19個、または20個の連続しているアミノ酸を含む。特定の他の好ましいペプチド免疫原には、SOSTポリペプチド配列の少なくとも6個であって12個を超えない連続しているアミノ酸が含まれ、他の好ましいペプチド免疫原には、SOSTポリペプチドの少なくとも20個であって75個を超えない連続しているアミノ酸が含まれ、そして、他の好ましいペプチド免疫原には、SOSTポリペプチドの少なくとも21個のアミノ酸であって50個を超えない連続しているアミノ酸が含まれる。他の好ましいペプチド免疫原には、SOSTポリペプチド配列の21~25個、26~30個、31~35個、36~40個、41~50個、あるいは、21個から100個の間の任意の全整数個の連続しているアミノ酸、および100個から190個の間の任意の全整数個の連続しているアミノ酸が含まれる。

【0070】

SOSTに特異的に結合するポリクローナル抗体は、本明細書中に記載されている当業者に周知に方法を使用して調製することができる(例えば、Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press 1992); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Williams et al., "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.) page 15 (Oxford University Press 1995) を参照のこと)。TGF- β 結合タンパク質に対する抗体は、例えば、発現ベクターのTGF- β 結合タンパク質産物で動物を免疫することによって、または本明細書中に記載されているように、単離されたTGF- β 結合タンパク質もしくはそのペプチドフラグメントで免疫することによって、得ることができる。ポリクローナル抗体は、通常は、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウシ、またはヒツジのような動物中で惹起されるが、本発明の抗TGF- β 結合タンパク質抗体は、非ヒト霊長類から得ることもできる。有用な抗体をヒヒにおいて診断的および治療的に惹起させるための一般的な技術は、例えば、WO 91/11465 (1991) および Losman et al., Int. J. Cance

r 46:310, 1990に見ることができる。

【0071】

動物に注射するための免疫原の調製には、別の免疫原性タンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) またはウシ血清アルブミン (BSA) などのようなキャリアタンパク質に対する TGF- β 結合タンパク質 (またはその変異体もしくはフラグメント) の共有結合が含まれる。ポリペプチドまたはペプチド免疫原は、N 末端または C 末端のいずれかに 1 つ以上のさらなるアミノ酸を含む場合があり、これにより、結合手順が容易になる (例えば、KLH に対するペプチドの結合を容易にするためのシステインの付加)。ポリペプチドまたはペプチド中の他のアミノ酸残基は、キャリアポリペプチドに対する特定のアミノ酸位置での結合を防ぐために (例えば、ポリペプチド/ペプチドの内部の位置のシステインがセリン残基で置換される)、あるいは、可溶性を増大させるかまたは免疫原性を増大させるために、置換される場合もある。

【0072】

免疫原として使用される、TGF- β 結合タンパク質ペプチド、ポリペプチド、または TGF- β 結合タンパク質を発現する細胞は、アジュバント、例えば、フロイトの完全なアジュバントもしくは不完全なアジュバント、または Rib i アジュバントシステム (R i b i A d j u v a n t S y s t e m) (C o r i x a C o r p o r a t i o n, S e a t t l e, W A) 中に乳化させられる場合もある。例えば、Harlow et al., 前出もまた参照のこと。免疫原は、腹腔内、筋肉内、眼内、皮内、または皮下を含む多数の種々の経路を介して動物に注射することができる。一般的には、最初の注射後、動物には、好ましいスケジュールに従って 1 回以上の追加免疫が行われる。これは、特に、抗原、アジュバント (存在する場合には)、および/または特定の動物種に応じて変化する。免疫応答は、動物から定期的に採血し、ELISA またはオクタロニー試験などのような免疫学的検定において血清を調製して分析し、特異的な抗体力価を決定することによってモニターされる。一旦、適切な抗体力価が確立されると、動物は、定期的に採血されてポリクローナル抗血清が蓄えられるか、または、放血させられる場合もある。TGF- β 結合タンパク質またはペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体が、次いで、このような抗血清から、例えばプロテイン A を使用するアフィニティークロマトグラフィーによって精製され得る。あるいは、TGF- β 結合タンパク質もしくはペプチド、または特定の免疫された動物種の Ig 定常領域に特異的な抗体が適切な固体支持体上に固定されているアフィニティークロマトグラフィーを行うこともできる。

【0073】

本発明で使用される抗体としては、本明細書中に記載されており当該分野で公知の従来の免疫および細胞融合手順により調製される、モノクローナル抗体が挙げられる。モノクローナル抗 TGF- β 結合タンパク質抗体は、種々の技術を使用して作成することができる。特異的抗原に結合するモノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって得ることができる (例えば、Kohler et al., Nature 256:495, 1975; Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991); 米国特許第 RE32, 011 号、同第 4, 902, 614 号、同第 4, 543, 439 号、および同第 4, 411, 993 号; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol (eds.) (1980); および Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Picksley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli" in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), page 93 (O

xford University Press 1995) を参照のこと)。抗体フラグメントは、タンパク質分解的消化、または状況によっては、タンパク質分解的消化（例えば、パパインもしくはペプシンを使用する）の後、ジスルフィド結合の穏やかな還元およびアルキル化のような任意の適切な標準的な技術を使用して、それらから誘導することができる。あるいは、このようなフラグメントは、また、組み換え遺伝子操作技術によって作成することもできる。

【0074】

簡潔には、モノクローナル抗体は、例えば、ラット、ハムスター、あるいは好ましくはマウスのような動物に、TGF- β 結合タンパク質遺伝子産物またはそのペプチドフラグメントを含む免疫原、当該分野で公知であり本明細書中に記載される方法に従って注射することによって得ることができる。特異的抗体が産生されたことは、最初の注射後（注射は、ポリクローナル抗体の作成について本明細書中に記載されるいくつかの経路のうちのいずれか1つによって投与される）、および／または追加の注射の後、血清サンプルを得、そして当該分野で公知であり本明細書中に記載されているいくつかの免疫検出方法のうちのいずれか1つを使用してTGF- β 結合タンパク質またはペプチドに結合する抗体の存在を検出することによってモニターすることができる。TGF- β 結合タンパク質に結合する抗体を産生する動物から、脾臓またはリンパ節に由来する最も一般的な細胞であるリンパ系細胞が、取り出されて、Bリンパ球が得られる。Bリンパ球は、次いで、好ましくは、免疫された動物と同系であり、状況によっては、他の所望される特性（例えば、Ig遺伝子産物を内生的には発現できないこと、例えば、P3X63-Ag8.653 (ATCC No. CRL 1580); NS0、SP20) を有している、薬剤で感作された骨髓腫細胞の融合パートナーと融合させられて、不死化させられた真核生物細胞株であるハイブリドーマを生じる。リンパ球（例えば、脾臓）細胞と骨髓腫細胞が、数分間の間、膜融合促進剤、例えば、ポリエチレングリコールまたは非イオン性界面活性剤と共に混合され、その後、ハイブリドーマ細胞の増殖をサポートするが、融合していない骨髓腫細胞についてはサポートしない選択培地上で低密度にプレートされる。好ましい選択培地は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）である。十分な時間、通常は、およそ1週間から2週間の後、細胞のコロニーが観察される。単一のコロニーが単離され、細胞によって産生された抗体がTGF- β 結合タンパク質、またはその変異体もしくはフラグメントに対する結合活性について、当該分野で公知であって本明細書中に記載される種々の免疫学的検定のうちのいずれか1つを使用して試験され得る。SOSTに対して高い親和性と特異性を有しているモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが好ましい。したがって、TGF- β 結合タンパク質またはその変異体もしくはフラグメントに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが、本発明によって想定される。ハイブリドーマがクローニングされ（例えば、限界希釈クローニングによるか、または柔寒天プラーク分離によって）、そして抗原に特異的な抗体を産生するポジティブクローンが選択され、培養される。TGF- β 結合タンパク質のTGF- β ファミリーのメンバーに対する結合をブロックする、障害する、または妨害する抗体が好ましい。

【0075】

ハイブリドーマ培養物に由来するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物の上清から単離することもできる。マウスモノクローナル抗体の産生のための別の方法は、同系のマウス、例えば、モノクローナル抗体を含む腹水の形成を促進するように処置された（例えば、プリスタンで感作された）マウスの腹腔に、ハイブリドーマ細胞を注射することである。モノクローナル抗体は、種々の十分に確立されている技術によって単離し、精製することができる。このような単離技術としては、プロテインAセファロースを使用するアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる（例えば、Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, pa

10

20

30

40

50

ges 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992) を参照のこと)。モノクローナル抗体は、抗体の特定の特性（例えば、重鎖または軽鎖のイソ型、結合特異性など）に基づいて選択された適切なりガンドを使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製することもできる。固体支持体上に固定される適切なりガンドの例としては、プロテインA、プロテインG、抗定常領域（軽鎖または重鎖）抗体、抗イディオタイプ抗体、およびTGF- β 結合タンパク質、またはそのフラグメントもしくは変異体が挙げられる。

【0076】

さらに、本発明の抗TGF- β 結合タンパク質抗体は、ヒトモノクローナル抗体である場合もある。ヒトモノクローナル抗体は、当業者がよく知っている任意の多数の技術によって作成することができる。このような方法としては、限定的ではないが、ヒト末梢血細胞（Bリンパ球を含む）のエプスタインバーウイルス（EBV）形質転換、ヒトB細胞の生体外での免疫、ヒト免疫グロブリン遺伝子が挿入されている免疫されたトランスジェニックマウスからの脾臓細胞の融合、ヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリーからの単離、あるいは、当該分野で公知であり本明細書中の開示に基づく他の手順が挙げられる。例えば、ヒトモノクローナル抗体は、抗原でのチャレンジに応答して特異的ヒト抗体を生じるように操作されたトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、例えば、Green et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg et al., Nature 368:856, 1994; Taylor et al., Int. Immun. 6:579, 1994; 米国特許第5,877,397号; Bruggemann et al., 1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovits et al., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35に記載されている。この技術においては、ヒトの重鎖および軽鎖遺伝子座のエレメントが、内因性の重鎖および軽鎖遺伝子座が標的化されて破壊されている胚性幹細胞から誘導されたマウスの株に導入される（Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58 (1997) もまた参照のこと）。例えば、ヒトの免疫グロブリン遺伝子は、ミニ遺伝子構築物、または酵母の人工染色体上のトランス遺伝子座であり得、これは、B細胞特異的DNA再配置、およびマウスのリンパ系組織でのハイパー変異を受ける。ヒトモノクローナル抗体は、次いで、抗原に特異的なヒト抗体を産生することができるトランスジェニックマウスを免疫することによって得ることができる。免疫されたトランスジェニックマウスのリンパ系細胞は、本明細書中に記載される方法にしたがって、ヒト抗体を分泌するハイブリドーマを産生するために使用することができる。ヒト抗体を含むポリクローナル血清はまた、免疫された動物の血液から得ることができる。

【0077】

ヒトTGF- β 結合タンパク質特異的モノクローナル抗体を作成するための別の方法としては、EBV形質転換によってヒト末梢血を不死化させることが挙げられる。例えば、米国特許第4,464,456号を参照のこと。TGF- β 結合タンパク質（またはその変異体もしくはフラグメント）に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するこのような不死化B細胞株（またはリンパ芽球細胞株）は、本明細書中で提供されるような免疫検出方法、例えば、ELISAによって同定することができ、その後、標準的なクローニング技術によって単離することができる。抗TGF- β 結合タンパク質抗体を産生するリンパ芽球細胞株の安定性は、当該分野で公知の方法（例えば、Glasky et al., Hybridoma 8:377-89 (1989) を参照のこと）にしたがって、マウス-ヒトハイブリッド細胞株を生じるようにマウス骨髄腫細胞と形質転換した細胞株を融合させることによって、改善することができる。ヒトモノクローナル抗体を作成するためのさらに別の方法は、生体外での免疫であり、これには、抗原でヒトの脾臓B細胞を感作すること、その後、ヘテロハイブリッド融合パートナーと感作したB細胞を融合させることが含まれる。例えば、Boerner et al., 1991 J. Immunol

． 147：86－95を参照のこと。

【0078】

特定の実施形態においては、抗SOST抗体を産生するB細胞が選択され、軽鎖および重鎖可変領域が、当該分野で公知（WO92／02551；米国特許第5，627，052号；Babcock et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，93：7843－48（1996））であり、本明細書中に記載される分子生物学的技術にしたがってB細胞からクローニングされる。好ましくは、免疫された動物に由来するB細胞が、脾臓、リンパ節、または末梢血サンプルから、SOSTに特異的に結合する抗体を産生する細胞を選択することによって、単離される。B細胞は、また、ヒトから、例えば、末梢血サンプルから単離することもできる。所望される特異性を有している抗体を産生する単一のB細胞を検出するための方法は当該分野で周知であり、例えば、プラーク形成、蛍光活性化細胞分類、生体外での刺激、その後の特異的抗体の検出などによる。特異的抗体を産生するB細胞の選択のための方法としては、例えば、SOSTまたはそのペプチドフラグメントを含む柔寒天中のB細胞の単細胞懸濁物を調製することが挙げられる。抗原に対する、B細胞によって産生された特異的抗体の結合により、免疫沈降物としてみることができる複合体の形成が生じる。特異的抗体を産生するB細胞を選択した後、特異的抗体遺伝子を、当該分野で公知であり本明細書中に記載される方法にしたがって、DNAまたはmRNAを単離し、増幅することによりクローニングすることができる。

【0079】

特定の用途については、抗TGF- β 結合タンパク質抗体のフラグメントが望まれる場合がある。抗体フラグメント、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv、Fc、Fdは、抗体全体の抗原結合部位を保持しており、したがって、同じエピトープに結合する。抗体に由来するこれらの抗原結合フラグメントは、例えば、抗体のタンパク質分解的加水分解によって、例えば、従来の方法にしたがって抗体全体をペプシンまたはパパインで消化することによって、得ることができる。例えば、抗体フラグメントは、F(ab')₂と示される5Sフラグメントを生じるようにペプシンで抗体を酵素切断することによって産生することができる。このフラグメントは、さらに、3.5S Fab' 1価フラグメントを生じるように、チオール還元剤を使用して切断することができる。状況に応じて、切断反応は、ジスルフィド結合の切断によって生じるスルフヒドリル基についてのブロック基を使用して行うことができる。あるいは、パパインを使用する酵素切断により、2つの1価のFabフラグメントとFcフラグメントが直接得られる。これらの方法は、例えば、Goldenberg，米国特許第4，331，647号、Nisonoff et al.，Arch. Biochem. Biophys. 89：230，1960；Porter，Biochem. J. 73：119，1959；Edelman et al.，in Methods in Enzymology 1：422（Academic Press 1967）によって；およびColigan at pages 2.8.1－2.8.10 and 2.10－2.10.4によって記載されている。抗体を切断する、例えば、重鎖を分離して1価の軽－重鎖フラグメント（Fd）を形成させる、フラグメントのさらなる切断のための他の方法、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝子的技術もまた、フラグメントが完全な抗体によって認識される抗原に結合する限りは、使用することができる。

【0080】

抗体フラグメントは、また、それが特異的抗原に結合して複合体を形成する抗体と同様に作用する、任意の合成のタンパク質または遺伝子操作されたタンパク質である場合もある。例えば、抗体フラグメントとしては、軽鎖可変領域からなる単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメント、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結されている組み換えの単鎖ポリペプチド分子（scFvタンパク質）、および超可変領域を模倣するアミノ酸残基から構成される最小認識単位が挙げられる。本発明の抗体には、好ましくは、少なくとも1つの可変領域ドメインが含まれる。可変領域ドメインは、任意の大きさまたは任意のアミノ酸組成のものであり得、そし

て一般的には、抗原の結合を担っており、1つ以上のフレームワーク配列に隣接しているかまたはそれらとインフレームの関係にある少なくとも1つの超可変アミノ酸配列を含む。一般的な用語においては、可変(V)領域ドメインは、免疫グロブリン重(V_H)および/または軽(V_L)鎖可変ドメインの任意の適切な配置であり得る。したがって、例えば、V領域ドメインは1価の、 V_H または V_L ドメインである場合もあり、これらは互いに独立して受容可能な親和性で抗原に結合することができる。あるいは、V領域ドメインは二量体である場合もあり、これらとしては、 V_H-V_H 、 V_H-V_L 、または V_L-V_L 二量体が挙げられる。好ましくは、V領域二量体には、少なくとも1つの V_H と少なくとも1つの V_L 鎖が含まれ、これらは非共有的に結合させられている(本明細書中では以後Fvという)。所望される場合には、鎖を、直接、例えば、2つの可変ドメインの間のジスルフィド結合を介して、またはリンカー、例えば、ペプチドリナーを介してのいずれかで共有結合させて、単鎖Fv(scFv)を形成させることもできる。

10

【0081】

可変領域ドメインは、任意の自然界に存在している可変ドメイン、またはその操作されたバージョンである場合もある。操作されたバージョンによっては、組み換えDNA操作技術を使用して作成された可変領域ドメインが意味される。このような操作されたバージョンとしては、例えば、特異的抗体のアミノ酸配列中の、またはアミノ酸配列への挿入、欠失、または、変化によって特異的抗体可変領域から作成されたものが挙げられる。特定の例としては、第1の抗体に由来する少なくとも1つのCDRおよび状況に応じて1つ以上のフレームワークアミノ酸と、第2の抗体に由来する可変領域ドメインの残りを含む、操作された可変領域ドメインが挙げられる。

20

【0082】

可変領域ドメインは、少なくとも1つの他の抗体ドメインまたはそのフラグメントに対して、C末端アミノ酸で共有結合させることができる。したがって、例えば、可変領域ドメイン中に存在する V_H ドメインを、免疫グロブリン C_H1 ドメインまたはそのフラグメントに連結させることができる。同様に、 V_L ドメインを、 C_K ドメインまたはそのフラグメントに連結させることができる。この方法では、例えば、抗体は、抗原結合ドメインがそれぞれ $CH1$ および C_K ドメインに対してそれらのC末端で供給結合された結合させられた V_H および V_L ドメインを含む、Fabフラグメントであり得る。 $CH1$ ドメインは、例えば、Fab'フラグメント中に見ることができるヒンジ領域またはヒンジ領域ドメインの一部を提供するように、あるいは、抗体 $CH2$ および $CH3$ ドメインのようなさらなるドメインを提供するように、さらなるアミノ酸で伸張させることができる。

30

【0083】

抗体フラグメントの別の形態は、単鎖の相補性決定領域(CDR)を含むペプチドである。CDRペプチド(「最小認識単位」)は、目的の抗体のCDRをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得ることができる。このようなポリヌクレオチドは、例えば、鋳型として抗体を産生する細胞のmRNAを使用して、可変領域を合成するためのポリメラーゼ連鎖反応を使用して、調製される(例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995); and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al., (eds.), page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照のこと)。

40

【0084】

50

あるいは、抗体は、抗体の可変領域および／または定常領域をコードするDNAの操作および再発現を含む組み換えDNA技術を使用することによって得られる、組み換え抗体または操作された抗体であり得る。このようなDNAは公知であり、そして／または例えば、ファージ抗体ライブラリーを含むDNAライブラリーから容易に入手することができる（Chiswell and McCafferty, Tibtech. 10:80-84 (1992)を参照のこと）、あるいは所望される場合には、合成することもできる。標準的な分子生物学的手順および／または化学的手順を使用して、DNAを配列決定し操作することができ、例えば、システイン残基を作成するためにコドンを導入することができ、また、所望される場合には他のアミノ酸またはドメインを修飾、付加、もしくは欠失させることもできる。

10

【0085】

TGF- β 結合タンパク質に特異的なキメラ抗体には、ヒト化抗体が含まれ、これは、本発明にしたがって作成することもできる。キメラ抗体は、第1の哺乳動物種に由来する少なくとも1つの定常領域ドメインと、第2の異なる哺乳動物種に由来する少なくとも1つの可変領域ドメインを有している（例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)を参照のこと）。好ましい実施形態においては、キメラ抗体は、非ヒトモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの可変領域ドメイン、例えば、マウス、ラット、もしくはハムスターのモノクローナル抗体に由来する可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を、少なくとも1つのヒト定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクター中にクローニングすることによって構築することができる（例えば、Shin et al., Methods Enzymol. 178:459-76 (1989); Walls et al., Nucleic Acids Res. 21:2921-29 (1993)を参照のこと）。例えば、マウスのモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列は、ヒト κ 軽鎖定常領域配列をコードするヌクレオチド配列を含むベクター中に挿入することができる。別のベクター中には、モノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を、ヒトIgG定常領域、例えば、ヒトIgG1定常領域をコードする配列とインフレームでクローニングすることができる。選択される特定のヒト定常領域は、特定の抗体について所望されるエフェクター機能に応じて変化し得る（例えば、特定のFcレセプターに対する相補性固定、結合など）。好ましくは、構築されたベクターは、キメラ抗体の安定な発現のために真核生物細胞中にトランスフェクトされる。キメラ抗体を作成するための当該分野で公知の別の方法は、相同組み換えである（例えば、米国特許第5,482,856号）。

20

30

【0086】

非ヒト／ヒトキメラ抗体は、さらに、「ヒト化」抗体を作成するために遺伝子操作することができる。このようなヒト化抗体は、非ヒト哺乳動物種の免疫グロブリンに由来する複数のCDR、少なくとも1つのヒトの可変フレームワーク領域、および少なくとも1つのヒト免疫グロブリン定常領域を含むことができる。ヒト化抗体を設計するための有用な方法論としては、例えば、例であって限定的ではないが、キメラ抗体の非ヒトフレームワーク領域に最も相同であるヒト可変フレームワーク領域の同定が挙げられる。いかなる理論にも束縛されることは望まないが、このような方法論により、ヒト化抗体がTGF- β 結合タンパク質に対して特異的結合親和性を保持する確実性を増大させることができ、いくつかの好ましい実施形態においては、これにより、TGF- β 結合タンパク質またはその変異体もしくはフラグメントについて実質的に同じ親和性を有することができ、特定の他の好ましい実施形態においては、TGF- β 結合タンパク質についてより大きい親和性を有することができる。例えば、Jones et al., 1986 Nature 321:522-25; Richmann et al., 1988 Nature 332:323-27を参照のこと。したがって、このようなヒト化抗体の設計には、非ヒト可変領域のCDRループ立体構造と構造決定基を、例えば、コンピュータによるモデル化によって決定すること、その後、既知のヒトCDRループ構造および決定基とこのCDRループ

40

50

および決定基を比較することが含まれる。例えば、Padlan et al., 1995 FASEB 9:133-39; Chothia et al., 1989 Nature, 342:377-383を参照のこと。コンピュータによるモデル化はまた、配列相同性によって選択されるヒト構造の鋳型を、非ヒト可変領域と比較するために使用することもできる。例えば、Bajorath et al., 1995 Ther. Immunol. 2:95-103; EP-0578515-A3を参照のこと。非ヒトCDRのヒト化により結合親和性が低下する場合は、コンピュータによるモデル化によって、部位特異的突然変異技術または他の突然変異技術により変化させて、部分的に、完全に、または状況に応じて上にまで親和性を回復させる（すなわち、ヒト化されていない抗体よりも大きいレベルにまで増大させる）ことができる特異的アミノ酸残基を同定するために役立てることができる。当業者は、これらの技術を十分に理解しており、このような設計方法論に対して多数のバリエーションおよび変更を容易に加えることができる。

10

【0087】

ヒト化抗体を調製するための1つのこのような方法は、ベニヤリング (veneer ing) と呼ばれる。本明細書中で使用される場合は、用語「ベニヤFR (veneered FR)」および「組み換えによるベニヤFR」は、自然界のFRポリペプチドの折りたたみ構造の実質的に全てを維持している抗原結合部位を含む異種分子を提供するために、ヒトFR残基で、例えば、齧歯類の重鎖または軽鎖V領域に由来するFR残基を選択的に置き換えることをいう。ベニヤ技術は、抗原結合部位のリガンド結合特性が抗原結合表面内の重鎖および軽鎖CDRのセットの構造および相対的性質によって主に決定されるという理解に基づく。Davies et al., Ann. Rev. Biochem. 59:439-73, 1990。したがって、抗原結合特異性は、CDR構造、それらの互いの相互作用、およびV領域ドメインの残りとのそれらの相互作用が注意深く維持されているヒト化抗体のみにおいて保存され得る。ベニヤ技術を使用することにより、免疫系と容易に接触する外側（例えば、溶媒露出）FR残基を、ヒト残基と選択的に置き換えて、弱い免疫原性であるかまたは実質的に免疫原性ではないベニヤ表面のいずれかを含むハイブリッド分子が得られる。

20

【0088】

ベニヤリングのプロセスでは、Kabat et al., in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., (U. S. Dept. of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office, 1987) によって集められたヒト抗体の可変ドメインについての入手可能な配列データ、Kabatデータベースのアップデート、ならびに他の利用できる米国および他国のデータベース（核酸とタンパク質の両方）を利用する。V領域のアミノ酸の溶媒露出度は、ヒトおよびマウスの抗体フラグメントについての既知の三次元構造から推定することができる。最初に、目的の抗体分子の可変ドメインのFRが、上記で同定された供給源から得られたヒト可変ドメインの対応するFR配列と比較される。最も相同であるヒトV領域が、次いで、対応するマウスのアミノ酸に対して1残基ずつ比較される。ヒトの対応物とは異なるマウスのFR中の残基は、当該分野で周知の組み換え技術を使用してヒト部分中に存在する残基で置き換えられる。残基の交換は、少なくとも一部が露出している（溶媒露出）部分についてのみ行われ、V領域ドメインの三次構造に対して顕著な影響を及ぼす可能性があるアミノ酸残基、例えば、プロリン、グリシン、および電荷を有しているアミノ酸の置き換えには注意が払われる。

30

40

【0089】

この様式では、得られる「ベニヤ」抗原結合部位は、したがって、齧歯類CDR残基、実質的にCDRに隣接している残基、埋まっているかまたはほぼ埋まっている（溶媒露出ではない）と同定された残基、重鎖ドメインと軽鎖ドメインの間での非共有的な（例えば、静電気的および疎水的）接触に関与していると考えられる残基、CDRループの「標準的な」三次構造に影響を与えると考えられるFRの保存されている構造領域に由来する残

50

基を保持するように設計される。これらの設計基準は、次いで、齧歯類の抗体分子の抗原特異性を示す組み換えヒト抗体を発現させるために哺乳動物細胞をトランスフェクトするために使用することができる、ヒトの見かけ上のFR中の抗原結合部位の重鎖および軽鎖の両方のCDRを併せ持つ組み換えヌクレオチド配列を調製するために使用される。

【0090】

TGF- β 結合タンパク質またはその変異体もしくはフラグメントに特異的に結合する抗体を選択するための別の方法は、ファージディスプレイによる。例えば、Winter et al., 1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433-55; Burton et al., 1994 Adv. Immunol. 57:191-280を参照のこと。ヒトまたはマウスの免疫グロブリン可変領域遺伝子の組み合わせライブラリーは、ファージベクター中で作成することができ、これを、TGF- β 結合タンパク質またはその変異体もしくはフラグメントに特異的に結合するIgフラグメント(Fab、Fv、sFv、またはそれらの多量体)を選択するためにスクリーニングすることができる。例えば、米国特許第5,223,409号;Huse et al., 1989 Science 246:1275-81;Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5728-32(1989);Altling-Mees et al., Strategies in Molecular Biology 3:1-9(1990);Kang et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4363-66;Hoogenboom et al., 1992 J. Molec. Biol. 227:381-388;Schlebusch et al., 1997 Hybridoma 16:47-52およびその中で引用されている参考文献を参照のこと。例えば、複数のIg可変領域フラグメントをコードする複数のポリヌクレオチド配列を含むライブラリーを、糸状バクテリオファージ、例えば、M13またはその変異体のゲノム中に、ファージコートタンパク質をコードする配列とインフレームになるように挿入することができる。融合タンパク質は、軽鎖可変領域ドメインと、および/または重鎖可変領域ドメインとのコートタンパク質の融合体であり得る。特定の実施形態によれば、免疫グロブリンFabフラグメントをもまた、ファージ粒子上で提示することができる(例えば、米国特許第5,698,426号を参照のこと)。

【0091】

重鎖および軽鎖免疫グロブリンcDNA発現ライブラリーは、また、 λ ファージ、例えば、 λ ImmunoZapTM(H)および λ ImmunoZapTM(L)ベクター(Stratagene, La Jolla, California)を使用して、調製することができる。簡単に言うと、mRNAはB細胞の集団から単離され、 λ ImmunoZap(H)および λ ImmunoZap(L)ベクター中の重鎖および軽鎖免疫グロブリンcDNA発現ライブラリーを作成するために使用される。これらのベクターは、別々にスクリーニングすることができ、また、Fabフラグメントまたは抗体を形成するように同時に発現させることもできる(Huse et al., 前出を参照のこと;また、Sastry et al., 前出も参照のこと)。ポジティブなブランクが、続いて、非溶解性プラスミドに転換させられ得、これによって、大腸菌(E. coli)からモノクローナル抗体フラグメントを高いレベルで発現させることができる。

【0092】

同様に、抗体の一部またはフラグメント、例えば、FabおよびFvフラグメントは、従来の酵素消化または組み換えDNA技術を使用して、TGF- β 結合タンパク質に特異的な抗体をコードする遺伝子の可変領域を組み込むように構築することもできる。1つの実施形態においては、ハイブリドーマ中で、目的のモノクローナル抗体を発現する遺伝子の可変領域が、ヌクレオチドプライマーを使用して増幅される。これらのプライマーは、当業者が合成することができ、また、商業的な販売元から購入することもできる(例えば、Stratagene(La Jolla, California)を参照のこと。ここで、特に、V_{H a}、V_{H b}、V_{H c}、V_{H d}、C_{H 1}、V_L、およびC_L領域についてのプライマーを含む、マウスおよびヒトの可変領域についてのプライマーを販売している

）。これらのプライマーは、重鎖または軽鎖の可変領域を増幅するために使用することができ、次いで、これは、それぞれ、ImmunoZAPTMHまたはImmunoZAPTML (Stratagene) のようなベクター中に挿入することができる。これらのベクターは、次いで、発現させるために、大腸菌 (E. coli)、酵母、または哺乳動物に基づく系の中に導入することができる。V_H および V_L ドメインの融合体を含む大量の単鎖タンパク質を、これらの方法を使用して産生することができる (Bird et al., Science 242: 423-426, 1988を参照のこと)。さらに、このような技術を使用して、抗体の結合特異性を変化させることなく非ヒト抗体のV領域をヒト化することができる。

【0093】

本発明の特定の具体的な実施形態においては、組み合わせファージライブラリーを、非ヒト可変領域をヒト化するために使用することもできる。例えば、Rosok et al., 1996 J. Biol. Chem. 271: 22611-18; Rader et al., 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8910-15を参照のこと。ファージライブラリーは、当該分野で公知であり本明細書中に記載される免疫検出方法によって、目的のIg可変領域フラグメントを選択するようにスクリーニングすることができ、そのように選択されたファージ中に挿入されている免疫グロブリン遺伝子のDNA配列を、標準的な技術によって決定することができる。Sambrook et al., 2001 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。選択されたIgをコードする配列は、次いで、Igフラグメントを発現させるための別の適切なベクターにクローニングされるか、または場合によっては、免疫グロブリン鎖全体を発現させるために、Ig定常領域を含むベクターにクローニングされる。

【0094】

特定の他の実施形態においては、本発明により、多量体抗体フラグメントであるSOST特異的抗体が想定される。有用な方法は、例えば、Hayden et al., 1997, Curr. Opin. Immunol. 9: 201-12; Coloma et al., 1997 Nat. Biotechnol. 15: 159-63に一般的に記載されている。例えば、多量体抗体フラグメントは、ミニ抗体を形成させるためのファージ技術 (米国特許第5, 910, 573号) またはダイアボディーを形成させるためのファージ技術 (Holliger et al., 1997, Cancer Immunol. Immunother. 45: 128-130) によって作成することができる。

【0095】

本発明の特定の実施形態においては、SOSTに特異的な抗体は、細胞内タンパク質として発現される抗体であり得る。このような細胞内抗体は、また、イントラボディー (intrabody) と呼ばれ、これにはFabフラグメントが含まれる場合があり、また、好ましくは、scFvフラグメントが含まれる (例えば、Lecerf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 4764-49 (2001)を参照のこと)。CDR領域に隣接するフレームワーク領域は、細胞内の還元性の環境においてイントラボディーの発現レベルと溶解性を改善するように修飾することができる (例えば、Worn et al., J. Biol. Chem. 275: 2795-803 (2000)を参照のこと)。イントラボディーは、例えば、細胞内の特定の標的抗原をコードするポリヌクレオチド配列に対して作動するように融合させることができるイントラボディーの可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを構築することによって、特定の細胞位置または細胞小器官に向けることができる (例えば、Graus-Porta et al., Mol. Cell Biol. 15: 1182-91 (1995); Lener et al., Eur. J. Biochem. 267: 1196-205 (2000)を参照のこと)。イントラボディーは、遺伝子治療ベクターもしくは脂質混合物 (例えば、Imgenex Corporation, San Diego, CAによって製造されたProvectinTM) を介することを含む当業者が利用することが

できる種々の技術によって、または光化学的インターナライゼーション法にしたがって、細胞中に導入することができる。

【0096】

TGF- β 結合タンパク質に特異的な免疫グロブリン分子中にアミノ酸変異を導入することは、TGF- β 結合タンパク質に対する特異性または親和性を増大させるため、あるいはエフェクター機能を変化させるために有効であり得る。TGF- β 結合タンパク質に対して高い親和性を有している免疫グロブリンは、特定の残基の部位特異的突然変異誘発によって作成することができる。コンピュータ支援三次元分子モデリングを使用して、TGF- β 結合タンパク質に対する親和性を改善するために、変化させるアミノ酸残基を同定することができる。例えば、Mountain et al., 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10:1-142を参照のこと。あるいは、CDRの組み合わせライブラリーをM13ファージ中に作成し、親和性が改善された免疫グロブリンフラグメントをスクリーニングすることができる。例えば、Glaser et al., 1992, J. Immunol. 149:3903-3913; Barbas et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3809-13; 米国特許第5,792,456号を参照のこと。

10

【0097】

エフェクター機能は、また、部位特異的変異誘発によって変化させることもできる。例えば、Duncan et al., 1988 Nature 332:563-64; Morgan et al., 1995 Immunology 86:319-24; Eghedardarzedeh-Kondri et al., 1997 Biotechniques 23:830-34を参照のこと。例えば、免疫グロブリンのFc部分上のグリコシル化部位の変異により、相補性を固定する免疫グロブリンの能力を変化させることができる。例えば、Wright et al., 1997 Trends Biotechnol. 15:26-32を参照のこと。定常領域ドメイン中の他の変異によっても、相補性を固定する、または抗体依存性の細胞性の細胞傷害性に影響を与える、免疫グロブリンの能力を変化させることができる場合もある。例えば、Duncan et al., 1988 Nature 332:563-64; Morgan et al., 1995 Immunology 86:319-24; Sensel et al., 1997 Mol. Immunol. 34:1019-29を参照のこと。

20

30

【0098】

特定の実施形態によれば、本明細書中に記載されるIg分子のいずれかの非ヒト、ヒト、またはヒト化重鎖および軽鎖可変領域は、単鎖Fv (scFv) ポリペプチドフラグメント (単鎖抗体) として構築することができる。例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426; Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883を参照のこと。多機能scFv融合タンパク質は、scFvポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、インフレームで、種々の既知のエフェクタータンパク質のいずれかをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列と連結させることによって作成することができる。これらの方法は当該分野で公知であり、例えば、EP-B1-0318554号、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、および米国特許第5,476,786号に開示されている。例えば、エフェクタータンパク質には、免疫グロブリン定常領域配列が含まれる場合がある。例えば、Hollenbaugh et al., 1995 J. Immunol. Methods 188:1-7を参照のこと。エフェクタータンパク質の他の例は酵素である。限定的ではないが例として、このような酵素は、治療目的のために生物学的活性を提供することができる場合があり (例えば、Siemers et al., 1997 Bioconj. Chem. 8:510-19を参照のこと)、また、診断用途のための検出可能な活性、例えば、検出可能な生成物中の多数の周知の基質のいずれかの西洋ワサビペルオキシダーゼによって触媒される転換を提供する場合もある。scFv融合タンパク質のさらに他の例としては、scFvポリペ

40

50

チドが毒素に連結されている I g - 毒素融合体、または免疫毒素複合体が挙げられる。

【0099】

本明細書中に記載される s c F v または任意の抗体フラグメントは、特定の実施形態においては、融合タンパク質と抗原（例えば、T G F - β 結合タンパク質）との間の特異的結合の検出を可能にするペプチドまたはポリペプチドドメインに融合させることができる。例えば、融合ポリペプチドドメインは、当業者が十分に理解している種々の技術のいずれかによって T G F - β 結合タンパク質に対する s c F v 融合タンパク質の結合を検出するための、親和性タグポリペプチドであり得る。ペプチドタグの例としては、アビジン、ストレプトアビジン、または H i s（例えば、ポリヒスチジン）が挙げられる。検出技術としては、また、例えば、ビオチンに対するかまたはビオチン模倣配列に対するアビジンまたはストレプトアビジン融合タンパク質の結合（例えば、L u o et al., 1998 J. Biotechnol. 65: 225 およびその中で引用されている参考文献を参照のこと）検出可能な部分（例えば、標識部分）との融合タンパク質の直接の共有結合による修飾、特異的な標識されたレポーター分子に対する融合タンパク質の非共有的な結合、酵素活性を有している部分を含む融合タンパク質による検出可能な基質の酵素的修飾、あるいは、固相支持体上への融合タンパク質の固定（共有結合または非共有結合）を挙げることができる。s c F v 融合タンパク質の構築のための他の有用な親和性ポリペプチドとしては、例えば、W O 8 9 / 0 3 4 2 2、米国特許第 5, 4 8 9, 5 2 8 号、米国特許第 5, 6 7 2, 6 9 1 号、W O 9 3 / 2 4 6 3 1、米国特許第 5, 1 6 8, 0 4 9 号、米国特許第 5, 2 7 2, 2 5 4 号に開示されているようなストレプトアビジン融合タンパク質、アビジン融合タンパク質（例えば、E P 5 1 1, 7 4 7 を参照のこと）；グルタチオン-S-トランスフェラーゼのような酵素；ならびに黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）プロテイン A ポリペプチドを挙げることができる。

【0100】

本明細書中に記載されるような T G F - β 結合タンパク質に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、多数の公知の発現ベクターを用いる核酸の切断、連結、形質転換、およびトランスフェクションについての種々の周知の手順のうちのいずれかにしたがって、増幅させ、発現させることができる。したがって、特定の実施形態においては、抗体フラグメントの発現が、原核生物宿主、例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）（例えば、P l u c k t h u n et al., 1989 Methods Enzymol. 178: 497-515 を参照のこと）中で行われることが好ましい場合がある。特定の他の実施形態においては、抗体またはそのフラグメントの発現は、酵母（例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロマイセス・ボンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、およびピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、動物細胞（哺乳動物細胞を含む）、または植物細胞を含む真核生物宿主細胞中で行われることが好ましい場合がある。適切な動物細胞の例としては、骨髓腫（例えば、マウスの N S O 株）、C O S、C H O、またはハイブリドーマ細胞が挙げられるが、これらに限定されない。植物細胞の例としては、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、およびコメの細胞が挙げられる。

【0101】

可変領域および／または定常領域をコードする D N A を含む 1 つ以上の複製可能な発現ベクターを調製し、これを使用して、適切な細胞株、例えば、マウス N S O 株のような非産生性骨髓腫細胞株、または大腸菌（*E. coli*）のような細菌を形質転換することができる。これらの細胞の中では、抗体の産生が生じる。効率のよい転写および翻訳を得るために、それぞれのベクター中の D N A 配列には、適切な調節配列、特に、可変ドメイン配列に動作可能に連結されたプロモーターおよびリーダー配列が含まれるべきである。この方法で抗体を産生するための特定の方法は、一般的に周知であり、日常的に使用されている。例えば、基本的な分子生物学的手順が、M a n i a t i s et al. に記載されている（*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*

, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; Maniatis et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001) もまた参照のこと)。DNA配列決定は、Sanger et al., (PNAS 74:5463 (1977)) および Amersham International plc sequencing handbook に記載されているように行うことができ、部位特異的突然変異誘発は、当該分野で公知の方法にしたがって行うことができる (Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12:9441, (1984); Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-92 (1985); Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154:367-82 (1987); the Anglian Biotechnology Ltd handbook)。さらに、多数の刊行物によって、DNAの操作、発現ベクターの作成、および適切な細胞の形質転換による抗体の調製に適切な技術が記載されている (Mountain A and Adair, J R in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (ed. Tombs, M P, 10, Chapter 1, 1992, Intercept, Andover, UK); International Patent Specification No. Wo 91/09967)。

【0102】

特定の実施形態においては、本発明の抗体は、それに結合させられた1つ以上のエフェクターまたはレポーター分子を含む場合がある。レポーター分子は、酵素、細胞毒性薬、または他のレポーター分子のような検出可能な部分もしくは標識であり得、これには、色素、放射性核種、発光団、蛍光団、もしくはビオチンなどが含まれる。TGF- β 結合タンパク質に特異的な免疫グロブリンまたはそのフラグメントは、診断適用または治療適用のために放射標識することができる。抗体を放射標識するための技術は当該分野で公知である。例えば、Adams 1998 In Vivo 12:11-21; Hiltune 1993 Acta Oncol. 32:831-9を参照のこと。治療適用は、以下にさらに詳細に記載され、これには、他の治療薬と組み合わせて、TGF- β 結合タンパク質特異的抗体（またはそのフラグメント）を使用することが含まれ得る。エフェクターまたはレポーター分子は、結合または結合プロセスが、分子の有用性が損なわれるような結合特性に対する悪影響は及ぼさない限りは、抗体中に存在する任意の利用可能なアミノ酸側鎖、末端アミノ酸、または炭水化物官能基のいずれかを介して抗体に結合させることができる。特定の官能基としては、例えば、任意の遊離のアミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、またはアルデヒド基が挙げられる。抗体の、エフェクターおよび/またはレセプター分子（単数または複数）との結合は、このような基と、エフェクターまたはレポーター分子中の適切な官能基を介して行うことができる。連結は、直接的、あるいは、スパーサーまたは架橋基を介して間接的であり得る。

【0103】

エフェクター分子としては、例えば、抗腫瘍薬、毒素（例えば、細菌の酵素的に活性な毒素（例えば、シュドモナスアエルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa) のエクソトキシンA、植物に起源するものおよびそのフラグメント（例えば、リシンおよびそのフラグメント、植物ゲロニン (gelonin)、セイヨウスズメウリ (Bryonia dioica) 由来のブリオジン (bryodin)）などが挙げられる。例えば、Thrush et al., 1996 Annu. Rev. Immunol. 14:49-71; Frankel et al., 1996 Cancer Res. 56:926-32を参照のこと。さらなるエフェクター分子としては、生物学的に活性なタンパク質（例えば、酵素）、核酸およびそのフラグメント、自然界に存在している高分子および合成の高分子、例えば、多糖類およびポリ（エチレングリコール）のようなポリアルキレンポリマーならびにそれらの誘導体、放射性核種、特に、放射性同位元素、ならびにキレート金属が挙げられる。適切なレポーター基としては、キレート金属、蛍光化

合物、または、NMRもしくはESR分光分析によって検出することができる化合物が挙げられる。特に有用なエフェクター基は、カリカエミシン (calicchaemicin) およびその誘導体である (例えば、南アフリカ共和国特許明細書 No. 85/8794 号、同第 88/8127 号、および同第 90/2839 号を参照のこと)。

【0104】

多数の他の毒素 (化学療法薬、抗有糸分裂薬、抗生物質、アポトーシスの誘導因子 (すなわち、「アポトーシス刺激因子」、例えば、Green and Reed, 1998, Science 281: 1309-1312 を参照のこと) などを含む) は当業者に公知であり、本明細書中で提供される例は、本発明の範囲および精神を説明するために意図され、限定するものではない。特定の抗新生物薬としては、細胞毒性薬および細胞増殖抑制剤、例えば、ナイトロジェンマスタードのようなアルキル化剤 (例えば、クロラムブシル、メルファラン、メクロルエタミン、シクロホスファミド、またはウラシルマスタード) およびそれらの誘導体、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、ブスルファン、またはシスプラチン) ; 代謝拮抗物質 (例えば、メトトレキセート、フルオロウラシル、フロキシウリジン、シタラビン、メルカプトプリン、チオグアニン、フルオロ酢酸、またはフルオロクエン酸)、抗生物質 (例えば、ブレオマイシン (例えば、硫酸ブレオマイシン)、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン (例えば、マイトマイシン C)、アクチノマイシン (例えば、ダクチノマイシン)、プリカマイシン、カリカエミシンおよびそれらの誘導体、またはエスペラマイシンおよびそれらの誘導体 ; 有糸分裂阻害因子 (例えば、エトポシド、ビンクリスチンまたはビンブラスチンおよびそれらの誘導体) ; アルカロイド (例えば、エリブチシン) ; ポリオール (例えば、タキシシンー I またはタキシシンー II) ; ホルモン (例えば、アンドロゲン (例えば、ドロモスタノロンまたはテストラクトン)、プロゲステロン (例えば、酢酸メゲストロールまたは酢酸メドロキシプロゲステロン)、エストロゲン (例えば、ジメチルスチルベストロールニリン酸、リン酸ポリエストラジオール、またはリン酸エストラムスチン)、あるいは、抗エストロゲン (例えば、タモキシフェン) ; アントラキノン (例えば、ミトキサントロン)、尿素 (例えば、ヒドロキシ尿素) ; ヒドラジン (例えば、プロカルバジン) ; あるいはイミダゾール (例えば、ダカルバジン)) が挙げられる。

【0105】

エフェクター分子として有用なキレート金属としては、2 から 8 までの配位数を有している 2 価または 3 価の陽性金属のキレートが挙げられる。このような金属の特定の例としては、テクネシウム (Tc)、レニウム (Re)、コバルト (Co)、銅 (Cu)、金 (Au)、銀 (Ag)、鉛 (Pb)、ビスマス (Bi)、インジウム (In)、ガリウム (Ga)、イリウム (Y)、テルビウム (Tb)、ガドリニウム (Gd)、およびスカンジウム (Sc) が挙げられる。一般的には、金属は、好ましくは放射性核種である。具体的な放射性核種としては、 ^{99m}Tc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{58}Co 、 ^{60}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{195}Au 、 ^{199}Au 、 ^{110}Ag 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、 ^{207}Bi 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{160}Tb 、 ^{153}Gd 、および ^{47}Sc が挙げられる。キレート金属は、例えば、任意の適切な多縮合キレート化剤、例えば、非環式ポリアミンまたは環式ポリアミン、ポリエーテル (例えば、クラウンエーテルおよびそれらの誘導体)、ポリアミド ; ポルフィリン ; ならびに炭素環式誘導体でキレート化された上記のタイプの金属の 1 つであり得る。一般的には、キレート化剤のタイプは、使用される金属に応じて異なる。本発明にしたがう組み合わせにおいて、1 つの特に有用なキレート化剤のグループには、しかし、非環式および環式ポリアミンが、特に、ポリアミノカルボン酸、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸およびその誘導体、ならびにマクロ環式アミン、例えば、環式トリアザおよびテトラアザ誘導体 (例えば、国際公開番号 No. WO 92/22583 号明細書に記載されているもの) ; ならびにポリアミド、特に、デフォリオキサミンおよびその誘導体が含まれる。

【0106】

抗体中のチオール基が結合点として使用される場合には、エフェクター分子は、エフェ

10

20

30

40

50

クター分子またはレポーター分子中に存在するチオール反応基を用いて生じる反応により結合させることができる。このような基の例としては、 α -ハロカルボン酸またはエステル（例えば、ヨードアセトアミド）、イミド（例えば、マレイミド）、ビニルスルホン、またはジスルフィドが挙げられる。これらおよび他の適切な連結手順は、国際公開番号 WO 93/06231、同 WO 92/22583、同 WO 90/091195、および同 WO 89/01476 明細書に、一般的に具体的に記載されている。

【0107】

本発明により、また、本明細書中で提供される SOST ポリペプチドまたはその変異体もしくはフラグメントに特異的に結合する抗体（またはその抗原結合フラグメント）を認識する抗イディオタイプ抗体の作成も想定される。抗イディオタイプ抗体は、本明細書中に記載される方法により、抗 TGF- β 結合タンパク質抗体（またはその抗原結合フラグメント）を免疫原として使用して、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として作成することができる。抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントはまた、上記の組み換え遺伝子操作方法のいずれかによって、あるいは、ファージディスプレイ選択によって作成することもできる。抗イディオタイプ抗体は、抗 SOST 抗体の抗原結合部位と反応することができ、その結果、SOST ポリペプチドに対する抗体の結合が競合的に阻害される。あるいは、本明細書中で提供される抗イディオタイプ抗体は、TGF- β 結合タンパク質に対する抗 TGF- β 結合タンパク質抗体の結合を競合的に阻害できない場合もある。

【0108】

本発明の特定の実施形態においては、SOST に特異的に結合する抗体は、SOST ポリペプチドの発現を検出するために使用することができる。ある特定の実施形態においては、1つの抗体または抗体のパネルを、SOST ポリペプチドを発現する細胞に曝して、SOST ポリペプチドの発現を、アッセイにおいて最初に使用した抗体（単数または複数）以外の異なるエピトープに結合する別の SOST 特異的抗体を使用して検出することによって、決定することができる。

【0109】

（骨密度を増大させる因子を選択するためのアッセイ）

上記で議論したように、本発明により、骨密度を増大させることができる因子を選択および／または単離するための方法が提供される。特定の好ましい実施形態においては、この因子は、SOST（TGF- β 結合タンパク質）に特異的に結合する抗体、またはその変異体もしくはフラグメントである。例えば、本発明の1つの実施形態様においては、因子が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定するための方法が提供される。この方法には、（a）候補の因子を、TGF- β 結合タンパク質と TGF- β ファミリーのタンパク質のメンバーと接触させるか、または混合する工程、および（b）候補の因子が TGF- β ファミリーのタンパク質によるシグナル伝達を刺激するか、または TGF- β ファミリーのタンパク質の1つ以上のメンバーに対する TGF- β 結合タンパク質の結合を妨害するもしくは阻害するかどうかを決定する工程が含まれる。特定の実施形態においては、因子は、間葉細胞の分化のポジティブな調節因子として作用する TGF- β の能力を増強する。

【0110】

本発明の好ましい実施形態においては、TGF- β シグナル伝達経路を調節する抗体を同定するための方法が提供される。この方法には、SOST ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、本明細書中に開示されるペプチドを含むがこれに限定されない SOST ペプチドと、抗体と SOST（抗体／SOST）との複合体を形成させるために十分な条件下で、十分な時間の間、接触させること、ならびに、その後、SOST／抗体複合体の濃度を検出（例えば、量を定量）して、TGF- β シグナル伝達経路を調節する抗体の存在を決定することが含まれる。この方法は、SPR、または、ELISA、免疫ブロット法などを含む当該分野で公知であり本明細書中で開示される多数の種々の免疫学的検定を使用して行うことができる。TGF- β シグナル伝達経路としては、BMP が細胞上の I 型お

よび I I 型レセプターに結合して、骨のミネラル含有量を調節する経路を刺激するかまたは誘導する、シグナル伝達経路が挙げられる。本発明の特定の好ましい実施形態においては、S O S T に特異的に結合する抗体が、骨のミネラル含有量を増大させる経路を刺激するか、または増強する。このような抗体は、S O S T 特異的ペプチドに対する抗体の結合を検出するための本明細書中で開示される方法を使用して同定することができる。

【0111】

本発明の方法は、また、BMP が結合する S O S T 上の領域またはそのような領域の一部に存在する S O S T ペプチド、例えば、S O S T のアミノ末端のペプチド、およびアミノ末端アミノ酸残基を含むペプチド、および S O S T のコア領域（ドッキングコア）の部分（例えば、配列番号 2 ～ 19、21 ～ 28、および 47 ～ 50）に対して抗体が結合するかどうかを検出することにより、S O S T ポリペプチドに対する BMP の結合を妨害する、阻害する（競合的に阻害することを含む）、または妨げる抗体を同定するために使用することもできる。本発明の方法は、S O S T ホモ二量体の形成を妨害する、妨げる、もしくは阻害する抗体を同定するためにも使用することができる。S O S T に特異的に結合するこのような抗体は、S O S T のコア領域またはカルボキシ末端領域に由来するペプチド（例えば、配列番号 29 ～ 46 および 51 ～ 54）に対する抗体の結合を検出することによって、同定することができる。

【0112】

本発明の他の実施形態においては、因子が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定するための方法が提供される。この方法には、（a）TGF- β 結合タンパク質を発現する細胞に対して候補の因子を接触させる工程、および（b）曝された細胞中での TGF- β 結合タンパク質の発現が低下するかどうか、または TGF- β 結合タンパク質の活性が低下するかどうかを決定し、それによって、化合物が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定する工程が含まれる。1つの実施形態においては、細胞としては、骨の生検による、自発的に形質転換されたまたは形質転換されていない正常なヒトの骨、あるいは、ラットの頭骨頭頂部の骨芽細胞を挙げることができる。

【0113】

免疫学的検定を、TGF- β 結合タンパク質の発現を検出し定量するために使用することができ、これには、例えば、等電点免疫電気泳動（Counter current Immunoelectrophoresis (CIEP)）、放射免疫測定、放射免疫沈降、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、免疫ブロット法（例えば、ドットブロット法、ウェスタンブロット法、阻害または競合アッセイ、およびサンドイッチアッセイが挙げられる）（米国特許第 4,376,110 号、および同第 4,486,530 号を参照のこと；また、Antibodies: A Laboratory Manual, 前出も参照のこと）。このような免疫学的検定では、本明細書中に記載される抗スクロスチン抗体のような TGF- β 結合タンパク質に特異的な抗体を使用することができる場合があり、また、TGF- β 結合タンパク質に結合させたレポーター分子に特異的な抗体を使用できる場合もある。ポリペプチドの発現レベルもまた、TGF- β 結合タンパク質リガンドに結合する TGF- β 結合タンパク質の量を定量することによって決定することができる。例えば、サンプル中のスクロスチンの BMP に対する結合は、表面プラズモン共鳴によって検出することができる。あるいは、特異的 TGF- β 結合タンパク質をコードする mRNA の発現レベルを定量することもできる。

【0114】

他の実施形態においては、S O S T に特異的な抗体を、競合アッセイのような方法において使用することができる。ここで、候補の因子が、TGF- β 結合タンパク質への結合について、抗体と競合する因子を同定するためにスクリーニングされる。抗体と TGF- β タンパク質との間での相互作用は、当該分野で公知であり本明細書中に記載される免疫学的検定方法を使用して決定することができる。

【0115】

例えば、TGF- β スーパーファミリーのファミリーメンバー（例えば、TGF- β 結

合タンパク質) または TGF- β 結合タンパク質のリガンドである TGF- β スーパーファミリーのメンバーは、最初に固相に結合させられ、その後、候補の因子が添加される。固相に結合させられている TGF- β スーパーファミリーのメンバーのリガンドは、同時に添加されるか、またはその後の工程で添加され、固相が洗浄され、ファミリーのメンバーに結合したリガンドの量が決定される。これは、候補の因子が TGF- β メンバーに対するリガンドの結合をブロックするかどうかを示す。あるいは、TGF- β スーパーファミリーのメンバーのリガンドを固相に結合させることもでき、TGF- β スーパーファミリーのメンバーを、候補の分子と同時に、または候補の分子の添加の後に添加することができる。TGF- β スーパーファミリーのメンバーに結合するリガンドの量は、当該分野で公知であり本明細書中に記載される方法にしたがって検出可能な分子でリガンドを標識することによって測定することができる。あるいは、TGF- β スーパーファミリーのメンバーへのリガンドの結合を、リガンドに特異的に結合する抗体またはそのフラグメントのような1つ以上の検出分子を添加し、リガンドに結合する分子の量を定量することによって測定することができる。本明細書中に記載されるような骨のミネラル含有量を増大させる用途に適している因子は、TGF- β スーパーファミリーのメンバーであるそのリガンドに対する TGF- β 結合タンパク質の結合を、統計学的に有意な様式で減少させるそのような因子である。

【0116】

本発明の他の実施形態においては、因子が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定するための方法が提供される。この方法には、(a) TGF- β 結合タンパク質を発現する細胞に対して候補の因子を接触させる工程、および(b) 曝された細胞による TGF- β 結合タンパク質の活性が変化するかどうかを決定し、それによって、化合物が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定する工程が含まれる。本明細書中に記載される方法と同様に、広範な種々の方法を、TGF- β 結合タンパク質を産生する細胞を選択された試験化合物に曝した際の TGF- β 結合タンパク質の発現の変化を評価するために使用することができる。

【0117】

本発明の別の実施形態においては、因子が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定するための方法が提供される。この方法には、(a) 候補の因子を、TGF- β 結合タンパク質と TGF- β ファミリーのタンパク質の選択されたメンバーと接触させる工程、および(b) 選択された因子が TGF- β タンパク質のファミリーのシグナル伝達をアップレギュレートするかどうか、または TGF- β ファミリーのメンバーに対する TGF- β 結合タンパク質の結合を阻害するかどうかを決定する工程が含まれる。特定の実施形態においては、分子は、間葉細胞の分化のポジティブな調節因子として作用する TGF- β ファミリーのタンパク質の能力を増強する。

【0118】

上記の方法と同様に、種々の方法を、SOST に特異的に結合する抗体のような試験化合物による TGF- β ファミリーのメンバーの刺激を評価するために使用することができる。1つのこのような代表的な方法(Durham et al., Endo. 136: 1374-1380 もまた参照のこと)には、TGF- β ファミリーのメンバー(例えば、BMP(例えば、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7))を、そのKdと等しい濃度で固相に結合させることが含まれる。解離定数(Kd)は、当該分野で公知の結合速度定数の決定方法、例えば、BIACore 機器を使用する表面プラズモン共鳴により、当該分野で公知であって製造業者(Biosensor, Piscataway, NJ)によって記載されている技術にしたがって決定することができる。次いで、アンタゴニスト候補因子のコレクションが、固定された濃度(通常は、有機低分子のコレクションについては20 μ M(単離された有機低分子とは、本明細書中で使用される場合は、当該分野で周知の方法(例えば、NMR、融点)にしたがって決定した場合に90%以上純粋である分子を意味し、候補の抗体については、1 μ M))で添加される。因子は、SOST に対する BMP の結合を阻害する、すなわち、因子が存在しない条件下

で観察される S O S T に対する B M P の結合レベルと比較して、少なくとも 40 %、好ましくは 50 % または 60 %、より好ましくは、80 % または 90 % の結合レベルの低下が観察される場合に、この相互作用のアンタゴニストであるとみなされる。このような因子は、さらに、その阻害定数および T G F - β 結合タンパク質の結合親和性に対するその影響が決定される力価研究に基づいて、阻害因子としての可溶性を評価することができる。比較可能な特異性対照アッセイもまた、B M P リガンド作用に依存するアッセイを使用する実験（例えば、B M P / B M P レセプター競合実験）にしたがって、同定されたアンタゴニストについての選択性のプロフィールを確立するために行うことができる。

【0119】

本発明のさらに他の実施形態においては、候補の因子が骨のミネラル含有量を増大させることができるかどうかを決定するための方法が提供される。この方法には、候補の因子が骨またはその類似体に対する T G F - β 結合タンパク質の結合を阻害するかどうかを決定する工程が含まれる。本明細書中で使用される場合は、骨またはその類似体とは、ヒドロキシアパタイト、または骨の粉末状の形態から構成される表面、粉碎された骨、または完全な骨を意味すると理解されるべきである。本明細書中に記載されている方法と同様に、広範な種々の方法を、T G F - β 結合タンパク質の骨基質への局在化の阻害を評価するために使用することができる（例えば、N i c o l a s e t a l . , C a l c i f . T i s s u e I n t . 47 : 206 - 12 (1995) を参照のこと）。

【0120】

本明細書中に記載される方法は、個々の候補の因子の分析について言及しているが、本発明はそのようには限定されるべきではない。具体的には、因子には、候補の因子の混合物中に含まれる場合がある。本明細書中で記載される場合には、候補の因子は、有機低分子である場合があり、また、抗体もしくはそのフラグメント、または他のペプチドもしくはポリペプチドである場合もある。抗体またはフラグメントは、抗体または抗体フラグメントのライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができるか、あるいは本明細書中に記載されている方法によって調製することもできる。したがって、記載される方法には、さらに、T G F - β ファミリーのメンバーに対する T G F - β 結合タンパク質の結合を阻害する因子を単離する工程が含まれる場合もある。

【0121】

本発明の 1 つの実施形態においては、S O S T ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントは、S O S T ポリペプチドに対する T G F - β ファミリーのメンバーの結合を競合的に阻害することができる。B M P のような T G F - β ファミリーのメンバーの S O S T に対する結合を妨害するかまたはブロックする抗体または抗体フラグメントの能力は、本明細書中に記載されている方法のいずれかにしたがって決定することができる。S O S T に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、S O S T ホモ二量体の形成を妨害することによって S O S T に対する T G F - β ファミリーのメンバーの結合を妨害するか、ブロックするか、または妨げることができる。S O S T に特異的に結合する抗体は、また、B M P に対する結合から S O S T を阻害するかまたは妨害することによって、S O S T の活性を同定するために使用することもできる。あるいは、抗体またはそのフラグメントは、抗体が活性を変化させる（統計学的に有意な様式で増大させるかまたは低下させる）かどうかを決定するための、S O S T が定義された活性を有している、細胞をベースとするアッセイに、または動物モデルに組み入れることができる。S O S T に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、シグナル伝達経路におけるそのような抗体の作用、およびそれによるシグナル伝達経路の調節（刺激または阻害）を試験するために使用することができる。好ましくは、S O S T に対する抗体の結合により、シグナル伝達経路の刺激または誘導が生じる。

【0122】

（タンパク質の産生）

本明細書中で記載されるポリペプチドとしては T G F 結合タンパク質であるスクレロシンおよびその変異体、ならびにスクレロシンに特異的に結合する抗体またはそのフラ

10

20

30

40

50

グメントが挙げられる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドには、ポリヌクレオチドに対して（ならびに、適切である場合には、ポリヌクレオチドおよびそれらの誘導体によってコードされるペプチドおよびポリペプチドを含むタンパク質に対して）実質的に類似している誘導体が含まれる。本明細書中で使用される場合は、ヌクレオチド配列は、（a）ヌクレオチド配列が本明細書中に記載されるポリヌクレオチドのコード領域に由来し、例えば、上記で議論された配列またはそのような配列の対立遺伝子変異体の一部、を含むか、あるいは、TGF- β ファミリーのメンバーに対するTGF- β 結合タンパク質の結合を阻害する分子をコードする場合；（b）ポリヌクレオチドが、中程度の、高い、または非常に高いストリンジェンシーの下で本明細書中で提供されるポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる場合（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, New York, 2001を参照のこと）；および／または（c）ポリヌクレオチド配列が、（a）もしくは（b）に記載されたポリヌクレオチド配列の特定のアミノ酸のコドン配列に関して縮重している場合に、「実質的に類似」しているとみなされる。さらに、本明細書中で開示される核酸分子には、配列が別な形式で本明細書中で示される基準を満たす場合には、相補配列および非相補配列の両方が含まれる。本発明の状況においては、高いストリンジェンシーは、標準的なハイブリダイゼーション条件を意味する（例えば、 $5\times$ SSPE、0.5%のSDS、 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ 、あるいはそれと同等の条件； $5\times$ SSPE（ $1\times$ SSPE = 180mMの塩化ナトリウム：10mMのリン酸ナトリウム；1mMのEDTA（pH7.7）； $5\times$ デンハルト溶液（ $100\times$ デンハルト = 2%（w/v）のウシ血清アルブミン、2%（w/v）のFicoll、2%（w/v）のポリビニルピロリドン）；および0.5%のSDS）。高いストリンジェンシーでのハイブリダイゼーション後の洗浄は、通常、 $0.5\times$ SSC（ $1\times$ SSC = 150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸三ナトリウム）中で、または $0.5\times$ SSPE中で、 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ で行われる。

【0123】

SOSTをコードするポリヌクレオチドは、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、生物学的サンプル中の細胞、組織、または細胞株から単離することができる、そして任意の種々の技術を使用して調製することができる（例えば、Sambrook、前出を参照のこと）。例えば、ポリヌクレオチドは、適切な細胞または組織から調製したcDNAから増幅することができる。これらのポリヌクレオチドは、本明細書中に提供される配列に基づいて設計され、購入することも、合成することもできる、配列特異的プライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することができる。ポリヌクレオチドは、また、配列特異的プローブおよびプライマーを使用して、cDNAライブラリーまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても、得ることができる。PCRによってライブラリーをスクリーニングするための一般的な方法は、例えば、Yu et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries," in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), pages 211-215 (Humana Press, Inc. 1993)によって提供されている。さらに、関連遺伝子を単離するためにPCRを使用する技術は、例えば、Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primer and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members," in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), pages 317-337 (Humana Press, Inc. 1993)に記載されている。

【0124】

TGF- β 結合タンパク質のcDNAの配列、またはTGF- β 結合タンパク質のゲノムフラグメントの配列は、標準的な方法を使用して決定することができる。さらに、TGF- β 結合タンパク質のプロモーターまたは調節エレメントを含むゲノムフラグメントの同定は、欠失分析のような十分に確立されている技術を使用して行うことができる（一般的には、Ausubel（1995）を参照のこと）。

【0125】

あるいは、TGF- β 結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、長いオリゴヌクレオチドおよび本明細書中に記載されるヌクレオチド配列の双方向へのプライミングを使用してDNA分子を合成することによって得ることができる（例えば、Ausubel（1995）pages 8-8から8-9を参照のこと）。PCRがこの方法に組み入れられると、少なくとも2キロ塩基の長さのDNA分子を合成することができる（Adang et al., Plant Molec. Biol. 21:1131, 1993; Bambot et al., PCR Methods and Applications 2:266, 1993; Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), pages 263-268, (Humana Press, Inc. 1993); Hollowack et al., PCR Methods Appl. 4:299, 1995)。

【0126】

変異体TGF- β 結合タンパク質をコードする核酸分子は、本明細書中に記載される手順を使用して、配列番号55~57、59、61、63、65、67、および69をベースとするヌクレオチド配列を有しているポリヌクレオチドプローブで、種々のcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。TGF- β 結合タンパク質ポリヌクレオチド変異体はまた、合成によって構築することもできる。例えば、配列番号1、20、58、60、62、64、66、68、または70のアミノ酸配列と比較した場合に、保存的アミノ酸変化を有しているポリペプチドをコードする核酸分子を設計することができる。すなわち、配列番号1、20、58、60、62、64、66、68、または70の1つ以上のアミノ酸置換を含む変異体を得ることができる。ここで、アルキルアミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中のアルキルアミノ酸が置換されている；芳香族アミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中の芳香族アミノ酸が置換されている；硫黄を含むアミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中の硫黄を含むアミノ酸が置換されている；ヒドロキシル基を含むアミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中のヒドロキシル基を含むアミノ酸が置換されている；酸性アミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中の酸性アミノ酸が置換されている；塩基性アミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中の塩基性アミノ酸が置換されている；または二塩基性の1個のカルボキシル基を有しているアミノ酸で、TGF- β 結合タンパク質のアミノ酸配列中の二塩基性の1個のカルボキシル基を有しているアミノ酸が置換されている。

【0127】

一般的なアミノ酸間での、例えば、保存的アミノ酸置換は、以下のグループのそれぞれのアミノ酸の間での置換によって説明される：（1）グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン（非極性のアルキル基を含む側鎖）；（2）フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン（芳香族側鎖）；（3）セリンおよびスレオニン（ヒドロキシル基側鎖）；（4）アスパラギン酸およびグルタミン酸（カルボン酸基側鎖）；（5）グルタミンおよびアスパラギン（アミド基を含む側鎖）；ならびに（6）リジン、アルギニン、およびヒスチジン（アミノ基側鎖）。このような置換を行う際には、可能であれば、図1に概説されるシステイン骨格を維持することが重要である。

【0128】

S O S T中の保存的アミノ酸変化は、配列番号55～57、59、61、63、65、67、または69のいずれか1つに記載されているヌクレオチドについて、ヌクレオチドを置換することによって導入することができる。このような保存的アミノ酸変異体は、例えば、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、リンカースキャン突然変異誘発、ポリメラーゼ連鎖反応を使用する突然変異誘発などによって得ることができる (Ausubel (1995) pages 8-10から8-22; およびMcPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)を参照のこと)。このような変異体の機能的な活性は、本明細書中に記載される標準的な方法およびアッセイを使用して決定することができる。あるいは、変異体TGF- β 結合タンパク質ポリペプチドは、抗SOST抗体に特異的に結合する能力を保持している。

10

【0129】

核酸分子について日常的に行われている欠失分析を行って、TGF- β 結合タンパク質ポリペプチドをコードする核酸分子の「機能的フラグメント」を得ることができる。例えば、配列番号55～57、59、61、63、65、67、または69のいずれか1つのヌクレオチド配列を有しているDNA分子を、Bal31ヌクレアーゼで消化して、欠失がネストされている一連のものを得ることができる。次いで、フラグメントは、適切なリーディングフレームになるように発現ベクターに挿入され、発現されたポリペプチドが単離され、活性について、または抗TGF- β 結合タンパク質抗体に結合する能力について試験される。ヌクレアーゼ消化に代わるものは、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発を使用することであり、これによって所望されるフラグメントの産生を特異的に行うような欠失または終結コドンが導入される。あるいは、TGF- β 結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの特定のフラグメントは、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して合成することができる。本明細書中で開示されるアッセイおよび方法に加えて、タンパク質の機能分析のための標準的な技術が、例えば、Treuter et al., Molec. Gen. Genet. 240:113, 1993; Content et al., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon" Biological Interferon Systems, Proceeding of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), Pages 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor," Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1, Boynton et al., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985); Coumailleau et al., J. Biol. Chem. 270:29270, 1995; Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 270:25291, 1995; Yamaguchi et al., Biochem. Pharmacol. 50:1295, 1995; およびMeisel et al., Plant Molec. Biol. 30:1, 1996に記載されている。

20

30

【0130】

本明細書中に記載される核酸分子によってコードされるポリペプチドの構造は、例えば、P/C GeneまたはIntelligent Suite (Intelligent, Mountain View, California)の疎水性プロット関数を使用して、あるいはKyte and Doolittle (J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982)によって記載されている方法にしたがって、一次翻訳産物から推測することができる。ポリペプチドは、酸性または塩基性の塩の形態で、あるいは中性の形態で調製することができる。さらに、個々のアミノ酸残基を、酸化または還元によって修飾することができる場合もある。さらに、種々の置換、欠失、または付加を、アミノ酸または核酸配列に対して行うことができる場合もある。その正味の効果は、変異体または野生型タンパク質の生物学的活性を保持する、あるいはさらに増大さ

40

50

せるかまたは低下させることである。好ましくは、S O S T 変異体またはそのフラグメントは、S O S T 特異的抗体に結合する能力を保持しているか、または高い結合能力を有している。さらに、遺伝子コードの縮重の理由から、例えば、同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が大幅に変化する場合もある。

【0131】

本明細書中で提供されるタンパク質の他の誘導体としては、他のタンパク質またはポリペプチドとのタンパク質の結合体が挙げられる。これは、例えば、タンパク質の精製または同定を容易にするために付加することができる、N末端またはC末端融合タンパク質の合成によって行うことができる（米国特許第4, 851, 341号を参照のこと；また、Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988も参照のこと）。あるいは、FLAG（登録商標）/TGF- β 結合タンパク質のような融合タンパク質を、タンパク質の同定、発現、および分析に役立つように構築することができる。

10

【0132】

本明細書中で記載されるタンパク質は、本明細書中に記載される広範な種々の技術を使用して構築することができる。さらに、変異を、制限部位が隣接する変異配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することによって特定の遺伝子座に導入することができ、これにより、自然界に存在している配列のフラグメントに連結させることができる。連結後、得られた再構築された配列は、所望されるアミノ酸の挿入、置換、または欠失を有している誘導体をコードする。

20

【0133】

あるいは、オリゴヌクレオチド特異的部位特異的（またはセグメント特異的）突然変異誘発手順を使用して、置換、欠失、または挿入によって変更された特定のコードンを有している変異されたポリヌクレオチドを得ることができる。上記の変更を作成するための例示的な方法は、Walder et al., (Gene 42:133, 1986) ; Bauer et al., (Gene 37:73, 1985) ; Craik (BioTechniques, 1985年1月、12-19) ; Smith et al., (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981) ; および Sambrook et al., (前出) によって開示されている。タンパク質の欠失誘導体または短縮誘導体（例えば、可溶性の細胞外部分）は、また、所望される欠失に隣接している従来の制限エンドヌクレアーゼ部位を使用することによっても構築することができる。制限酵素での処理の後、突出部分が満たされ、DNAが再度連結させられる。上記のような変更を作成するための例示的な方法は、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d Ed., Cold Spring Harbor Press (2001)) によって開示されている。

30

【0134】

核酸分子中に作成される変異は、コード配列のリーディングフレームを保存することが好ましい。さらに、変異は、転写された際にループまたはヘアピンのようなmRNAの二次構造を生じるようにハイブリダイズできる相補領域を作成しないことが好ましい。このような構造は、mRNAの翻訳に悪影響を及ぼす場合がある。変異部位は予め決定することができるが、変異自体の性質が予め決定されることは必ずしも必要ではない。例えば、所定の部位での変異体の最適な特徴について選択するためには、ランダムな突然変異誘発を標的コードンについて行って、生物学的活性の獲得、喪失、または保持について発現された変異体をスクリーニングすることができる。あるいは、自然界に存在している配列のフラグメントに対する連結を可能にする制限部位が隣接している変異体配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することによって、変異を特定の遺伝子座に導入することができる。連結後、得られた再構築された配列は、所望されるアミノ酸の挿入、置換、または欠失を有している誘導体をコードする。本発明のタンパク質をコードする核酸分子は、また、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による突然変異誘発、化学的突然変異誘発（Drinkwa

40

50

ter and Klinedinst, PNAS 83:3402-3406, 1986)、強制的なヌクレオチドの誤った取り込み(例えば、Liao and Wise Gene 88:107-111, 1990)、あるいは、ランダムに突然変異させたオリゴヌクレオチドの使用(Horwitz et al., Genome 3:112-117, 1989)のような技術を使用して構築することもできる。

【0135】

本発明により、また、本明細書中で提供されるポリヌクレオチドの操作および発現、ならびにそのようなポリヌクレオチドを発現することができるベクターを含む宿主細胞を培養することにより本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドの操作および発現も提供される。発現ベクターは、所望されるタンパク質の発現を指示することができる組み換え核酸構築物を意味する。ベクターには、デオキシリボ核酸(DNA)、合成のリボ核酸またはcDNAに由来するリボ核酸(RNA)、あるいは2つの組み合わせ(例えば、DNA-RNAキメラ)が含まれ得る。cDNAポリヌクレオチドは、通常、mRNAのようなRNA分子を転写することにより調製されるDNAポリヌクレオチドを意味すると理解される。所望されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含むこれらのベクターまたはベクター構築物は、適切な転写または翻訳調節エレメントに対して動作可能であるように連結されていることが好ましい。適切な調節エレメントは、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物、昆虫、または植物の遺伝子を含む種々の供給源に由来するものとして行うことができる。適切な調節エレメントの選択は、選択される宿主細胞に応じて異なり、これは当業者であれば容易に行うことができる。調節エレメントの例としては、転写プロモーターおよびエンハンサー、またはRNAポリメラーゼ結合配列、転写ターミネーター、ならびに翻訳開始シグナルを含むリボソーム結合配列が挙げられる。状況に応じて、ベクターには、ポリアデニル化配列、1つ以上の制限部位、ならびに1つ以上の選択マーカー(例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼまたはハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、あるいは当該分野で公知の任意の他のマーカー)を含めることができる。さらに、選択される宿主細胞と使用されるベクターに応じて、例えば、複製起点、さらなる核酸制限部位、エンハンサー、転写誘導性を与える配列、および選択マーカーのような他の遺伝子エレメントもまた、本明細書中で記載されるベクター中に組み込むことができる。

【0136】

上記のタンパク質のいずれかをコードする核酸分子は、広範な種々の原核生物および真核生物である宿主細胞によって容易に発現させることができる。宿主細胞には、細菌、哺乳動物、酵母または他の真菌、ウイルス、昆虫、または植物細胞が含まれる。このような細胞を外来DNAを発現するように形質転換またはトランスフェクトするための方法は当該分野で周知である(例えば、Itakura et al., 米国特許第4,704,362号;Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933, 1978;Murray et al., 米国特許第4,801,542;Upshall et al., 米国特許第4,935,349号;Hagen et al., 米国特許第4,784,950号;Axel et al., 米国特許第4,399,216号;Goeddel et al., 米国特許第4,766,075号;およびSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001を参照のこと;植物細胞については、Czako and Marton, Plant Physiol. 104:1067-1071, 1994;およびPaszkowski et al., Biotech. 24:387-392, 1992を参照のこと)。

【0137】

本発明を実施するために適切である細菌宿主細胞としては、大腸菌(E. coli) BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS、BL21(DE3) pLysE、DH1、DH4I、DH5、DH5I、DH5IF'、DH5IMCR、DH10B、DH10B/p3、DH11S、C600、HB101、JM101、JM105、JM10

9、JM110、K38、RP1、Y1088、Y1089、CSH18、ER1451、およびER1647（例えば、Brown (Ed.), Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991を参照のこと)）；枯草菌 (*B. subtilis*) (BR151, YB886、MI119、MI120、およびB170（例えば、Hardy, "Bacillus Cloning Methods," in DNA Cloning: A Practical Approach, Glover (Ed.) (IRL Press 1985を参照のこと)）；ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)；およびシュードモナス属 (*Pseudomonas*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、およびブドウ球菌属 (*Staphylococcus*) の種々の種、さらには、当業者に周知の多くの他の細菌種が挙げられる。細菌宿主細胞の代表的な例としては、大腸菌 (*E. coli*) DH5 α (Stratagene, La Jolla, California) が挙げられる。細菌宿主細胞の代表的な例として、大腸菌 (*E. coli*) DH5 α (Stratagene, La Jolla, California) が挙げられる。

10

【0138】

細菌の発現ベクターには、宿主細胞中で機能するプロモーター、1つ以上の表現選択マーカ、および細菌の複製基点が含まれることが好ましい。代表的なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）プロモーターおよびラクトースプロモーターシステム (Chang et al., Nature 275:615, 1978を参照のこと)、T7 RNAポリメラーゼプロモーター (Studier et al., Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990)、 λ プロモーター (Elvin et al., Gene 87:123-126, 1990)、trpプロモーター (Nichols and Yanofsky, Meth. in Enzymology 101:155, 1983)、およびtacプロモーター (Russell et al., Gene 20:231, 1982) が挙げられる。さらなるプロモーターとして、T4、T3、Sp6、およびT7ポリメラーゼを認識することができるプロモーター、バクテリオファージ λ のP_RおよびP_Lプロモーター、recAプロモーター、熱ショックプロモーター、lacUV5プロモーター、tacプロモーター、lpp-lacSprプロモーター、phoAプロモーター、および大腸菌 (*E. coli*) のlacZプロモーター、枯草菌 (*B. subtilis*) のプロモーター、バシラス属 (*Bacillus*) のバクテリオファージのプロモーター、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) のプロモーター、バクテリオファージ λ のintプロモーター、pBR322のblaプロモーター、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターが挙げられる。原核生物のプロモーターは、Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277, 1987, Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Ed. (Benjamin Cummins 1987) によって、およびAusubel et al., (1995) によって概説されている。代表的な選択マーカとしては、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子のような、種々の抗生物質耐性マーカが挙げられる。宿主細胞を形質転換するために適している多くのプラスミドは当該分野で周知であり、これには、特に、pBR322 (Bolivar et al., Gene 2:95, 1977を参照のこと)、pUCプラスミドであるpUC18、pUC19、pUC118、pUC119 (Messing, Meth. in Enzymology 101:20-77, 1983、およびVieira and Messing, Gene 19:259-268, 1982を参照のこと)、およびpNH8A、pNH16a、pNH18a、およびBluescript M13 (Stratagene, La Jolla, California) が含まれる。

20

30

40

【0139】

本発明を実施するために適している酵母および真菌宿主細胞としては、特に、サッカロマイセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア属 (*Pic*

50

hia)、またはクルイベロマイセス属 (*Kluyveromyces*)、およびアスパラジラス属 (*Aspergillus*) の種々の種が挙げられる (McKnight et al., 米国特許第 4, 935, 349 号)。酵母および真菌に適切な発現ベクターとしては、特に、酵母については YCp50 (ATCC No. 37419)、および amdS クローニングベクター pV3 (Turnbull, Bio/Technology 7:169, 1989)、YRp7 (Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:1035-1039, 1978)、YEpl3 (Broach et al., Gene 8:121-133, 1979)、pJDB249 および pJDB219 (Beggs, Nature 275:104-108, 1978)、ならびにこれらの誘導体を挙げるができる。

10

【0140】

酵母での使用に好ましいプロモーターとしては、酵母の解糖系の遺伝子に由来するプロモーター (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:12073-12080, 1980; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1:419-434, 1982)、またはアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子に由来するプロモーター (Young et al., Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender et al., (eds.), p. 355, Plenum, New York, 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101:192-201, 1983) が挙げられる。真菌ベクターについて有用なプロモーターの例としては、ア

スパラジラス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*) 解糖遺伝子に由来するプロモーター、例えば、adh3 プロモーターが挙げられる (McKnight et al., EMBO J. 4:2093-2099, 1985)。発現ユニットには、また、転写ターミネーターが含まれる場合もある。適切なターミネーターの例は、adh3 ターミネーター (McKnight et al., 前出, 1985) である。

20

【0141】

細菌ベクターを用いる場合には、酵母ベクターには、通常、選択マーカーが含まれる。この選択マーカーは、形質転換体を選択されることを可能にするためのそれについての表現形アッセイが存在している、優性表現形を示す多数の遺伝子のいずれか1つであり得る。好ましい選択マーカーは、宿主細胞の栄養要求性を相補するもの、抗生物質耐性を提供

するもの、または、細胞が特異的な炭素供給源を利用できるようにするものであり、これには、leu2 (Broach et al., 前出)、ura3 (Botstein et al., Gene 8:17, 1979)、またはhis3 (Struhl et al., 前出) が含まれる。別の適切な選択マーカーは、cat 遺伝子であり、これは、酵母細胞にクロラムフェニコール耐性を与える。多くの酵母のクローニングベクターが設計されており、これらを容易に利用することができる。これらのベクターとしては、YIp5 のようなYIpをベースとするベクター、YRp17のようなYRpベクター、YEpl3のようなYEpベクター、YCp19のようなYCpベクターが挙げられる。当業者は、広範な種々の適切なベクターを酵母細胞中での発現のために利用できることを理解して

30

40

【0142】

真菌を形質転換するための技術は文献において周知であり、例えば、Beggs (前出)、Hinnen et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933, 1978)、Yelton et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1740-1747, 1984)、およびRussell (Nature 301:167-169, 1983) によって記載されている。宿主細胞の遺伝子型には、発現ベクター上に存在する選択マーカーによって相補される遺伝子欠損が含まれる場合がある。特定の宿主と選択マーカーの選択は、十分に、当業者のレベルの範囲内にある。

【0143】

50

酵母の形質転換のためのプロトコールもまた、当業者に周知である。例えば、形質転換は、DNAを有する酵母のスフェロプラストを調製することによって（Hinnen et al., PNAS USA 75:1929, 1978を参照のこと）、またはLiClのようなアルカリ塩での処理によって（Itoh et al., J. Bacteriology 153:163, 1983を参照のこと）のいずれかにより容易に行うことができる。真菌の形質転換もまた、Cullen et al., (Bio/Techonology 5:369, 1987)によって記載されているように、ポリエチレングリコールを使用して行うことができる。

【0144】

ウイルスベクターとしては、上記のような所望されるタンパク質をコードする単離された核酸分子の発現を指示するプロモーターを含むベクターが挙げられる。広範な種々のプロモーターを本発明の状況において使用することができ、これらとしては、例えば、MoMLV LTRのようなプロモーター；RSV LTR（例えば、Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6777, 1982）；Friend MuLV LTR；アデノウイルスプロモーター（Ohno et al., Science 265:781-784, 1994）；ネオマイシンホスフォトランスフェラーゼプロモーター／エンハンサー；後期パルボウイルスプロモーター（Koering et al., Hum. Gene Therap. 5:457-463, 1994）；ヘルペスTK（Herpes TK）プロモーター（例えば、McKnight, Cell 31:355, 1982）；SV40プロモーター（例えば、SV40初期プロモーター（Benoit et al., Nature 290:304, 1981））；メタロチオネインIIa遺伝子エンハンサー／プロモーター；マウスメタロチオネインI遺伝子（Hamer et al., J. Molec. Appl. Genet. 1:273, 1982）；マウス乳ガンウイルスプロモーター（一般的には、Etcheverry, “Expression of Engineered Protein in Mammalian Cell Culture,” Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., (eds.), pages 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)を参照のこと）；サイトメガロウイルス前期初期プロモーター、およびサイトメガロウイルス前期後期プロモーターが挙げられる。あるいは、原核生物プロモーターが真核生物プロモーターによって調節される場合には、バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターのような原核生物プロモーターを、哺乳動物細胞中でのTGF- β 結合タンパク質遺伝子の発現を制御するために使用することができる（Zhou et al., Mol. Cell. Biol. 10:4529, 1990；Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19:4485, 1991）。

【0145】

本発明の特定の好ましい実施形態においては、プロモーターは組織特異的プロモーターである（例えば、WO91/02805；EP0, 415, 731；およびWO90/07936を参照のこと）。適切な組織特異的プロモーターの代表的な例としては、神経特異的エノラーゼプロモーター、血小板由来成長因子 β プロモーター、骨形態形成タンパク質プロモーター、ヒト α 1-キマエリンプロモーター、シナプシンIプロモーターおよびシナプシンIIプロモーターが挙げられる。上記のプロモーターに加えて、他のウイルス特異的プロモーター（例えば、レトロウイルスプロモーター（上記のプロモーター、さらにはHIVプロモーターのような他のプロモーターを含む））、肝炎、ヘルペス（例えば、EBV）、および細菌、真菌、または寄生虫（例えば、マラリア）特異的プロモーターを、ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫に感染した特異的細胞または組織を標的化するために利用することができる場合もある。

【0146】

本発明を実施するために適している哺乳動物細胞としては、特に、COS、CHO、S aOS、骨肉種、KS483、MG-63、初代骨芽細胞、およびヒトまたは哺乳動物の

骨髓基質細胞が挙げられる。さらなる哺乳動物宿主細胞としては、アフリカミドリザルの腎臓細胞 (Vero; ATCC CRL 1587)、ヒト胚性腎臓細胞 (293-HEK; ATCC CRL 1573)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK-21; ATCC CRL 8544)、イヌの腎臓細胞 (MDCK; ATCC CCL 34); チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1; ATCC CCL 61)、ラットの下垂体細胞 (GH 1; ATCC CCL 82)、HeLa S3細胞 (ATCC CCL 2.2)、ラット肝ガン細胞 (H-4-II-E; ATCC CRL 1548)、SV40で形質転換されたサル腎臓細胞 (COS-1; ATCC CRL 1650)、およびマウスの胚性細胞 (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) が挙げられる。

【0147】

本発明の実行に使用するための哺乳動物発現ベクターには、クローニングされた遺伝子またはcDNAの転写を指示することができるプロモーターが含まれる。好ましいプロモーターとしては、ウイルスプロモーターおよび細胞性プロモーターが挙げられる。骨特異的プロモーターとしては、骨シアロタンパク質のプロモーター、およびオステオカルシンのプロモーターが挙げられる。ウイルスプロモーターとしては、サイトメガロウイルス前期初期プロモーター (Boshart et al., Cell 41: 521-530, 1985)、サイトメガロウイルス前期後期プロモーター、SV40プロモーター (Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1: 854-864, 1981)、MMTV LTR、RSV LTR、メタロチオネイン-1、アデノウイルスE1aが挙げられる。細胞性のプロモーターとしては、マウスのメタロチオネイン-1プロモーター (Palmiter et al., 米国特許第4, 579, 821号)、マウスV_Kプロモーター (Bergman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7041-7045, 1983; Grant et al., Nucleic Acids Res. 15: 5496, 1987)、およびマウスのV_Hプロモーター (Loh et al., Cell 33: 85-93, 1983) が挙げられる。プロモーターの選択は、所望される発現のレベル、およびトランスフェクトされるレシピエント細胞株に一部依存する。

【0148】

このような発現ベクターには、プロモーターの下流であって、目的のペプチドまたはタンパク質をコードするDNA配列の上流に位置するRNAスプライシング部位のセットが含まれる場合もある。好ましいRNAスプライシング部位は、アデノウイルスおよび/または免疫グロブリン遺伝子から得ることができる。発現ベクター中には、目的のコード配列の下流の位置にポリアデニル化シグナルもまた含まれる場合がある。適切なポリアデニル化シグナルとしては、SV40に由来する初期または後期ポリアデニル化シグナル (Kaufman and Sharp, 前出)、アデノウイルス5E1B領域に由来するポリアデニル化シグナル、およびヒト成長ホルモン遺伝子のターミネーター (DeNoto et al., Nucleic Acids Res. 9: 3719-3730, 1981) が挙げられる。発現ベクターには、プロモーターとRNAスプライシング部位の間に配置された、アデノウイルス2-3部リーダーのような非コードウイルスリーダー配列が含まれる場合もある。好ましいベクターには、また、SV40エンハンサーのようなエンハンサー配列もまた含まれる。発現ベクターには、アデノウイルスVA RNAをコードする配列も含めることができる。適切な発現ベクターは、市販の供給業者 (例えば、Stratagene, La Jolla, California) から得ることができる。

【0149】

DNA配列がクローニングされているベクター構築物は、例えば、リボソーム媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション (Wigler et al., Cell 14: 725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52: 456, 1973)、エレクトロポレーション (Neumann et al., EMBO J. 1: 841-845, 1982)

、またはDEAEーデキストラン媒介トランスフェクション (Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1987) ;レトロウイルス、アデノウイルス、およびプロトプラスト融合媒介トランスフェクション (Sambrook et al., 前出を参照のこと) によって、培養された哺乳動物細胞中に導入することができる。裸のベクター構築物を、筋細胞または他の適切な細胞に取り込ませ、その後、哺乳動物 (または他の動物) の筋肉に注射することもできる。クローニングされたDNAを含むベクターで安定にトランスフェクトされた細胞を同定するためには、一般的には、選択マーカーが目的の遺伝子またはcDNAと共に細胞に導入される。培養された哺乳動物細胞中での使用に好ましい選択マーカーとしては、ネオマイシン、ハイグロマイシン、およびメトトレキセートのような薬剤に対する耐性を付与する遺伝子が挙げられる。選択マーカーは、増幅することができる選択マーカーである場合もある。好ましい増幅することができる選択マーカーは、DHFR遺伝子、およびネオマイシン耐性遺伝子である。選択マーカーについては、Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts) に概説されている。

10

【0150】

適切なベクターを含む哺乳動物細胞を、一定期間 (通常は、1~2日) 増殖させて、目的のDNA配列 (単数または複数) の発現を開始させることができる。次いで、薬剤選択を行って、安定な様式で選択マーカーを発現する細胞の増殖について選択する。増幅することができる選択マーカーでトランスフェクトされた細胞について、薬剤濃度を段階的な様式で増大させて、クローニングされた配列のコピー数の増大について選択することができる。これにより発現レベルを増大させることができる。導入された配列を発現する細胞が、所望される形態または所望される濃度での目的のタンパク質の産生について選択され、スクリーニングされる。次いで、これらの基準を満たす細胞がクローニングされ、産生のためにスケールアップされる。

20

【0151】

当該分野で公知の多数の昆虫宿主細胞もまた、本発明に有用であり得る。例えば、バキュロウイルスを、異種DNA配列を昆虫細胞中で発現させるためのベクターとして使用することができる (Atkinson et al., Pestic. Sci. 28:215-224 (1990))。バキュロウイルスシステムにより、クローニングされたTGF- β 結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを昆虫細胞中に導入するために効率的な手段が提供される。適切な発現ベクターは、オートグラフィア・カリフォルニア (Autographa californica) 多核体病ウイルス (AcMNPV) をベースとする。これには、ショウジョウバエ (Drosophila) 熱ショックタンパク質 (hsp) 70プロモーター、オートグラフィア・カリフォルニア (Autographa californica) 多核体病ウイルス前期初期遺伝子プロモーター (ie-1)、および後期初期39Kプロモーター、バキュロウイルスp10プロモーター、およびショウジョウバエ (Drosophila) メタロチオネインプロモーターのような周知のプロモーターが含まれる。適切な昆虫宿主細胞としては、IPLB-Sf-21に由来する細胞株、スポドプテラ・フルジペルダ (Spodoptera frugiperda) サナギ卵巣細胞株、例えば、Sf9 (ATCC CRL 1711)、Sf21AE、およびSf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA)、さらにはショウジョウバエ (Drosophila) のSchneider-2細胞が挙げられる。バキュロウイルスシステム中で組み換えタンパク質を産生させるための確立された技術は、Bailey et al., "Manipulation of Baculovirus Vectors," Methods in Molecular Biology, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), pages 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991); Patel et al., "The Bac

30

40

50

ulovirus expression system, "DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), pages 205-244 (Oxford University Press 1995); Ausubel (1995), pages 16-37 to 16-57, Richardson (ed.), Baculovirus Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995); および Lucknow, "Insect Cell Expression Technology, " Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), pages 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) によって提供されている

10

【0152】

あるいは、多数の植物細胞が当該分野で公知であり、これらもまた、ポリヌクレオチドを発現させるために有効であり得る。例えば、アグロバクテリウム・リゾゲン (*Agrobacterium rhizogens*) である (Sinkar et al. J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987)。発現ベクターはまた、植物のプロトプラスト、完全な植物組織、または単離された植物細胞中に導入することもできる。植物組織を培養する一般的な方法は、例えば、Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants, " Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick et al. (eds.), pages 67-88 (CRC Press, 1993) によって提供されている。

20

【0153】

本発明の関連する実施形態においては、本発明のタンパク質を、その生殖細胞および体細胞が、所望されるタンパク質をコードし、遺伝子の発現に効果的であるプロモーターに作動するように連結されている遺伝子を含む、トランスジェニック動物中で発現させることができる。あるいは、同様の様式で、所望される遺伝子を含まないトランスジェニック動物 (例えば、「ノックアウト」マウス) を、調製することもできる。このようなトランスジェニックは、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ヤギ、およびブタを含む種々の非ヒト動物において調製することができる (Hammer et al., Nature 315: 680-683, 1985, Palmiter et al., Science 222: 809-814, 1983, Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438-4442, 1985, Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345, 1985、および米国特許第5, 175, 383号、同第5, 087, 571号、同第4, 736, 866号、同第5, 387, 742号、同第5, 347, 075号、同第5, 221, 778号、および同第5, 175, 384号を参照のこと)。簡単には、適切な位置に配置された発現制御配列とともに発現される核酸分子を含む発現ベクターは、例えば、マイクロインジェクションによって、受精卵の前核に導入される。注入されたDNAの組み込みは、組織サンプルに由来するDNAのプロット分析によって指示される。導入されたDNAが動物の子孫に継代されるように動物の生殖系に組み込まれることが好ましい。組織特異的発現は、組織特異的プロモーターの使用を通じて、またはメタロチオネイン遺伝子プロモーター (Palmiter et al., 1983、前出) のような誘導性プロモーターの使用を通じて行うことができ、これによりトランス遺伝子の発現が調節される。

30

40

【0154】

タンパク質は、具体的には、適切な宿主およびベクターシステムを培養することによって単離して、本発明の組み換え翻訳産物を産生させることができる。このような細胞株に由来する上清、またはタンパク質封入体、またはタンパク質が上清には分泌されていない細胞全体を、次いで、種々の精製手順によって処理して、所望されるタンパク質を単離することができる。例えば、上清を、最初に市販されているタンパク質濃縮フィルター、例

50

えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限界濾過ユニットを使用して濃縮することができる。濃縮後、濃縮物を適切な精製マトリックス、例えば、アフィニティマトリックス（例えば、適切な支持体に結合させられた特異的抗体）にのせることができる。あるいは、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂、あるいはサイズ排除マトリックスを使用してタンパク質を精製することができる。さらに別に、1つ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）工程を使用して、タンパク質をさらに精製することができる。本発明のタンパク質の他の単離方法は、当該分野で周知である。単離されたタンパク質またはポリペプチドの純度は、SDS-PAGE分析と、その後のクマシーブルー染色もしくは銀染色によって決定することができる。

【0155】

哺乳動物細胞システムによって外来タンパク質を発現させ、産生された外来タンパク質を回収するための一般的な方法は、例えば、Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., (eds.), pages 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996)によって提供されている。細菌システムによって産生されたタンパク質を回収するための標準的な技術は、例えば、Grisshammer et al., "Purification of over-produced proteins from E. coli cells," DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), pages 59-92 (Oxford University Press 1995)によって提供されている。バキュロウイルスシステムから組み換えタンパク質を単離するための確立された方法は、Richardson (ed.), Baculovirus Expression Protocols (The Human a Press, Inc., 1995)によって記載されている。

【0156】

さらに一般的には、TGF- β 結合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、HPLCなどの標準的な技術によって単離することができる。TGF- β 結合タンパク質の単離および精製におけるさらなるバリエーションを、当業者は工夫することができる。例えば、本明細書中に記載されるように得られる抗TGF- β 結合タンパク質抗体を使用して、免疫親和性精製によって多量のタンパク質を単離することができる。本発明の抗体の精製は、本明細書中にさらに記載される。

【0157】

（検出可能な標識）

検出可能な標識は、診断に有用な分子を生じるように、ポリペプチド（抗体もしくはそのフラグメントを含む）またはポリヌクレオチドに結合させることができる分子あるいは原子である。検出可能な標識の例としては、キレート化剤、光活性因子、放射性同位元素、蛍光剤、常磁性イオン酵素、および他のマーカー部分が挙げられる。TGF結合タンパク質、またはTGF結合タンパク質に特異的に結合する抗体、または上記の候補の分子は、例えば、蛍光分子、毒素、および放射性核種を含む種々の化合物で標識することができる。蛍光分子の代表的な例としては、フルオレセイン、フィコエリスリンのようなフィコビリタンパク質、ローダミン、テキサスレッド、およびルシフェラーゼが挙げられる。毒素の代表的な例としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン（gelonin）、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、トリチン、シゲラ（Shigella）毒素、およびシュードモナス（Pseudomonas）のエクソトキシンAが挙げられる。放射性核種の代表的な例としては、Cu-64、Ga-67、Ga-68、Zr-89、Ru-97、Tc-99m、Rh-105、Pd-109、In-111、I-123、I-125、I-131、Re-186、Re-188、Au-198、Au-199、Pb-203、At-211、Pb-212、およびBi-212が挙げられ

る。さらに、上記の抗体もまた標識することができる場合があり、また、リガンド結合対の1つのパートナーに結合させることができる場合もある。代表的な例としては、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、およびリボフラビン-リボフラビン結合タンパク質が挙げられる。

【0158】

本明細書中に記載されている分子を、上記に記載された代表的な標識に結合させるか、またはそのような標識で標識するための方法は、当業者であれば容易に行うことができる (Trichothecene Antibody Conjugate, 米国特許第4, 744, 981号; Antibody Conjugate, 米国特許第5, 106, 951号; Fluorogenic Materials and Labeling Techniques, 米国特許第4, 018, 884号; Metal Radionuclide Labelled Proteins for Diagnosis and Therapy, 米国特許第4, 897, 225号; および Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics, 米国特許第4, 988, 496号を参照のこと; また, Inman, Methods In Enzymology, Vol. 34, Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B, Jakoby and Wilchek (eds.), Academic Press, New York, p. 30, 1974も参照のこと; また, Wilchek and Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications," Anal. Biochem. 171:1-32, 1988も参照のこと)。免疫結合体は、抗TGF- β 結合タンパク質抗体またはその抗体フラグメントのような抗体と、検出可能な標識を含む組成物である。好ましくは、免疫結合体の抗体部分は、その同種抗原に特異的に結合して、結合後に結合前と同じ、またはわずかに低い結合親和性を有する。

【0159】

(薬学的組成物)

上記のように、本発明により、また、TGF- β ファミリーのメンバーに対するTGF- β 結合タンパク質の結合を阻害する上記の分子のうちの1つを、薬学的または生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤、もしくは希釈剤とともに含む、種々の薬学的組成物が提供される。当業者に公知である任意の適切なキャリアを、本発明の薬学的組成物中使用することができる。治療的な使用のための単体は周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed. (1985))に記載されている。一般的にはこのようなキャリアは、使用される投与量および濃度でレシピエントに対して非毒性でなければならない。通常、このような組成物の調製は、治療薬を、緩衝液; アスコルビン酸のような酸化防止剤、低分子量(約10残基未満)のポリペプチド; タンパク質; アミノ酸; 炭水化物(マルトース、グルコース、スクロース、もしくはデキストリンを含む); EDTAのようなキレート化剤; グルタチオン; ならびに他の安定剤および賦形剤と混合することを必然的に伴う。中性の緩衝化生理食塩水または非特異的血清アルブミンと混合した生理食塩水が、例示的な希釈剤である。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として処方される場合もある。

【0160】

一般的には、キャリアのタイプは、投与の態様に基づいて選択される。薬学的組成物は、任意の適切な投与様式で処方することができる。これらとしては、例えば、局所、経口、鼻腔、髄腔内、直腸、膣、舌下、または全身投与(皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、静脈内、外耳道内、尿道内注射または注入を含む)が挙げられる。薬学的組成物(例えば、経口投与または注射による投与のためのもの)は、液体の形態(エリキシル剤、シロップ剤、溶液、乳濁液、または懸濁液)である場合もある。液体の薬学的組成物には、例えば、以下の1つ以上が含まれることができる: 注射用の水のような滅菌の希釈剤、生理食塩溶

液、好ましくは、生理食塩水、リンガーの溶液、等張性塩化ナトリウム、不揮発性油（これは、溶媒もしくは懸濁媒体となり得る）、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；抗菌剤；酸化防止剤；キレート化剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸のような緩衝液；ならびに塩化ナトリウムまたはデキストロースのような等張性の調節のための薬剤。全身投与のための調製物は、アンプル、使い捨ての注射器、またはガラスもしくはプラスチック製の多用量バイアルに封入することができる。生理食塩水の使用が好ましく、注射することができる薬学的組成物は、滅菌であることが好ましい。

【0161】

本明細書中に記載される組成物は、徐放用に処方することができる（すなわち、投与後に化合物をゆっくりと放出するカプセルまたはスポンジのような処方物）。このような組成物は、一般的には、周知の技術を使用して調製され、例えば、経口、直腸、皮下への移植によって、あるいは所望される標的部位への移植によって投与される。徐放処方物には、キャリアマトリックス中に分散させられた薬剤を含めることができ、徐放処方物は、速度制御膜によって周囲を囲まれた容器内に入れられる。このような処方物において使用される単体は、生体適合性であり、また、生分解性である場合もある。好ましくは、処方物により、比較的一定したレベルでの有効成分の放出が提供される。徐放処方物に含まれる活性な化合物の量は、移植部位、放出速度と期待される時間、さらには、処置または予防される状態の性質に応じて変化する。この態様において有用な代表的なキャリアとしては、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微粒子が挙げられる。他の代表的な徐放キャリアとしては、長分子バイオベクターが挙げられ、これは、脂質ではない親水性コア（例えば、架橋された多糖類またはオリゴ糖）と、必要に応じて、リン脂質のような両親媒性化合物を含む外層を含む（例えば、米国特許第5,151,254号、およびPCT出願番号WO94/20078、同WO/94/23701、および同WO96/06638を参照のこと）。

【0162】

別の代表的な実施形態においては、生分解性マイクロスフェア（例えば、ポリアセテート、ポリグリコレート）が、本発明の組成物についてのキャリアとして使用される。適切な生分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号；同第5,075,109号；同第5,928,647号；同第5,811,128号；同第5,820,883号；同第5,853,763号；同第5,814,344号；同第5,407,609号；および同第5,942,252号に開示されている。WO99/40934およびその中で引用されている参考文献に記載されているような、修飾されたB型肝炎コアタンパク質キャリアシステムもまた、多くの用途に有用である。別の代表的なキャリア/送達システムでは、クラスI制限細胞傷害性Tリンパ球応答を宿主中で誘導することができる、米国特許第5,928,647号に記載されているような、粒子-タンパク質複合体を含むキャリアを使用する。

【0163】

別の代表的な実施形態においては、リン酸カルシウムコア粒子が、本発明の組成物用のキャリアまたは徐放マトリックスとして使用される。例示的なリン酸カルシウム粒子は、例えば、公開特許出願番号WO/0046147に開示されている。

【0164】

抗SOST抗体および/または調節因子をコードするポリヌクレオチドを含む（その結果、ポリペプチドおよび/または調節因子が元の位置で作成される）薬学的組成物については、ポリヌクレオチドを、核酸と、細菌、ウイルス、および哺乳動物の発現ベクターを含む、当業者に公知の種々の送達システムのいずれかの中に存在させることができる。このような発現システム中にDNAを組み込むための技術は、当業者に周知である。DNAはまた、例えば、Ulmer et al., Science 259:1745-1749, 1993に記載されているように、そしてCohen, Science 259;1

691-1692, 1993によって概説されているように、「裸」でもあり得る。裸のDNAの取り込みは、細胞へ効率よく輸送される生分解性ビーズ上にDNAをコーティングすることによって増大させることもできる。

【0165】

例えば、経口、全身的、静脈内、鼻腔内、および筋肉内投与を含む種々の処置レジメおよび処方において、本明細書中に記載される特定の組成物を使用するための適切な投与量および処置レジメの開発は、当業者に周知であり、そのいくつかは、一般的な説明の目的のために以下で簡単に議論される。

【0166】

特定の用途においては、本明細書中に開示される薬学的組成物は、経口投与によって動物に投与することができる。この場合には、これらの組成物は、不活性な希釈剤とともに、または吸収される食用のキャリアとともに処方することができる。またはこれらは、ハードゼラチンカプセルかまたはソフトゼラチンカプセルの中に封入することもでき、またこれらは、食事療法用の食物とともに直接配合することもできる。

【0167】

特定の状況においては、本明細書中で開示される薬学的組成物を、全身的に、静脈内に、筋肉内に、あるいは、さらには腹腔内に投与することが望まれる。このようなアプローチは当業者に周知であり、そのいくつかは、例えば、米国特許第5,543,158号；米国特許第5,641,515号、および米国特許第5,399,363号にさらに記載されている。特定の実施形態においては、遊離の塩基または薬学的に受容可能な塩としての有効成分の溶液が、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水の中に調製され得る。分散物は、また、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中に、および油中に調製され得る。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物には、一般的には、微生物の増殖を防ぐための保存料が含まれる。

【0168】

注射可能な用途に適している代表的な薬学的形態としては、滅菌の水溶液または分散物、および滅菌の注射可能な溶液または分散物を即座に調製するための滅菌の粉末が挙げられる（例えば、米国特許第5,466,468号を参照のこと）。全ての場合において、これらの形態は滅菌でなければならず、そして容易に注射器の中に入れることができる程度に流動性でなければならない。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用から保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および／または植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散物の場合には必要とされる粒子の大きさを維持することによって、および／または界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用からの防御は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって容易に行うことができる。多くの場合には、例えば、糖または塩化ナトリウムのような、等張化剤を含めることが好ましい。注射可能な組成物の長期間の吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に使用することによってもたすことができる。

【0169】

1つの実施形態においては、水溶液の非経口投与のためには、溶液は、必要な場合には適切に緩衝化されなければならない、液体の希釈剤が最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張化させられる。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に適している。この組み合わせにおいては、使用することができる滅菌の水性媒体は、本発明の開示を参照して当業者に公知である。例えば、1用量が1mlの等張性NaCl溶液中に溶解させられ、これは、1000mlの皮下注入液に添加されるか、ま

10

20

30

40

50

たは注入が予定される部位に注射されるかのいずれかが行われる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038および1570-1580を参照のこと）。用量のいくつかのバリエーションが、処置される被験体の状態に応じて必然的に生じる。さらに、ヒトへの投与については、調製物は、もちろん、滅菌性、発熱性、ならびに食品医薬品局による生物製剤の基準（FDA Office of Biologics standard）によって要求される一般的な安全性および純度の基準を満たすことが好ましい。

【0170】

本発明の別の実施形態においては、本明細書中で開示される組成物は、中性の形態または塩の形態で処方される場合もある。例示的な薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基を用いて形成される）が挙げられ、これは、例えば、塩酸またはリン酸のような無機酸、あるいは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸などを用いて形成される。遊離のカルボキシル基を用いて形成される塩もまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインのような有機塩基などから誘導することができる。処方の際には、溶液が、投与量処方物と適合する様式で、治療上有効であるそのような量で投与される。

【0171】

キャリアは、さらに、任意の全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーディング剤、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤、緩衝液、キャリア溶液、懸濁液、コロイドなど野いずれか、またはそれらの全てを含むことができる。薬学的に活性な物質についてのこのような媒体および薬剤の使用は当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤を有効成分と配合する場合を除いて、治療用組成物中でのその使用が想定される。相補活性成分もまた、組成物中に配合することができる。語句「薬学的に受容可能な」は、ヒトに投与された場合に、アレルギー性または同様の望ましくない反応を生じない分子実体および組成物をいう。

【0172】

特定の実施形態においては、リポソーム、ナノカプセル、マイクロカプセル、脂質粒子、小胞などを、適切な宿主細胞／生物体中に本発明の組成物を導入するために使用することができる。具体的には、本発明の組成物を、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、またはナノ粒子などのいずれかの中にカプセル化して、投与のために処方することができる。あるいは、本発明の組成物は、このようなキャリアビヒクルの表面上に共有結合によって、または非共有的に結合させることもできる。

【0173】

薬剤のキャリアとなり得るリポソームおよびリポソーム様の調製物の処方および使用は、一般的には当業者に公知である（例えば、Lasica, Trends Biotechnol. 16(7):307-21, 1998; Takakura, Nippon Rinsho 56(3):691-95, 1998; Chandran et al., Indian J. Exp. Biol. 35(8):801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3):233-61, 1995; 米国特許第5,567,434号; 米国特許第5,552,157号; 米国特許第5,565,213号; 米国特許第5,738,868号; および米国特許第5,795,587号を参照のこと; それらの全体を参照することにより、それぞれが具体的に本明細書中に組み込まれる）。リポソームは、他の手順によっては通常はトランスフェクトすることが困難である多数の細胞型（これには、T細胞懸濁物、初代肝細胞培養物、およびPC12細胞が含まれる）についてうまく使用されている（Renneisen et al., J. Biol. Chem. 265(27):16337-42, 1990; Muller et al., DNA Cell Biol. 9(3):221-29, 1990）。さらに、リポソームについては、ウイルスをベースとする送達システムの典型であるDNAの長さについての制限はない。リポソームを使用して、遺

10

20

30

40

50

伝子、種々の薬物、放射線治療薬、酵素、ウイルス、転写因子、アロステリックエフェクターなどを、種々の培養された細胞株および動物に効率よく導入することができる。さらに、リポソームを使用することには、全身への投与後に自己免疫反応または許容できない毒性を伴うことはないようである。特定の実施形態においては、リポソームは、水性媒体中に分散させられ、多重膜同心円二重層である小胞（多重膜小胞（MLV）とも呼ばれる）を自発的に形成するリン脂質から形成される。

【0174】

あるいは、他の実施形態においては、本発明により、本発明の組成物の薬学的に受容可能なナノカプセル処方物が提供される。ナノカプセルは、通常、安定な再現性のある方法で化合物を捕捉することができる（例えば、Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 24 (12): 1113-28, 1998を参照のこと）。細胞内への多因子の過負荷による副作用を回避するために、そのような超微粒子（およそ0.1 μ mの大きさ）が、生体内で分解されるポリマーを使用して設計される。このような粒子は、例えば、Couvreur et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5 (1): 1-20, 1988; zur Muhlen et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (2): 149-55, 1998; Zambaux et al., J. Controlled Release 50 (1-3): 31-40, 1998; および米国特許第5, 145, 684号によって記載されているように作成することができる。

【0175】

さらに、本発明の薬学的組成物は、そのような薬学的組成物の使用に関する使用説明書を提供するパッケージング材料とともに、容器内に置かれる場合もある。一般的には、このような使用説明書には、試薬の濃度を記載する明確な表現、さらには、特定の実施形態においては、薬学的組成物の再構成に必要な場合がある賦形剤成分または希釈剤（例えば、水、生理食塩水またはPBS）の相対的な量を記載する明確な表現が含まれる。

【0176】

（処置方法）

本発明によって、また、骨のミネラル含有量およびミネラル密度を増大させるための方法が提供される。簡単に言うと、多数の状態によって、例えば、骨が使用できないことになってしまう（例えば、骨折が原因で）疾患、遺伝的素因、事故を含む、骨のミネラル含有量の減少が生じる。本発明により、骨の再吸収に有効であるか、または骨形成細胞を死滅させ、そして正常な加齢を行う治療薬もまた、提供される。TGF- β ファミリーのメンバーに対するTGF- β 結合タンパク質の結合を阻害する本明細書中に記載される分子の使用により、このような状態が処置されるか、または予防される。本明細書中で使用される場合は、骨のミネラル含有量は、骨のミネラル含有量が選択される部位において有意な様式で増大した場合に、増大したと理解される。

【0177】

骨のミネラル含有量の減少が生じる広範な種々の状態は、本明細書中に記載される分子を用いて処置することができる。このような状態を有している患者は、周知の技術を使用して臨床的な診断によって同定することができる（例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, Inc.を参照のこと）。処置することができる疾患の代表的な例としては、骨の成長または発達が異常である形成不全が挙げられる。このような状態の代表的な例としては、軟骨形成不全症、鎖骨頭蓋骨形成不全症、内軟骨腫症、線維性異骨症、ゴーシェ病、低リン酸血症性くる病、マルファン症候群、遺伝性多発性外骨腫症、神経芽細胞種、骨形成不全症、大理石骨病、骨斑紋症、硬化性外傷、骨折、歯周病、偽関節、および化膿性骨髄炎が挙げられる。

【0178】

処置または予防することができる他の状態としては、広範な種々の原因の骨減少症（すなわち、若い時のピークの骨格ミネラル含有量よりも1標準偏差以上低い骨のミネラル含

有量または骨ミネラル密度を生じる状態)が挙げられる。このような状態の代表的な例としては、貧血状態、ステロイドが原因で生じた状態、ヘパリンが原因で生じた状態、骨髄疾患、壊血病、栄養失調症、カルシウム不足、突発性骨粗鬆症、先天性骨減少症または骨粗鬆症、アルコール依存症、慢性肝疾患、老齢、閉経後の状態、過少月経、無月経、妊娠、真性糖尿病、甲状腺機能亢進症、クッシング症候群、末端肥大症、性腺機能低下症、運動不足または非活動、反射性交感神経性ジストロフィー症候群、一時的な局所性骨粗鬆症、および骨軟化症が挙げられる。

【0179】

本発明の1つの実施形態においては、骨のミネラル含有量または骨ミネラル密度は、SOSTポリペプチドをTGF- β ファミリーのメンバーに対する結合から阻害する分子の10
治療有効量を、温血動物に投与することによって増大させることができる。処置することができる温血動物の例には、脊椎動物および哺乳動物の両方が含まれ、これらとしては、例えば、ヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラット、およびマウスが挙げられる。治療用分子の代表的な例としては、リボザイム、リボザイム遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および本明細書中に記載されている抗体が挙げられる。

【0180】

本発明の他の実施形態においては、骨密度を増大させるための方法が提供される。この方法には、骨に帰る細胞中に、TGF- β ファミリーのメンバーに対するSOSTの結合を阻害する分子の発現を指示するベクターを導入する段階、および、ベクターを含む細胞を温血動物に投与する段階が含まれる。簡単に言うと、骨に帰る細胞は、患者の骨(例えば、CD34+、骨芽細胞、骨細胞などのような骨髄から得られる細胞)、抹消血から、または培養物から直接得ることができる。適切なベクターの代表的な例としては、ヘルペスウイルスベクター(例えば、米国特許第5,288,641号);アデノウイルスベクター(例えば、WO94/26914、WO93/9191;Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(1):215-219, 1994;Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(24):11498-502, 1993;Guzman et al., Circulation 88(6):2838-48, 1993;Guzman et al., Cir. Res. 73(6):1202-1207, 1993;Zabner et al., Cell 75(2):207-216, 1993;Li et al., Hum. Gene Ther. 4(4):403-409, 1993;Caillaud et al., Eur. J. Neurosci. 5(10):1287-1291, 1993;Vincent et al., Nat. Genet. 5(2):130-134, 1993;Jaffe et al., Nat. Genet. 1(5):372-378, 1992;およびLevrero et al., Gene 101(2):195-202, 1991);アデノ随伴ウイルスベクター(WO95/13365;Flotte et al., PNAS 90(22):10613-10617, 1993);パキキュロウイルスベクター;パルボウイルスベクター(Koering et al., Hum. Gene Therap. 5:457-463, 1994);ポックスウイルスベクター(Panicali and Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927-4931, 1982;およびOzaki et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193(2):653-660, 1993);ならびにレトロウイルス(例えば、EP0,415,731;WO90/07936;WO91/0285、WO94/03622;WO93/25698;WO93/25234;米国特許第5,219,740;WO93/11230;WO93/10218)のようなウイルスベクターが挙げられる。種々のウイルスまたはウイルス以外の供給源に由来する種々のエレメント(例えば、プロモーター、エンベロープ配列など)の混合物を含むウイルスベクターも、同様に、構築することができる。種々の実施形態においては、ウイルスベクター自体、またはウイルスベクターを含むウイルス粒子のいずれかを、以下に記載される方法および組成物に使用できる場合もある。

10

20

30

40

50

【0181】

本発明の他の実施形態においては、TGF- β ファミリーのメンバーに対するSOSTポリペプチドの結合を阻害する分子をコードする核酸分子自体が、種々の技術によって投与される場合もある。このような技術としては、例えば、ポリ-L-リジンDNA複合体と結合させたアシアロオロソムコイド(ASOR)の投与(Cristano et al., PNAS 92:122-126, 1993);死滅させたアデノウイルスに結合させたDNAの投与(Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3(2):147-154, 1992);サイトフェクチン媒介導入(DMRIE-DOPE, Vical, California);直接的なDNA注射(Acsadi et al., Nature 352:815-818, 1991);DNAリガンド(Wu et al., J. of Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989);リポフェクション(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417, 1989);リポソーム(Pickering et al., Circ. 89(1):13-21, 1994;およびWang et al., PNAS 84:7851-7855, 1987);マイクロプロジェクティルボンバードメント(Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2726-2730, 1991);およびタンパク質自体をコードする核酸の、単独(Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993)またはPEG-核酸複合体のいずれかでの直接的な投与が挙げられる。

10

20

【0182】

骨のミネラル含有量の増加の決定は、X線の使用によって直接に(例えば、骨密度測定装置(Dual Energy X-ray Absorptiometryすなわち「DEXA」)、または、骨芽細胞特異的アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、1型プロコラーゲンC'プロペプチド(PICP)、および全アルカリホスファターゼのような骨の代謝回転マーカーからの推測によって(Comier, Curr. Opin. in Rheu. 7:243(1995)を参照のこと)、あるいは、ピリジノリン、デオキシピリジノリン、N-テロペプチド、尿のヒドロキシプロリン、血漿の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ、およびガラクトシルヒドロキシリジンを含むがこれらに限定されない骨吸収のマーカーからの推測によって(Comier, 前出を参照のこと)、直接決定することができる。骨量もまた、体重から、または他の方法を使用することによって計算することができる(Guinness-Hey, Metab. Bone Dis. Relat. Res. 5:177-181, 1984を参照のこと)。

30

【0183】

当業者に明らかであるように、投与量および投与頻度は、もちろん、処置される適応症の性質および重篤度、所望される反応、患者の状態などのような要因に応じて変化する。通常は、組成物は、上記のような種々の技術によって投与され得る。

【0184】

以下の実施例は、説明のために提供され、限定のために提供されるものではない。

【実施例】

40

【0185】

(実施例1)

(スクレロスチンコア領域のモデル化)

相同性認識技術(例えば、PSI-BLAST(Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-402(1997)、FUGUE(Shi et al., J. Mol. Biol. 310:243-57(2001))は、SOSTのコア領域(SOST_Core)が、シスチンノット折り畳み構造をとっていることを示唆した。FUGUEは、配列間と構造間の相同性を検出するための感度の高い方法である。ヒトの絨毛膜ゴナドトロピン β (hCG- β)は、その実験により決定された3D構造が既知であり、SOST_Coreの最も近いホモログとしてFUGUE(Sh

50

i et al., 前出) によって同定された。したがって、hCG- β を、SOST_Coreについて3Dモデルを作るための構造鋳型として使用した。

【0186】

SOST_Coreおよびその近いホモログのアラインメントを図1に示す。アラインメントに示したホモログのうち、hCG- β (CGB) だけが3D構造が既知であった。SOST_CoreとhCG- β との間での配列同一性は、およそ25%であった。8個のCYS残基が、ファミリー全体を通じて保存されており、これにより、SOST_CoreとhCG- β との間の全体的な構造類似性が強調される。3対のシチン(1-5、3-7、4-8)が、「ノット」立体構造中でジスルフィド結合を形成する(図1に実線で示す)。これは、シスチンノットの折り畳みに特徴的である。さらなるジスルフィド結合(2-6)が、図1に点線で示され、これはこのファミリーに特有であり、これにより、他のシスチンノットファミリー(例えば、TGF- β 、BMP)からタンパク質のファミリーを識別する。

10

【0187】

SOST_Coreを、PDB (Berman et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58 (Pt 6 Pt 1): 899-907 (2002))、entry 1HCNを使用し、hCG- β (Wu et al., Structure 2: 545-58 (1994)) の3D構造を、構造鋳型としてモデル化した。モデルを、MODELER (Sali & Blundell, J. Mol. Biol. 234: 779-815 (1993)) を用いて計算した。最良のモデルのスナップショットを図2に示す。

20

【0188】

ほとんどのシスチンノットタンパク質は二量体を形成する。なぜなら、単量体中には疎水性コアが存在しないからである (Scheufler et al., 前出; Schlunegger and Grutter, J. Mol. Biol. 231: 445-58 (1993)); Wu et al., 前出)。SOSTは同じ法則に従い、ホモ二量体を形成してその安定性を増大させる。二量体を形成したSOST_Core領域についてのモデルの構築により、いくつかの課題が示された。これらは、(1) SOST_CoreとhCG- β との間での配列類似性が低い(25%) こと; (2) ホモ二量体の代わりに、hCG- β はhCG- α と二量体を形成すること; および(3) 多数の異なる関連する単量体の立体構造が、異なるファミリー(例えば、PDGF、TGF- β 、ニューロトロフィン、IL-17F、ゴナドトロピン) から二量体を形成したシスチンノットタンパク質において観察されたことが原因である。これにより、SOSTの二量体立体構造がhCG- α / β ヘテロ二量体立体構造とは有意に異なり得ることが示唆された。モデルを構築する際には、hCG- α を、手作業での調整により組み合わせて構造重ね合わせ技術を使用してヘテロ二量体構造(1HCN)に由来するhCG- β で置き換え、その後、SOST_Coreホモ二量体モデルを、偽hCG- β ホモ二量体構造にしたがって組み立てた。最終的なモデルを図3に示す。

30

【0189】

(実施例2)

40

(SOST-BMP相互作用のモデル化)

この実施例では、BMPとSOSTとの間での相互作用に関与しているBMP上のI型レセプター結合部位およびII型レセプター結合部位のタンパク質モデル化について記載する。

【0190】

競合実験は、SOSTがBMPに対する結合についてI型レセプターおよびII型レセプターの両方と競合することを示した。ELISAに基づく競合アッセイにおいては、BMP-6は、スクレロスチンでコーティングされた表面(300 ng/ウェル)と高い親和性($K_D = 3.4$ nM)で選択的に相互作用した。BMPレセプターIA (Fc融合構築物)の増加量がBMP-6 (11 nM)に対する結合についてスクレロスチンと競合し

50

た ($IC_{50} = 114 \text{ nM}$)。10倍のモル過剰量のBMPレセプターが、BMP-6に対するスクロスチンの結合をおよそ50%減少させるには十分であった。この競合はまた、BMPレセプターII-FC融合タンパク質 ($IC_{50} = 36 \text{ nM}$) およびDAN ($IC_{50} = 43 \text{ nM}$) を用いても観察された。アッセイの特異性は、スクロスチンと、アクチビンR1B-FC融合タンパク質 (BMPには結合しないTGF- β レセプターファミリーのメンバー) との間では、BMP-6に対する結合について競合が存在しないことによって示される。

【0191】

BMPポリペプチド上のI型レセプター結合部位およびII型レセプター結合部位はマップされており、これらは空間的に隔てられている (Scheufler et al., 前出; Innis et al., 前出; Nickel et al., 前出; Hart et al., 前出)。高い親和性でBMPに結合する別のBMPアンタゴニストであるノギンは、ノギンのN末端部分を介してI型レセプター結合部位およびII型レセプター結合部位の両方で、BMPと接触する (Groppe et al., 前出)。C末端付近のコア領域中の2つの β -鎖もまた、II型レセプター結合部位でBMPと接触する。

【0192】

ノギンとSOSTの手作業で調整したアラインメントは、これらの2つのポリペプチドが、タンパク質のN末端部分の間、およびコア領域間に配列類似性を共有していることを示した。アミノ酸配列のアラインメントを図4に示す。特徴的なcysノットを形成するシステイン残基は、ノギンとSOSTとの間で保存されていた。全体的な配列の同一性は24%であり、N末端結合領域 (アラインメント位置1~45) 内での配列同一性は33%であった。ノギンのN末端結合領域中の2つの残基、すなわち、アラインメント位置21のLeu (L) と位置23のGlu (E) は、BMPの結合において重要な役割を旗示ることが報告されている (Groppe et al., 前出)。いずれの残基も、SOST中でも同様に保存されていた。コア領域 (アラインメント位置131~228) の配列類似性は約20%であったが、cysノット骨格は維持されており、十分な数の重要な残基が保存されており、このことにより、ノギンとSOSTとの間での相同性がサポートされる。

【0193】

ノギンの構造を、2つのSOST単量体がどのような二量体を形成するかを理解するために、SOSTに対して比較した。図5に示すように、ノギンの構造は、N末端領域とコア領域の間のリンカーは2つの領域を繋ぐ役割だけではなく、2つのノギン単量体の間の二量体界面の一部をも形成する役割をも果たすことを示唆した。ノギンとSOSTとの間の1つの大きな違いは、N末端領域とコア領域との間のリンカーがSOSTにおいてははるかに短い点であった。

【0194】

SOSTのC末端領域は、SOSTの二量体化において役割を果たすこともできる。ノギンの配列はコア領域で終了し、一方、SOSTは、さらなるC末端領域を有していた。ノギンの構造においては、ジスルフィド結合が2つのノギンの単量体のC末端を連結させる。したがって、SOSTのC末端領域は、2つの単量体の界面で閉じ始め、これにより二量体化に関与することができる。さらに、二次構造の推定は、SOSTのC末端領域のいくつかの部分が、ヘリックスを形成する傾向にあることを示す。SOST中のこの領域は、二量体化活性を担う場合があり、これは、おそらく、ノギンのより長いリンカーの機能を模倣するヘリックス-ヘリックスパッキングを介して行われる。ノギンとSOSTの構造の間での別の相違点は、アラインメント位置169-185のSOSTコア領域中にアミノ酸の挿入が存在する点である (図4を参照のこと)。この挿入は β -ヘアピンを伸張し、これは、ノギン構造中の二量体化界面を示す (図5に、単量体の中央部のループ領域として、C末端Cys残基の上に示す)。この伸張された β -ヘアピンもまた、SOSTの二量体化に関与することができる。

【0195】

(実施例3)

(SOSTペプチド免疫原の設計および調製)

この実施例は、動物を免疫し、BMPとSOSTとの間の相互作用をブロックしてSOST単量体の二量体形成を妨げる抗体を作成するために使用される、SOSTペプチド免疫原の設計について記載する。

【0196】

(BMP結合フラグメント)

SOSTとノギンとの間での全体的な類似性、および2つのポリペプチドのN末端領域の間での類似性は、SOSTがノギンと同様の様式でBMPと相互作用できることを示唆している。すなわち、SOSTのN末端領域は、BMP上のI型レセプター結合部位およびII型レセプター結合部位の両方と相互作用することができ、コア領域の一部(図4のアミノ酸アラインメント位置190~220)は、これらのSOST領域に特異的な抗体がSOSTに対するBMPの結合をブロックするかまたは妨害できるように、II型レセプター結合部位と相互作用することができる。

【0197】

ラットとヒトのSOSTについて、これらのSOSTポリペプチドフラグメントのアミノ酸配列を以下に提供する。

【0198】

SOST__N__リンカー：N末端領域(コア領域に連結する短いリンカーを含む)

【0199】

【化1】

ヒト：
QGWQAFKNDATETIPELGEYPEPPPELENNKTMNRAE
NGGRPPHHPFETKDVSEYS (配列番号47)

ラット：
QGWQAFKNDATETIIPGLREYPEPPQELENNQTMNRAEN
GGRPPHHPYDTKDVSEYS (配列番号48)

SOST__Core__Bind：そのII型レセプター結合部位でおそらくBMPに接触するコア領域中の部分(CYS残基アンカーを含むように両方の末端をわずかに伸ばした)

【0200】

【化2】

ヒト： CIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASC (配列番号49)

ラット：CIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASC (配列番号50)

(SOST二量体化フラグメント)

SOSTのC末端領域は、おそらく、SOSTホモ二量体の形成に関係している(実施例2を参照のこと)。伸張されたβ-ヘアピンもまた、ホモ二量体の形成において役割を担っている。このような領域に特異的に結合する抗体は、SOST単量体の二量体化を妨げるかまたは妨害することができる。これは、次いで、SOSTとBMPと間での相互作用を妨害する。これらの領域に対応するラットおよびヒトSOST中のポリペプチドフラグメントは以下である。

【0201】

SOST__C：C末端領域

【0202】

10

20

30

40

【化 3】

ヒト: LTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQA
ELENAY (配列番号51)

ラット: LTRFHNQSELKDFGPETARPQKGRKPRPRARGAKANQAE
LENAY (配列番号52)

10

S O S T _ C o r e _ D i m e r : S O S T の二量体化におそらく関係しているコア領域中の部分 (C y s 残基アンカーを含むように両方の末端をわずかに伸ばした)

【0203】

【化 4】

ヒト: CGPARLLPNAIGRGKWWRPSPGPDFRC (配列番号53)

ラット: CGPARLLPNAIGRVKWWRPNGPDFRC (配列番号54)

(S O S T N 末端の BMP 結合フラグメント)

20

S O S T の鍵となる N 末端結合領域 (図 4 のアラインメント位置 1 ~ 35) を、ノギン / BMP-7 複合体構造 (P r o t e i n D a t a B a n k E n t r y N o : 1 M 4 U) およびアミノ酸配列アラインメント (図 4 を参照のこと) に基づいてモデル化して、BMP とおそらく相互作用するであろう S O S T の N 末端のアミノ酸残基を同定した。S O S T のモデルを図 6 に示す。比較モデルにおいては、S O S T 配列中のアラインメント位置 8 のフェニルアラニン (P h e、F) (矢印および添付のテキストを参照のこと) が、BMP 二量体の表面上の疎水性ポケットに突き出している。同じ「ノブが穴の中に入っている (k n o b - i n t o - h o l e)」特徴は、BMP と I 型レセプター複合体構造においても観察されている (N i c k e l e t a l . , 前出)。ここで、レセプターの P h e 85 が同じポケットにフィットし、これは、T G F - β スーパーファミリー (例えば、T G F - β ファミリー、BMP ファミリーなどを含む) のメンバーについてのリガンド - I 型レセプター認識において重要な特徴である。モデルに従えば、ターンを指示するプロリン (P r o) もまた保存されており、これは、N 末端結合フラグメントが BMP 二量体表面に沿って縫うようにすすむことを可能にし、I 型レセプター結合部位から、複合体の他方の側面上の I I 型レセプター結合部位へと移動させる。結合フラグメントのカルボキシ末端付近の P r o によって指示される別のターンもまた保存されており、これは、次いで、リンカー領域に連結する。S O S T と BMP との間の広い範囲での接触を、図 6 で明らかにする。

30

【0204】

(ペプチド免疫原)

40

BMP タンパク質との接触をもたらすと推定される S O S T の N 末端領域を含むペプチドを設計した。ペプチド配列を以下に示す。動物を免疫するためには、ペプチド配列を、重複するように設計し、別のシステインを、K L H に容易に架橋できるように C 末端に付加した。その後、ペプチドを免疫に使用した。免疫原のペプチド配列は以下である：

【0205】

【化 5】

ヒト SOST:

QGWQAFKNDATETIIPPELGEY (配列番号 2)

TEIIPPELGEYPEPPPELENN (配列番号 3)

PEPPPELENNKTMNRAENGG (配列番号 4)

KTMNRAENGGRPPHHPFETK (配列番号 5)

10

RPPHHPFETKDVSEYS (配列番号 6)

さらなるCysを有するヒトSOSTペプチド:

QGWQAFKNDATETIIPPELGEY-C (配列番号 7)

TEIIPPELGEYPEPPPELENN-C (配列番号 8)

PEPPPELENNKTMNRAENGG-C (配列番号 9)

20

KTMNRAENGGRPPHHPFETK-C (配列番号 10)

RPPHHPFETKDVSEYS-C (配列番号 11)

ラット SOST:

QGWQAFKNDATETIIPGLREYPEPP (配列番号 12)

30

PEPPQELENNQTMNRAENGG (配列番号 13)

ENGGRPPHHPYDTKDVSEYS (配列番号 14)

TEIIPGLREYPEPPQELENN (配列番号 15)

さらなるCysを有するラットSOSTペプチド:

QGWQAFKNDATETIIPGLREYPEPP-C (配列番号 16)

40

PEPPQELENNQTMNRAENGG-C (配列番号 17)

ENGGRPPHHPYDTKDVSEYS-C (配列番号 18)

TEIIPGLREYPEPPQELENN-C (配列番号 19)

BMPタンパク質との接触をもたらすと推定されるコア領域のアミノ酸部分を含むように、以下のペプチドを設計した。システインを、K L Hに結合させるためにそれぞれのペプチドのC末端に付加し、結合させたペプチドを免疫に使用した。ドッキングコアN末端

50

ペプチド中の内部システインを、K L Hへの二重の結合を避けるためにセリンに変化させた。

【 0 2 0 6 】

【 化 6 】

ヒトSOSTについて:

Cys残基を付加していないアミノ酸配列:

ドッキング__コア__N末端__ペプチド: IPDRYRAQQRVQLLCPGGEAP (配列番号21)

10

ドッキング__コア__C末端__ペプチド: QLLCPGGEAPRARKVRLVAS (配列番号22)

ドッキング__コア__N末端__ペプチド: IPDRYRAQQRVQLLCPGGEAP-C
(配列番号23)

ドッキング__コア__C末端__ペプチド: QLLCPGGEAPRARKVRLVAS-C
(配列番号24)

20

ラットSOSTについて:

Cys残基を付加または置換していないアミノ酸配列:

ドッキング__コア__N末端__ペプチド: IPDRYRAQQRVQLLCPGG (配列番号25)

30

ドッキング__コア__C末端__ペプチド: PGGAAPRSRKVRLVAS (配列番号26)

Cysを付加し置換したペプチド免疫原:

ドッキング__コア__N末端__ペプチド: IPDRYRAQQRVQLLSPGG-C (配列番号27)

ドッキング__コア__C末端__ペプチド: PGGAAPRSRKVRLVAS-C (配列番号28)

40

S O S T ホモ二量体を形成するように相互作用する可能性がある S O S T 内の 2 つの領域には、ノギン中には存在しない S O S T コア領域を有しているアミノ酸が含まれる。この配列を含むように設計したヒト S O S T ペプチドは、K L H に結合させた C 末端または N 末端 C y s を有する。ラットの S O S T ペプチドについては、システインを配列のカルボキシ末端に付加した (配列番号 3 1) 。 K L H に結合させたペプチドを免疫に使用した。

【 0 2 0 7 】

【化 7】

ヒトSOSTについて:

CGPARLLPNAIGRGKWWRPS (配列番号 29)

IGRGKWWRPSGPDFRC (配列番号 30)

10

ラットSOSTについて:

PNAIGRVKWWRPNGPDFR (配列番号 31)

システインを付加したラットSOSTペプチド:

PNAIGRVKWWRPNGPDFR-C (配列番号 32)

20

SOSTホモ二量体を形成するように相互作用するであろうSOST中の第2の領域には、C末端領域が含まれる。ペプチド免疫原を、この領域内のアミノ酸配列を含むように設計した(下記を参照のこと)。KLHに結合させるために、システイン残基をC末端に付加し、結合させたペプチドを免疫のために使用した。

【0208】

【化 8】

ヒトSOSTについて:

KRLTRFHNQS ELKDFGTEAA (配列番号 33)

ELKDFGTEAA RPQKGRKPRP (配列番号 34)

RPQKGRKPRP RARSAKANQA (配列番号 35)

RARSAKANQA ELENAY (配列番号 36)

10

C末端にCysを付加したペプチド免疫原:

KRLTRFHNQS ELKDFGTEAA-C (配列番号 37)

ELKDFGTEAA RPQKGRKPRP-C (配列番号 38)

RPQKGRKPRP RARSAKANQA-C (配列番号 39)

RARSAKANQA ELENAY-C (配列番号 40)

20

ラットSOSTについて:

KRLTRFHNQSELKDFGPETARPQ (配列番号 41)

KGRKPRPRARGAKANQAELENAY (配列番号 42)

SELKDFGPETARPQKGRKPRPRAR (配列番号 43)

30

C末端にCysを付加したペプチド免疫原:

KRLTRFHNQSELKDFGPETARPQ-C (配列番号 44)

KGRKPRPRARGAKANQAELENAY-C (配列番号 45)

SELKDFGPETARPQKGRKPRPRAR-C (配列番号 46)

40

(実施例 4)

(TGF- β 結合タンパク質に対する抗体の結合を検出するためのアッセイ)

この実施例では、リガンド、例えば、抗体またはその抗体フラグメントの、スクレロシンに対する結合を検出するためのアッセイについて記載する。

50

【0209】

FLAG（登録商標）—スクレロスチン融合タンパク質を、製造業者（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）によって提供されているプロトコールにしたがって、米国特許第6,395,511号に記載されているように調製した。96ウェルマイクロタイタープレートのそれぞれのウェルを、抗FLAG（登録商標）モノクローナル抗体（Sigma Aldrich）でコーティングし、その後、PBS中の10%BSAでブロックした。融合タンパク質（20ng）を100μlのPBS/0.2%のBSAに添加し、96ウェルプレート上に60分間、室温で吸着させた。このタンパク質溶液を除去し、ウェルを洗浄して、結合していない融合タンパク質を洗い流した。BMP、例えば、BMP-4、BMP-5、BMP-6、またはBMP-7を、PBS/0.2%BSA中で希釈し、10pMから500nMまでの範囲の濃度でそれぞれのウェルに添加した。室温で2時間のインキュベーションのあと、結合溶液を除去し、プレートを200μlの容量のPBS/0.2%BSAで3回洗浄した。スクレロスチンに対するBMPの結合を、BMPに特異的なポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体、および適切な酵素結合第2段階試薬を使用して、標準的なELISA技術にしたがって検出した（例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Mol Biol. Vol 2 11. 2. 1-11. 2. 22 (1998)を参照のこと）。特異的な結合を、全ての結合から非特異的な結合を引き算することによって計算し、LIGANDプログラムを使用して分析した（Munson and Podbard, Anal. Biochem. 107:220-39 (1980)）。 10 20

【0210】

BMPに対するスクレロスチンの結合もまた、ホモジニアス時間分解蛍光検出によって検出した（Mellor et al., J Biomol. Screening, 3:91-99 (1998)）。スクレロスチンをコードするポリヌクレオチド配列を、当該分野で公知であって本明細書中に記載されている方法にしたがって、組み換え核酸構築物中のヒト免疫グロブリン定常領域に動作可能であるように連結し、ヒトFc—スクレロスチン融合タンパク質として発現させた。同様に、BMPリガンドを操作して、BMP—マウスFc融合タンパク質として発現させた。これらの2つの融合タンパク質を一緒にインキュベートし、Mellor et al.に記載されているようにアッセイを行った。 30

【0211】

（実施例5）

（TGF-β結合タンパク質に対するTGF-βファミリーのメンバーの結合を阻害する抗体についてのスクリーニングアッセイ）

この実施例は、スクレロスチンに対するTGF-βファミリーのメンバーの結合を阻害する抗体を検出するための方法について記載する。ELISAを、BMPの濃度をそのKd（例えば、BIAcore分析によって決定した）に固定して保ったことを除いて、基本的には、実施例4に記載されているように行った。さらに、抗体、または抗体のライブラリーもしくはコレクションを、1μMの濃度でウェルに添加した。抗体を、室温で2時間、BMPおよびスクレロスチンとともにインキュベートし、溶液を除去し、結合したBMPを記載したように定量した（実施例4を参照のこと）。抗体が存在しない条件下で観察したBMPの結合の40%を阻害する抗体を、この相互作用のアンタゴニストとみなした。これらの抗体を、さらに、それらの阻害定数、およびTGF-β結合タンパク質の結合親和性に対するそれらの効果を決定するために滴定実験を行うことによって、可能性のある阻害因子として評価した。比較できる特異性対照アッセイもまた行って、BMPリガンド作用に応じて変化するアッセイ（例えば、BMP/BMPレセプター競合実験）を使用して、同定されたアンタゴニストについての選択性プロフィールを確立した。 40

【0212】

（実施例6）

（骨基質へのTGF-β結合タンパク質の局在化の阻害）

骨基質（ヒドロキシアパタイト）への局在化の阻害の評価を、Nicolasの方法に 50

【図 3】



FIG. 3

【図 4 A】

	20	40	60	
NOGG ヒト	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	62	
NOGG ニワトリ	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	62	
NOGG XENLA	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	62	
NOGG FUGRU	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	62	
NOGG ゼブラフィッシュ	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	62	
SOST ヒト	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	52	
SOST ラット	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	52	
SOST マウス	MDPLHHPA--SSMPLVIGDPPPTDPEKQNETLPSLLEKVPSPATSP--EDRPG	:	50	

	80	100	120	
NOGG ヒト	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	127	
NOGG ニワトリ	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	119	
NOGG XENLA	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	118	
NOGG FUGRU	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	116	
NOGG ゼブラフィッシュ	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	117	
SOST ヒト	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	56	
SOST ラット	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	56	
SOST マウス	DEGGAGAGAEKAEKLLKRPSPSPPEIKELFSEELAGSKKRLSKRLRLQMLVSTTF	:	54	

	140	160	180	
NOGG ヒト	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	173	
NOGG ニワトリ	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	165	
NOGG XENLA	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	164	
NOGG FUGRU	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	162	
NOGG ゼブラフィッシュ	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	163	
SOST ヒト	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	119	
SOST ラット	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	119	
SOST マウス	CPMTAANDERFRFRRKNSCSKSSSTPEQ	:	117	

FIG. 4A

【図 4 B】

	200	220	240	260	
NOGG ヒト	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	205		
NOGG ニワトリ	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	197		
NOGG XENLA	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	196		
NOGG FUGRU	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	195		
NOGG ゼブラフィッシュ	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	196		
SOST ヒト	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	178		
SOST ラット	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	178		
SOST マウス	TLJANPC--SPESACTMTPTQYLLAGKSC	:	176		

NOGG ヒト	:	AKAKQKLELWY	:	190	
NOGG ニワトリ	:	AKAKQKLELWY	:	190	
NOGG XENLA	:	AKAKQKLELWY	:	190	
NOGG FUGRU	:	AKAKQKLELWY	:	190	
NOGG ゼブラフィッシュ	:	AKAKQKLELWY	:	190	
SOST ヒト	:	AKAKQKLELWY	:	190	
SOST ラット	:	AKAKQKLELWY	:	190	
SOST マウス	:	AKAKQKLELWY	:	188	

FIG. 4B

【図 5】

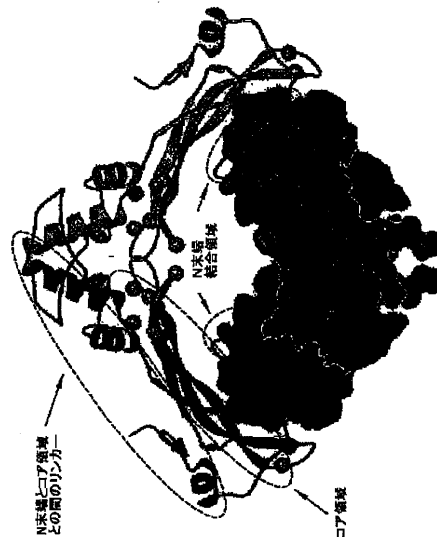
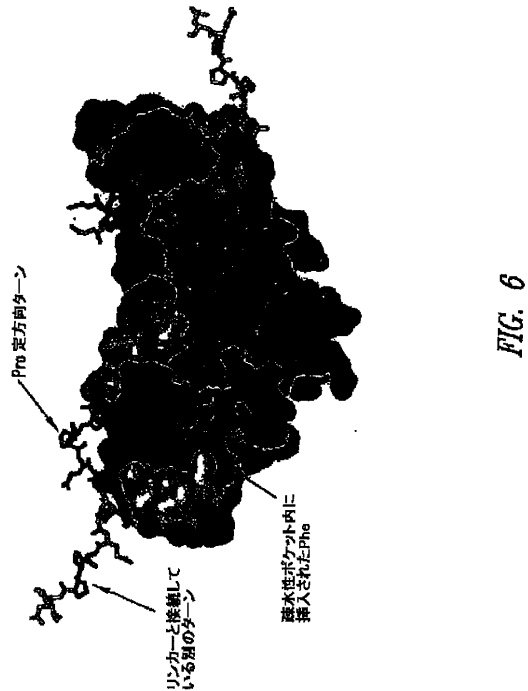


FIG. 5

【図 6】



【配列表】

2011105729000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年1月7日(2011.1.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のスクレロスチンポリペプチドの多くても50個の連続アミノ酸のペプチドを含む免疫原であって、ここで、該ペプチドは、配列番号1のアミノ酸86-111の少なくとも20個の連続アミノ酸を含む前記免疫原。

【請求項2】

前記ペプチドは、配列番号1のスクレロスチンペプチドの少なくとも20個の連続アミノ酸を含む、請求項1に記載の免疫原。

【請求項3】

前記ペプチドは、配列番号22の少なくとも4個の連続アミノ酸を含む、請求項1または請求項2に記載の免疫原。

【請求項4】

前記ペプチドは、キャリア分子と会合している、請求項1～3のいずれか1項に記載の免疫原。

【請求項5】

前記キャリア分子が、キーホールリンペットヘモシアニンである、請求項4に記載の免

疫原。

【請求項 6】

請求項 1、2、4 または 5 のいずれか 1 項に記載の免疫原を含有する組成物。

【請求項 7】

配列番号 1 のスクレロスチンポリペプチドの多くても 75 個の連続アミノ酸のペプチドを含む第二の免疫原を更に含有する、ここで、該ペプチドは、配列番号 22 の少なくとも 4 個の連続アミノ酸を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記第二の免疫原のペプチドは、配列番号 33 の少なくとも 4 個の連続アミノ酸を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

配列番号 1 のスクレロスチンポリペプチドの多くても 75 個の連続アミノ酸のペプチドを含む第二の免疫原を更に含有する、ここで、該ペプチドは、配列番号 33 の少なくとも 4 個の連続アミノ酸を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 10】

スクレロスチンポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するための方法であって、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の免疫原又は請求項 6～9 のいずれか 1 項に記載の組成物で動物を免疫することを含む前記方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 H 0 4 5		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1			
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15				
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19				
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	C 1 2 N	1/21				
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/08				
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	19/10				
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N			
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D			
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N			
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D			
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z			
			G 0 1 N	33/15	Z			
			G 0 1 N	33/577	B			
			C 1 2 P	21/08				

(72)発明者 ウィンクラー, デーヴィッド ジー.
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, 2 0 ティーエイチ アベニュー エヌ
イー 7 0 3 7

(72)発明者 シャイ, ジイエ
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, 3 2 エヌディー アベニュー エヌイ
ー 9 1 1 5

(72)発明者 レーサム, ジョン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 9, シアトル, 1 0 ティーエイチ アベニュー ウェ
スト 2 4 0 9

F ターム(参考) 2G045 AA29 BB20 CA25 CB01 CB13 DA36 DA37 FB01 FB03 FB07
FB08 FB12 FB15
4B024 AA01 AA11 BA53 GA03 GA11
4B064 AG27 BJ12 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA92X AB01 AB05 AC14 AC15 BA01 BA08 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC23 DD22 DD63 EE01
4H045 AA11 BA09 BA41 CA42 DA75 EA20 EA50 FA74

[illegible]

