(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2013-28622
(P2013-28622A)
(43)公開日　平成25年2月7日(2013.2.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	ZNAN	4C085
A61P 19/08	(2006.01)	A61K	39/395	D	
A61P 19/10	(2006.01)	A61P	19/08		
A61P 3/14	(2006.01)	A61P	19/10		
A61P 19/02	(2006.01)	A61P	3/14		

審査請求 有　請求項の数 9　ＯＬ　（全 52 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-201172 (P2012-201172)
(22)出願日　平成24年9月13日 (2012.9.13)
(62)分割の表示　特願2008-153218 (P2008-153218)の分割
原出願日　平成10年4月15日 (1998.4.15)
(31)優先権主張番号　08/842,842
(32)優先日　平成9年4月16日 (1997.4.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　08/880,855
(32)優先日　平成9年6月23日 (1997.6.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　09/052,521
(32)優先日　平成10年3月30日 (1998.3.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　ウイリアム・ジエイ・ボイル
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９３０２１、ムーアパーク、チエストナツト・リツジ・ストリート・１１６７８

Ｆターム(参考)　4C085 AA06 AA13 AA14 BB11 CC21 EE01 EE03

(54)【発明の名称】オステオプロテゲリン結合性蛋白および受容体

(57)【要約】　（修正有）
【課題】破骨細胞分化に関連するポリペプチドを含有する医薬組成物の提供。
【解決手段】破骨細胞の成熟に関連する新規ポリペプチドであるオステオプロテゲリン結合性蛋白が、オステオプロテゲリンへの親和性に基づいて同定される。ポリペプチドをコードする核酸配列、またはそのフラグメント、類似体もしくは誘導体、製造のためのベクターおよび宿主細胞、オステオプロテゲリン結合性蛋白の調製方法、および結合アッセイも記載される。骨粗鬆症、関節炎または転移による骨損失、高カルシウム血症、およびページェット病のような骨疾患の治療のための組成物および方法も提供される。オステオプロテゲリン結合性蛋白のための受容体も記載される。その受容体、作用薬および拮抗薬を用いて骨疾患を治療することができる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療有効量のオステオプロテゲリン結合性蛋白の調整剤を含んでなる、哺乳類の骨疾患を予防または治療するための医薬組成物であって、該調整剤が配列番号４で表されるオステオプロテゲリン結合性蛋白に特異的に結合する抗体である医薬組成物。
【請求項２】
骨疾患が骨粗鬆症、骨髄炎、悪性の高カルシウム血症、手術またはステロイド投与により引き起こされるオステオペニア、ページェット病、骨壊死、リューマチ性関節炎による骨損失、歯周骨損失、固定化、補綴ゆるみ及び骨融解性転移から選択される請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
１つ以上の骨形態形成因子、形質転換成長因子－β、ＴＧＦ－βファミリーメンバー、ＦＧＦ、インターロイキン１－抑制剤、ＴＮＦα抑制剤、副甲状腺ホルモン、Ｅ型プロスタグランジン、ビスホスホネート、エストロゲン、ＳＥＲＭ及び骨向上性鉱物とともに投与される請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
抗体がモノクローナル抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
抗体が組換え抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
抗体がヒト抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
抗体が、配列番号４で表されるオステオプロテゲリン結合性蛋白の細胞外領域又は細胞外領域のフラグメントに対する抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
抗体が膜結合状態のオステオプロテゲリン結合性蛋白に結合する抗体である請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
抗体が配列番号４で表されるオステオプロテゲリン結合性蛋白又はその免疫原性フラグメントに対して誘導されたものである請求項１に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、破骨細胞分化に関連するポリペプチドに関する。より詳しくは、本発明は、オステオプロテゲリン（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ）結合性蛋白、その蛋白をコードする核酸、その蛋白を製造するための発現ベクターおよび宿主細胞、および結合アッセイに関する。骨粗鬆症、関節炎による骨損失、ページェット病、および高カルシウム血症のような骨疾患の治療のための組成物および方法も記載されている。
【０００２】
本発明は、また、オステオプロテゲリン結合性蛋白のための受容体、ならびにその受容体を用いた骨疾患の治療のための方法および組成物にも関する。
【背景技術】
【０００３】
生体骨組織は、骨の沈着と再吸収との間の動的平衡を示す。これらの方法は、主に２つの細胞型により媒介される：すなわち、骨の有機マトリクスを含む分子を分泌する骨芽細胞と；骨マトリクスの溶解および骨塩の可溶化を促進する破骨細胞である。骨が成長している若い個体においては、骨沈着の速度が骨再吸収の速度を超えており、一方、歳をとった個体においては、再吸収速度が沈着を超え得る。後者の状況においては、骨の破壊が増加することで、骨の体積および強度が低下し、骨折の危険性が増加し、折れた骨の修復が遅れるまたは不完全になる。

【０００４】
破骨細胞は、骨髄中の造血前駆細胞から形成される巨大貧食多核細胞である。成熟機能性破骨細胞の成長および形成は十分に理解されていないが、破骨細胞は、種々の成長促進因子への露出に反応して単核／大食細胞系列と共に成熟すると考えられている。骨髄前駆細胞の前破骨細胞への初期の発達は、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、腫瘍壊死因子－β（ＴＮＦ－β）、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、および白血病抑制因子（ＬＩＦ）のような可溶性因子により媒介されると考えられている。培養において、添加された大食細胞コロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）の存在下に前破骨細胞が形成される。これらの因子は、主に破骨細胞発達の初期段階において作用する。破骨細胞形成の最終段階にポリペプチド因子が関与することが詳細に報告されていない。しかしながら、副甲状腺ホルモンが破骨細胞の形成および活性を刺激し、カルシトニンが、程度は低いが、抑制効果を有することが報告されている。
【０００５】
近年、生体外および生体内において破骨細胞の形成を反対方向に制御するオステオプロテゲリン（ＯＰＧ）と呼ばれる新しいポリペプチド因子が記載されている（共有の同時係属出願中の１９９５年１２月２２日付けの米国出願０８／５７７，７８８、１９９６年９月３日付けの０８／７０６，９４５、および１９９６年１２月２０日付けの０８／７７１，７７７（これらはここに参考として取り込まれる）；およびＰＣＴ出願番号ＷＯ９６／２６２７１を参照されたい）。ＯＰＧは、ＯＰＧポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスにおいて骨密度を劇的に増加させ、卵巣切除ラットに投与されたときに骨損失の程度を低下させた。生体外破骨細胞形成におけるＯＰＧ活性の分析は、ＯＰＧは単核／大食細胞前駆体の成長および分化を妨害しないが、単核／大食細胞前駆体からの破骨細胞の分化を遮断する傾向はより大きいことを示した。すなわち、ＯＰＧは破骨細胞形成の程度の制御において特異性を有するようである。
【０００６】
ＯＰＧは、異なる構造的および機能的特性を有する２つのポリペプチド領域を含む。全長ポリペプチドの残基２２～１９４（Ｎ－末端メチオニンは残基１と示される）の周りに広がっているアミノ末端領域は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）ファミリーの他のメンバー、特にＴＮＦＲ－２に類似性を示すが、ＴＮＦＲファミリーメンバーの特徴であるシステインに富む領域が保存される。カルボキシ末端領域に広がっている残基１９４～４０１は、いかなる既知の配列にも有意な類似性を有さない。多くの他のＴＮＦＲファミリーメンバーとは異なり、ＯＰＧはもっぱら分泌蛋白のみのようであり、膜結合状態としては合成されないようである。
【０００７】
破骨細胞形成の負の制御剤としての活性に基づき、ＯＰＧが、破砕細胞分化に含まれるポリペプチド因子に結合し、それにより１種または２種以上の末端工程を遮断して成熟破骨細胞の形成を導くことが仮定される。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【特許文献１】米国特許出願第０８／５７７，７８８号明細書
【特許文献２】米国特許出願第０８／７０６，９４５号明細書
【特許文献３】米国特許出願第０８／７７１，７７７号明細書
【特許文献４】国際公開第９６／２６２７１号
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
従って、本発明の目的は、ＯＰＧと相互作用するポリペプチドを同定することである。そのポリペプチドは、破骨細胞成熟において役割を果たし、骨組織の治療に有用であり得

る。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
発明の要約
腫瘍壊死因子ファミリーの新規メンバーが、親和性プローブとしての組換えＯＰＧ－Ｆｃ融合蛋白を用いてスクリーニングされたＣＯＳ細胞中に発現したマウスｃＤＮＡライブラリーから同定された。新しいポリペプチドは、長さが３１６アミノ酸であると予想される膜貫通ＯＰＧ結合性蛋白であり、アミノ末端細胞質領域、膜貫通領域、およびカルボキシ末端細胞外領域を有する。本発明のＯＰＧ結合性蛋白は、膜に結合している、または可溶性状態である。
【００１１】
本発明は、ＯＰＧ結合性蛋白をコードする核酸、ポリペプチドを発現するベクターおよび宿主細胞、ならびに組換えＯＰＧ結合性蛋白を製造するための方法を提供する。ＯＰＧ結合性蛋白に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントも提供される。
【００１２】
ＯＰＧ結合性蛋白は、生物学的サンプルにおけるＯＰＧ水準を定量し、ＯＰＧ結合性蛋白を示す細胞および組織を同定し、新しいＯＰＧおよびＯＰＧ結合性蛋白ファミリーメンバーを同定するためのアッセイにおいて用いることができる。ＯＰＧ結合性蛋白と相互作用する化合物を同定する方法も提供される。そのような化合物は、核酸、ペプチド、蛋白、炭水化物、脂質または低分子量有機分子を含み、ＯＰＧ結合性蛋白活性の作用薬または拮抗薬のいずれかとして作用することができる。
【００１３】
ＯＰＧ結合性蛋白は破骨細胞分化に関連し、破骨細胞活性の水準は骨の再吸収を調整する。ＯＰＧ結合性蛋白作用薬および拮抗薬は、破骨細胞形成および骨再吸収を調整し、骨粗鬆症、高カルシウム血症、関節炎転移による骨損失、固定化または歯周病、ページェット病、骨化石症、補綴ゆるみ等のような骨再吸収性の変化を特徴とする骨疾患の治療に用いることができる。ＯＰＧ結合性蛋白およびＯＰＧ結合性蛋白作用薬および拮抗薬を含む薬剤組成物も、本発明の範囲に入る。
【００１４】
ＯＰＧ結合性蛋白のための受容体も、蛍光標識ＯＰＧ結合性蛋白に結合する骨髄細胞から構成されるマウスｃＤＮＡライブラリーから同定された。骨疾患の治療に用いることのできる受容体とのＯＰＧ結合性蛋白相互作用の作用薬および拮抗薬を同定するために、受容体を用いることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１Ａ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。
【図１Ｂ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。
【図１Ｃ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。
【図１Ｄ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。
【図１Ｅ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。

【図１Ｆ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。
【図１Ｇ】ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３挿入部の構造および配列を示す図。アスパラギン結合炭水化物鎖について予想される膜内外領域および部位にアンダーラインを付す。
【図２Ａ】ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３でトランスフェクトしたＣＯＳ－７細胞内でのＯＰＧ結合性蛋白発現。細胞に、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３　ＤＮＡを脂質移入し、ヤギ抗ヒトＩｇＧ１アルカリホスファターゼ結合（２次のみ）、ヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ＋２次（ＯＰＧ－Ｆｃ）またはキメラＡＴＡＲ細胞外領域－Ｆｃ融合蛋白（ｓＡＴＡＲ－Ｆｃ）への結合について検定した。ＡＴＡＲは、ＴＮＦＲスーパーファミリーの新しいメンバーであり、ｓＡＴＡＲ－Ｆｃ融合蛋白は、３２Ｄ細胞表面分子へのヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域の結合及び一般的なＴＮＦＲ関連蛋白質の両方への対照として作用する。
【図２Ｂ】ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３でトランスフェクトしたＣＯＳ－７細胞内でのＯＰＧ結合性蛋白発現。細胞に、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３　ＤＮＡを脂質移入し、ヤギ抗ヒトＩｇＧ１アルカリホスファターゼ結合（２次のみ）、ヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ＋２次（ＯＰＧ－Ｆｃ）またはキメラＡＴＡＲ細胞外領域－Ｆｃ融合蛋白（ｓＡＴＡＲ－Ｆｃ）への結合について検定した。ＡＴＡＲは、ＴＮＦＲスーパーファミリーの新しいメンバーであり、ｓＡＴＡＲ－Ｆｃ融合蛋白は、３２Ｄ細胞表面分子へのヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域の結合及び一般的なＴＮＦＲ関連蛋白質の両方への対照として作用する。
【図２Ｃ】ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３でトランスフェクトしたＣＯＳ－７細胞内でのＯＰＧ結合性蛋白発現。細胞に、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３　ＤＮＡを脂質移入し、ヤギ抗ヒトＩｇＧ１アルカリホスファターゼ結合（２次のみ）、ヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ＋２次（ＯＰＧ－Ｆｃ）またはキメラＡＴＡＲ細胞外領域－Ｆｃ融合蛋白（ｓＡＴＡＲ－Ｆｃ）への結合について検定した。ＡＴＡＲは、ＴＮＦＲスーパーファミリーの新しいメンバーであり、ｓＡＴＡＲ－Ｆｃ融合蛋白は、３２Ｄ細胞表面分子へのヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域の結合及び一般的なＴＮＦＲ関連蛋白質の両方への対照として作用する。
【図３】ヒト組織におけるＯＰＧ結合性蛋白の発現。放射標識３２Ｄ－Ｆ３誘導ハイブリッドプローブを用いるヒト組織ｍＲＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ製）のノーザンブロット分析。相対的分子量を、左側にキロ塩基対（ｋｂ）で示す。右側の矢印頭は、リンパ節ｍＲＮＡで検出された約２．５ｋｂ転写物の移動を示す。同じ分子量のかなり薄いバンドも胎児肝臓で検出される。
【図４Ａ】ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするｐｃＤＮＡ／ｈｕ　ＯＰＧｂｐ１．１挿入部の構造および配列。アスパラギン結合炭水化物鎖についての予想される膜貫通領域および部位にアンダーラインを付す。
【図４Ｂ】ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするｐｃＤＮＡ／ｈｕ　ＯＰＧｂｐ１．１挿入部の構造および配列。アスパラギン結合炭水化物鎖についての予想される膜貫通領域および部位にアンダーラインを付す。
【図４Ｃ】ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするｐｃＤＮＡ／ｈｕ　ＯＰＧｂｐ１．１挿入部の構造および配列。アスパラギン結合炭水化物鎖についての予想される膜貫通領域および部位にアンダーラインを付す。
【図４Ｄ】ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするｐｃＤＮＡ／ｈｕ　ＯＰＧｂｐ１．１挿入部の構造および配列。アスパラギン結合炭水化物鎖についての予想される膜貫通領域および部位にアンダーラインを付す。
【図４Ｅ】ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするｐｃＤＮＡ／ｈｕ　ＯＰＧｂｐ１．１挿入部の構造および配列。アスパラギン結合炭水化物鎖についての予想される膜貫通領域および部位にアンダーラインを付す。
【図４Ｆ】ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするｐｃＤＮＡ／ｈｕ　ＯＰＧｂｐ１．１挿入部の構造および配列。アスパラギン結合炭水化物鎖についての予想される膜貫通領域および部位にアンダーラインを付す。

【図５】組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］で処理したＳＴ２細胞共培養および骨髄マクロファージからのｉｎ　ｖｉｔｒｏ破骨細胞発達の刺激。培養を、１．６～５００ｎｇ／ｍｌの種々の濃度のマウスＯＰＧ結合性蛋白で処理した。８～１０日後、培養を溶解し、ＴＲＡＰ活性を溶液アッセイにより測定した。さらに、一部の培養を、１、１０、１００、５００および１０００ｎｇ／ｍｌの組換えマウスＯＰＧ［２２－４０１］－Ｆｃ蛋白で同時に処理した。マウスＯＰＧ結合性蛋白は、破骨成形において投与量依存的刺激を誘発し、ＯＰＧ［２２－４０１］－Ｆｃは破骨形成を抑制する。

【図６】Ｍ－ＣＳＦおよびマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の存在下におけるｉｎ　ｖｉｔｒｏ骨髄前駆体からの破骨細胞発達の刺激。マウス骨髄を収穫し、２５０、５００、１０００および２０００Ｕ／ｍｌのＭ－ＣＳＦの存在下において培養した。１．６～５００ｎｇ／ｍｌの種々の濃度のＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］をこれらの同じ培地に添加した。破骨細胞の発達を、ＴＲＡＰ溶液アッセイにより測定した。

【図７Ａ】Ｍ－ＣＳＦおよびＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の両方の存在下において骨髄細胞から誘導される破骨細胞が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで骨を再吸収する。Ｍ－ＣＳＦ、ＯＰＧ結合性蛋白、または両方の因子の組み合わせにより処理された骨髄細胞を、培養ウエルの骨スライス上に載せ、成熟破骨細胞にまで発達させた。次に、得られる培養を、トルイジン・ブルーで染色（左欄）、または組織化学的に染色してＴＲＡＰ酵素活性を検出した（右欄）。両方の因子を受け入れた培養においては、骨表面上の青色染色ピットにより判断されるように骨を腐食させることのできる成熟破骨細胞が形成された。これは、複数の大きな多核のＴＲＡＰ陽性細胞の存在に関連していた。

【図７Ｂ】Ｍ－ＣＳＦおよびＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の両方の存在下において骨髄細胞から誘導される破骨細胞が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで骨を再吸収する。Ｍ－ＣＳＦ、ＯＰＧ結合性蛋白、または両方の因子の組み合わせにより処理された骨髄細胞を、培養ウエルの骨スライス上に載せ、成熟破骨細胞にまで発達させた。次に、得られる培養を、トルイジン・ブルーで染色（左欄）、または組織化学的に染色してＴＲＡＰ酵素活性を検出した（右欄）。両方の因子を受け入れた培養においては、骨表面上の青色染色ピットにより判断されるように骨を腐食させることのできる成熟破骨細胞が形成された。これは、複数の大きな多核のＴＲＡＰ陽性細胞の存在に関連していた。

【図７Ｃ】Ｍ－ＣＳＦおよびＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の両方の存在下において骨髄細胞から誘導される破骨細胞が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで骨を再吸収する。Ｍ－ＣＳＦ、ＯＰＧ結合性蛋白、または両方の因子の組み合わせにより処理された骨髄細胞を、培養ウエルの骨スライス上に載せ、成熟破骨細胞にまで発達させた。次に、得られる培養を、トルイジン・ブルーで染色（左欄）、または組織化学的に染色してＴＲＡＰ酵素活性を検出した（右欄）。両方の因子を受け入れた培養においては、骨表面上の青色染色ピットにより判断されるように骨を腐食させることのできる成熟破骨細胞が形成された。これは、複数の大きな多核のＴＲＡＰ陽性細胞の存在に関連していた。

【図８】ＯＰＧ結合性蛋白を注射したマウスからの最初の注射から５１時間後の、および平行してＯＰＧ投与も受けたマウスにおける、全血イオン化カルシウム（ｉＣａ）の水準を示すグラフ。ＯＰＧ結合性蛋白は、ｉＣａ水準を大きくかつ投与量依存的に増加させた。ＯＰＧ（１ｍｇ／ｋｇ／日）は、５ｕｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白の投与量においてｉＣａの増加を完全に遮断し、２５ｕｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白の投与量においてその増加を部分的に遮断した。（＊）、ビヒクル処理対照と異なる（ｐ＜０．０５）。（＃）、ＯＰＧ処理ｉＣａ水準が、その投与量のＯＰＧ結合性蛋白のみを受けたマウスにおける水準と有意に異なる（ｐ＜０．０５）。

【図９Ａ】０、５、２５または１００μｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白で３．５日間処理されたマウスにおける左側の大腿骨およびけい骨のラジオグラフ。骨密度が投与量に従って低下し、これらのマウスの近位けい骨骨幹端で最も明らかであり、１００μｇ／日の投与量で最も著しい。

【図９Ｂ】０、５、２５または１００μｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白で３．５日間処理されたマウスにおける左側の大腿骨およびけい骨のラジオグラフ。骨密度が投与量に従って低

下し、これらのマウスの近位けい骨骨幹端で最も明らかであり、１００μｇ／日の投与量で最も著しい。
【図９Ｃ】０、５、２５または１００μｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白で３．５日間処理されたマウスにおける左側の大腿骨およびけい骨のラジオグラフ。骨密度が投与量に従って低下し、これらのマウスの近位けい骨骨幹端で最も明らかであり、１００μｇ／日の投与量で最も著しい。
【図９Ｄ】０、５、２５または１００μｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白で３．５日間処理されたマウスにおける左側の大腿骨およびけい骨のラジオグラフ。骨密度が投与量に従って低下し、これらのマウスの近位けい骨骨幹端で最も明らかであり、１００μｇ／日の投与量で最も著しい。
【図１０Ａ】マウスＯＤＡＲ　ｃＤＮＡ配列および蛋白配列。～２．１ｋｂのｃＤＮＡクローンの核酸配列が示され、６２５残基長のオープンリーディングフレームが上に示されている。疎水性シグナルペプチドにアンダーラインが付され、疎水性膜貫通配列（残基２１４～２３４）が太字で示される。細胞外領域にシステインに富む繰り返しモチーフを含むシステイン残基を太字で示す。
【図１０Ｂ】マウスＯＤＡＲ　ｃＤＮＡ配列および蛋白配列。～２．１ｋｂのｃＤＮＡクローンの核酸配列が示され、６２５残基長のオープンリーディングフレームが上に示されている。疎水性シグナルペプチドにアンダーラインが付され、疎水性膜貫通配列（残基２１４～２３４）が太字で示される。細胞外領域にシステインに富む繰り返しモチーフを含むシステイン残基を太字で示す。
【図１０Ｃ】マウスＯＤＡＲ　ｃＤＮＡ配列および蛋白配列。～２．１ｋｂのｃＤＮＡクローンの核酸配列が示され、６２５残基長のオープンリーディングフレームが上に示されている。疎水性シグナルペプチドにアンダーラインが付され、疎水性膜貫通配列（残基２１４～２３４）が太字で示される。細胞外領域にシステインに富む繰り返しモチーフを含むシステイン残基を太字で示す。
【図１０Ｄ】マウスＯＤＡＲ　ｃＤＮＡ配列および蛋白配列。～２．１ｋｂのｃＤＮＡクローンの核酸配列が示され、６２５残基長のオープンリーディングフレームが上に示されている。疎水性シグナルペプチドにアンダーラインが付され、疎水性膜貫通配列（残基２１４～２３４）が太字で示される。細胞外領域にシステインに富む繰り返しモチーフを含むシステイン残基を太字で示す。
【図１０Ｅ】マウスＯＤＡＲ　ｃＤＮＡ配列および蛋白配列。～２．１ｋｂのｃＤＮＡクローンの核酸配列が示され、６２５残基長のオープンリーディングフレームが上に示されている。疎水性シグナルペプチドにアンダーラインが付され、疎水性膜貫通配列（残基２１４～２３４）が太字で示される。細胞外領域にシステインに富む繰り返しモチーフを含むシステイン残基を太字で示す。
【図１０Ｆ】マウスＯＤＡＲ　ｃＤＮＡ配列および蛋白配列。～２．１ｋｂのｃＤＮＡクローンの核酸配列が示され、６２５残基長のオープンリーディングフレームが上に示されている。疎水性シグナルペプチドにアンダーラインが付され、疎水性膜貫通配列（残基２１４～２３４）が太字で示される。細胞外領域にシステインに富む繰り返しモチーフを含むシステイン残基を太字で示す。
【図１１Ａ】ＯＰＧ結合性蛋白トランスフェクト細胞へのＯＤＡＲ－Ｆｃ結合の免疫蛍光染色。ＯＰＧ結合性蛋白発現プラスミドをトランスフェクトされたＣＯＳ－７細胞を、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（最上パネル）、ＯＤＡＲ－Ｆｃ（中パネル）またはＯＰＧ－Ｆｃ（底パネル）と共にインキュベートした。ＦＩＴＣ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体を２次抗体として用いた。陽性結合細胞を、共焦点顕微鏡検査により試験した。
【図１１Ｂ】ＯＰＧ結合性蛋白トランスフェクト細胞へのＯＤＡＲ－Ｆｃ結合の免疫蛍光染色。ＯＰＧ結合性蛋白発現プラスミドをトランスフェクトされたＣＯＳ－７細胞を、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（最上パネル）、ＯＤＡＲ－Ｆｃ（中パネル）またはＯＰＧ－Ｆｃ（底パネル）と共にインキュベートした。ＦＩＴＣ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体を２次抗体として用いた。陽性結合細胞を、共焦点顕微鏡検査により試験した。

【図１１Ｃ】ＯＰＧ結合性蛋白トランスフェクト細胞へのＯＤＡＲ－Ｆｃ結合の免疫蛍光染色。ＯＰＧ結合性蛋白発現プラスミドをトランスフェクトされたＣＯＳ－７細胞を、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（最上パネル）、ＯＤＡＲ－Ｆｃ（中パネル）またはＯＰＧ－Ｆｃ（底パネル）と共にインキュベートした。ＦＩＴＣ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体を２次抗体として用いた。陽性結合細胞を、共焦点顕微鏡検査により試験した。

【図１２Ａ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｂ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｃ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｄ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｅ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｆ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｇ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１２Ｈ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏマウス骨髄からの破骨細胞の生成へのＯＤＡＲ－Ｆｃの効果。マウス骨髄培地を実施例８のように達成し、ＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）およびＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）にさらした。１５００ｎｇ／ｍｌから６５ｎｇ／ｍｌに及ぶ種々の濃度のＯＤＡＲ－Ｆｃを添加した。破骨細胞形成を、培地中５日後に、ＴＲＡＰ細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。

【図１３】種々の投与量にてＯＤＡＲ－Ｆｃで４日間処理した後のマウスにおける骨鉱物密度。マウスに、毎日皮下注射により、リン酸塩緩衝塩水ビヒクルに溶解したＯＤＡＲ－Ｆｃを投与した。末梢定量的コンピューター補助断層撮影（ｐＱＣＴ）（ＸＣＴ－９６０Ｍ、Ｎｏｒｌａｎｄ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｔ　Ａｔｋｉｎｓｏｎ，ＷＩ）によりマウス近位けい骨骨幹端部で７０％ＥＴＯＨ中に固定された骨から鉱物密度を測

定した。骨の２つの０．５ｍｍ断面、けい骨からの近位端からの１．５ｍｍおよび２．０ｍｍを分析（ＸＭＩＣＥ５．２、Ｓｔｒａｔｅｃ、独国）して、骨幹端における合計骨鉱物密度を決めた。軟質組織の分離境界線を１５００として骨幹端の境界を決めた。ＯＤＡＲ－Ｆｃにより、近位けい骨骨幹端において骨鉱物密度が投与量依存的に大きく増加した。群ｎ＝４。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

発明の詳細な説明

本発明は、ＯＰＧに特異的に結合すると共に破骨細胞の分化に関連する、ＯＰＧ結合性蛋白と呼ばれるポリペプチドを提供する。マウス形態のポリペプチドをコードするｃＤＮＡが、マウス骨髄単球細胞系３２－Ｄから調製されるライブラリーから同定され、ＣＯＳ細胞内にトランスフェクトされた。トランスフェクタントを、ＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ融合ポリペプチドに結合する能力についてスクリーニングした（実施例１）。核酸配列により、ＯＰＧ結合性蛋白が、ＴＮＦファミリーの新規メンバーであり、ＡＧＰ－１、すなわち１９９６年６月７日付けの共有の同時係属中の米国出願Ｎｏ．０８／６６０，５６２に最も近く関係することが示された。（ＡＧＰ－１と同等でＴＲＡＩＬと記載されるポリペプチドが、Ｗｉｌｅｙら著，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ第３巻，６７３～６８２頁（１９９５年）に記載されている。）。ＯＰＧ結合性蛋白は、アミノ末端における細胞質領域、膜貫通領域、およびカルボキシ末端細胞外領域を有するＩＩ型膜貫通蛋白であると予想される（図１）。アミノ末端細胞質領域は、図１に示すように（配列番号２）、残基１～４８の周辺に及び、膜貫通領域は残基４９～６９の周辺に及び、細胞外領域は残基７０～３１６の周辺に及ぶ。膜結合性蛋白は、ＯＰＧに特異的に結合する（図２）。すなわち、ＯＰＧ結合性蛋白およびＯＰＧは、受容体－リガンド対の多くの特徴を共有するが、ＯＰＧ結合性蛋白のための他の天然産受容体が存在する可能性もある。

【００１７】

ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするＤＮＡクローンが、リンパ節ｃＤＮＡライブラリーから単離された。ヒト配列（図４）は、マウスの配列に相同する。精製された可溶性マウスＯＰＧ結合性蛋白は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで破骨細胞の形成を刺激し、ｉｎ　ｖｉｖｏで高カルシウム血症および骨吸収を誘発した。

【００１８】

ＯＰＧ結合性蛋白は、哺乳動物ＯＰＧ結合性蛋白、フラグメント、類似体またはその誘導体のアミノ酸配列を有すると共に、少なくとも結合ＯＰＧの活性を有するポリペプチドを意味する。好ましい態様において、ＯＰＧ結合性蛋白は、マウスまたはヒト起源である。もう１つの態様において、ＯＰＧ結合性蛋白は、１つの形状において、細胞質および膜内外領域から単離される単離細胞外領域を有する可溶性蛋白である。ＯＰＧ結合性蛋白は、破骨細胞分化に含まれ、骨吸収の速度および程度において破骨細胞形成を刺激し骨吸収を刺激することがわかった。

【００１９】

核酸

本発明は、ＯＰＧ結合性蛋白をコードする単離された核酸を提供する。ここで用いられる核酸と呼ばれる用語は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、全体的または部分的に合成のＤＮＡ、およびＲＮＡを含む。本発明の核酸は、下記の群から選択される：

ａ）図１（配列番号１）および図４（配列番号３）に示される核酸；

ｂ）図１（配列番号１）および図４（配列番号３）に示される核酸のポリペプチドコード領域にハイブリッド形成し；高過酷条件下に核酸へのハイブリッド形成を維持する核酸；

ｃ）核酸（ａ）または（ｂ）に変性する核酸。

【００２０】

核酸ハイブリッド形成は、一本鎖から核酸二本鎖を形成する第１のハイブリッド形成段階、およびその次の、所望の相同性を有する核酸二本鎖を選択的に維持するためのより過

酷な条件下に行われる第２のハイブリッド形成段階を含む多段プロセスを典型的に含む。第１のハイブリッド形成段階の条件は、第２のハイブリッド形成段階より緊縮度が高くなければ、通常重要ではない。通常、第２のハイブリッド形成は、高緊縮度の条件下に行われるが、ここで「高緊縮度」条件は、図１（配列番号２）および図４（配列番号４）に相当する相補ストランドの一部または全ての完全なハイブリッドの溶融温度（T_m）より約１２～２０℃低い温度および塩の条件を意味する。１つの態様において、「高緊縮度」条件は、約６５℃で約１Ｍ以下のＮａ＋条件を意味する。塩濃度、インキュベーションの温度および／または長さは、本発明によるハイブリッド形成核酸分子が得られるように、第１または第２のハイブリッド形成段階のいずれかにおいて変えてよいことがわかる。核酸のハイブリッド形成の条件および核酸ハイブリッドのT_mの計算が、Ｓａｍｂｒｏｏｋら著，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９年）に記載されている。

【００２１】

本発明の核酸は、図１（配列番号２）および図４（配列番号４）に示されるＯＰＧ結合性蛋白のポリペプチドコード領域の一部または全体にハイブリッド形成することができ；従って、そこに示す核酸配列の截形状態または延長状態であり得る。截形または延長核酸は、少なくとも結合ＯＰＧの特性を維持していれば、本発明の範囲に入る。１つの態様において、核酸は、少なくとも約１０個のアミノ酸のポリペプチドをコードする。もう１つの態様において、核酸は、少なくとも約２０個のアミノ酸のポリペプチドをコードする。さらにもう１つの態様において、核酸は、少なくとも約５０個のアミノ酸のポリペプチドをコードする。ハイブリッド形成核酸は、ＯＰＧ結合性蛋白コード領域の５’および／または３’に配置された非コード配列も含み得る。非コード配列は、プロモーター、エンハンサー領域、翻訳開始部位および翻訳停止部位等のようなＯＰＧ結合性蛋白の発現に関連する制御領域を含む。

【００２２】

好ましい態様において、本発明の核酸は、マウスまたはヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードする。核酸は、機能的膜貫通領域を欠く可溶性形態またはＯＰＧ結合性蛋白の膜結合形態をコードし得る。マウスＯＰＧ結合性蛋白の推定される膜貫通領域は、図１（配列番号１）に示すようなアミノ酸残基４９～６９を含む。ヒトＯＰＧ結合性蛋白についての予想される膜貫通領域は、図４（配列番号３）に示すようなアミノ酸残基４９～６９を含む。この領域内の疎水性アミノ酸残基を中性または親水性アミノ酸残基に置き換える置換は、膜結合を壊し、可溶性ＯＰＧ結合性蛋白が得られると予想される。さらに、膜貫通領域の一部または全ての欠失も、ＯＰＧ結合性蛋白の可溶性状態を生成すると予想される。図１（配列番号１）に示すようなアミノ酸残基７０～３１６、またはそのフラグメントおよび類似体をコードする核酸は、可溶性ＯＰＧ結合性蛋白を包含する。

【００２３】

可溶性ヒトＯＰＧ結合淡白の截形状態をコードする核酸も含まれる。可溶性状態は、図４（配列番号３）に示すような残基６９～３１７およびその截形体をふくむ。１つの態様において、Ｎ－末端截形体は、残基７０～３１７、７１～３１７、７２～３１７等からポリペプチドを発生させる。他の態様において、核酸は、残基６９～３１７を含む可溶性ＯＰＧｂｐ、およびＯＰＧｂｐ［１５８～３１７］まで、またはＯＰＧｂｐ［１６６～３１７］までのＮ－末端截形体を含む。

【００２４】

ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードする大腸菌菌株ＤＨ１０内のプラスミドｐｈｕＯＰＧｂｐ１．１が、１９９７年６月１３日にメリーランド州ロックヴィル在Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに受託番号９８４５７として寄託された。

【００２５】

本発明の核酸配列は、生物学的サンプル中のＯＰＧ結合性蛋白をコードする配列の検出

に用いることができる。特に、この配列は、関連するＯＰＧ結合性蛋白配列、特に他の種からの配列についてのｃＤＮＡおよびゲノムライブラリーをスクリーニングするために用いることができる。核酸は、アンチセンス技術によるＯＰＧ結合性蛋白の水準、または生体内遺伝子発現の調整のためにも有用である。ＯＰＧ結合性蛋白を発現するトランスジェニック動物の開発は、ポリペプチドの製造のため、および生体内での生物学的活性の研究のために有用である。

【００２６】

ベクターおよび宿主細胞

本発明の核酸は、生物学的活性ＯＰＧ結合性蛋白を発現するようにＤＮＡ配列と結合する。発現に必要な配列は当業者に知られており、ＲＮＡ合成の開始のためのプロモーターおよびエンハンサー、転写終了部位、蛋白合成の開始のためのリボソーム結合部位、および分泌のためのリーダー配列を含む。ＯＰＧ結合性蛋白の発現および分泌を導く配列は相同である、すなわち、配列は、ＯＰＧ結合性蛋白発現および分泌に関連するゲノム内の配列に同一または類似である、またはそれらは非相同である。宿主細胞中のＯＰＧ結合性蛋白を発現するために種々のプラスミドベクターが利用できる（例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５巻，Ｇｏｅｄｄｅｌ，Ｄ．Ｖ．編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９０年）を参照されたい）。哺乳動物宿主細胞中での発現のために、好ましい態様は、ＰＣＴ出願Ｎｏ．９０／１４３６３に記載のプラスミドｐＤＳＲαである。バクテリア宿主細胞中での発現のために、好ましい態様は、ラックス（ｌｕｘ）プロモーターを有するプラスミドを含む（１９９５年１２月２２日付けの共有の同時係属中の米国出願Ｎｏ．０８／５７７，７７８を参照されたい。）。さらに、ベタクーは、トランスジェニック動物中でのＯＰＧ結合性蛋白の組織特異的発現のために利用できる。レトロウイルスおよびアデノウイルス系遺伝子転移ベクターを、生体内治療のためにヒト細胞中でＯＰＧ結合性蛋白を発現させるために用いることができる（ＰＣＴ出願ＮＯ．８６／００９２２を参照）。

【００２７】

ＯＰＧ結合性蛋白を発現する原核生物および真核生物宿主細胞も本発明により提供される。宿主細胞は、バクテリア、酵母、植物、昆虫または哺乳動物細胞を含む。ＯＰＧ結合性蛋白は、マウスまたはヤギのようなトランスジェニック動物中において製造することもできる。本発明の核酸を含むプラスミドおよびベクターは、当業者に知られているトランスフェクションまたは形質転換技術を用いて適当な宿主細胞中に導入される。宿主細胞は、図１に示されるようにＯＰＧ結合性蛋白をコードするＤＮＡ配列、または細胞外領域もしくは細胞質領域のようなその蛋白を含むことができる。ＯＰＧ結合性蛋白をコードする核酸は、所定の宿主中で最適発現をさせるコドンの置換により変性することができる。少なくとも一部のコドンは、アミノ酸配列を変えず、高度に発現された遺伝子中で見つかることが多い所謂好ましいコドンであってよい。しかしながら、最適発現へのコドンの変化は、好ましいコドンの導入に限定されないことがわかる。ＯＰＧ結合性蛋白発現のために好ましい哺乳動物宿主細胞の例は、限定はされないが、ＣＯＳ，ＣＨＯｄ－、２９３および３Ｔ３細胞を含む。好ましいバクテリア宿主細胞は大腸菌である。

【００２８】

ポリペプチド

本発明は、外因性ＤＮＡ配列の原核細胞または真核細胞発現の生成物としてのＯＰＧ結合性蛋白も提供する、すなわち、ＯＰＧ結合性蛋白は組換えＯＰＧ結合性蛋白である。外因性ＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡおよび合成ＤＮＡ配列を含む。ＯＰＧ結合性蛋白は、バクテリア、酵母、植物、昆虫または哺乳動物細胞の発現の生成物、または細胞非含有転写系からの生成物であり得る。バクテリア細胞中で生成されるＯＰＧ結合性蛋白は、Ｎ－末端メチオニン残基を有する。本発明は、また、ＯＰＧ結合性蛋白をコードする核酸を用いて形質転換またはトランスフェクトした原核または真核宿主細胞を増殖させ、核酸のポリペプチド発現生成物を単離することを含んでなるＯＰＧ結合性蛋白を製造する方法も提供する。

【００２９】
哺乳動物ＯＰＧ結合性蛋白である、またはそのフラグメント、類似体もしくは誘導体であるポリペプチドは、本発明に包含される。好ましい態様において、ＯＰＧ結合性蛋白はヒトＯＰＧ結合性蛋白である。ＯＰＧ結合性蛋白のフラグメントは、得られるポリペプチドが少なくとも結合ＯＰＧの特性を有するように１または２以上のアミノ酸の欠失を有するポリペプチドを意味する。前記フラグメントは、ポリペプチドのアミノ末端、カルボキシ末端および内部領域から生じる欠失を含む。ＯＰＧ結合性蛋白のフラグメントは、少なくとも約１０個のアミノ酸、少なくとも約２０個のアミノ酸、または少なくとも約５０個のアミノ酸の長さである。好ましい態様において、ＯＰＧ結合性蛋白は、膜貫通領域からの１または２以上のアミノ酸の欠失（図１に示すアミノ酸残基４９～６９）、または膜貫通領域までのおよび／または膜貫通領域を含むアミノ末端からの１または２以上のアミノ酸を有する（図１に示すアミノ酸残基１～４９）。もう１つの態様において、ＯＰＧ結合性蛋白は、例えば、アミノ酸残基６９～３１６もしくは７０～３１６、またはそのＮ－末端もしくはＣ－末端截形体を含む、ＯＰＧ結合活性を保持する可溶性蛋白である。ＯＰＧ結合性蛋白は、図４に示す残基６９～３１７およびそのＮ－末端截形体、例えば、７０～５１７、７１～５１７、７１～３１７、７２～３１７など含む図４に示すヒト可溶性蛋白でもある。好ましい態様において、可溶性ヒトＯＰＧ結合性蛋白は、残基６９～３１７および、ＯＰＧｂｐ［１５８－３１７］までのあるいはＯＰＧ［１６６－３１７］までのそのＮ－末端截形体を含む。

【００３０】
ＯＰＧ結合性蛋白の類似体は、得られるポリペプチドが少なくとも結合ＯＰＧの特性を有するように１または２以上のアミノ酸の置換または付加を有するポリペプチドを意味する。前記類似体は、ポリペプチドに沿う任意の位置において置換または付加を有する。好ましい類似体は、可溶性ＯＰＧ結合性蛋白の類似体を含む。フラグメントまたは類似体は、対立変異体またはｍＲＮＡスプライス変異体のポリペプチド生成物のような天然産のものである、または、核酸を処理または合成するために当業者が利用できる技術を用いて構築することができる。ポリペプチドは、アミノ末端メチオニン残基を有するまたは有さなくてよい。

【００３１】
また、翻訳後変性（例えば、Ｎ－結合またはＯ－結合炭水化物鎖の付加、Ｎ－末端またはＣ－末端の加工）、アミノ酸主鎖への化学的分子の付加、Ｎ－結合またはＯ－結合炭水化物鎖の化学的変性、および原核宿主細胞発現の結果としてのＮ－末端メチオニン残基の付加を経たポリペプチドであるＯＰＧ結合性蛋白の誘導体も本発明に含まれる。特に、向上した安定性、より長い循環時間、または低下した免疫原性のような更なる利益を提供するＯＰＧ結合性蛋白の化学的変性誘導体が考えられる。ポリエチレングリコールおよびその誘導体のような水溶性ポリマーによる変性が特に有用である（例えば、米国特許Ｎｏ．４，１７９，３３７を参照）。誘導用の化学的分子は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストランおよびポリビニルアルコールなどのような水溶性ポリマーから選択することができる。ポリペプチドは、分子内の任意の位置において、または分子内の予め決められた位置において変性することができ、１、２、３またはそれ以上の付加された化学的分子を含むことができる。ポリペプチドは、また、アミノ末端のようなポリペプチド内の予め決められた位置において、またはポリペプチド内の選択されたリシンまたはアルギニン残基において変性することもできる。提供される他の化学的変性は、蛋白の検出および単離を可能にする酵素、蛍光、同位体または親和性標識のような検知可能標識を含む。

【００３２】
非相同性アミノ酸配列に融合したＯＰＧ結合性蛋白アミノ酸配列の一部または全てを含むＯＰＧ結合性蛋白キメラも含まれる。非相同性配列は、得られる融合蛋白に少なくとも結合ＯＰＧの活性を保持させる任意の配列であってよい。好ましい態様において、ＯＰＧ結合性蛋白のカルボキシ末端細胞外領域は非相同性配列に融合される。そのような配列は

、択一的に細胞内で信号を発生させる非相同性脂肪質領域、ＩｇＧのＦｃ領域のようなオリゴマー化を促進する配列、ポリペプチドのための標識を提供する酵素配列、および抗原－抗体認識のような親和性プローブを提供する配列を含む。

【００３３】

本発明のポリペプチドはＯＰＧ結合性蛋白を発現する組織および細胞系から単離および精製され、溶解産物からまたは調整された成長培地から、およびＯＰＧ結合性蛋白を発現する形質転換宿主細胞から抽出される。ＯＰＧ結合性蛋白は、マウス骨髄単球細胞系３２－Ｄ（ＡＴＣＣアクセス番号ＣＲＬ－１１３４６）から得ることができる。ヒトＯＰＧ結合性蛋白、またはそれをコードする核酸を、ヒトリンパ節または胎児肝臓組織から単離することができる。単離されたＯＰＧ結合性蛋白は、ヒト蛋白および他の細胞構成成分と結合されない。

【００３４】

天然原料（例えば、ＯＰＧ結合性蛋白を通常発現する組織および細胞系）およびトランスフェクトされた宿主細胞からＯＰＧ結合性蛋白を精製する方法も、本発明に含まれる。精製プロセスは、精製された蛋白を得るように１または２以上の標準的蛋白生成工程を適当な順番で用いることができる。クロマトグラフィー工程は、抗－ＯＰＧ結合性蛋白抗体またはビオチン－ストレプトアビジン親和性複合体等を用いるイオン交換、ゲル濾過、疎水性相互作用、逆相、等電点クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーを含むことができる。

【００３５】

抗体

本発明のポリペプチドを特異的に結合する抗体も、本発明に含まれる。抗体を、全長ＯＰＧ結合性蛋白、ＯＰＧ結合性蛋白の可溶性体、またはそのフラグメントを用いる免疫化により生成することができる。本発明の抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、または組換え抗体であってよく、例えば、軽および重鎖上のマウス一定領域がヒト配列により置換されたキメラ抗体、または相補的決定領域のみがマウス起源である、ＣＤＲが移植された抗体である。本発明の抗体は、例えば、ヒト抗体を生成することのできるトランスジェニック動物の免疫化により調製されるヒト抗体であってもよい（例えば、ＰＣＴ出願Ｎｏ．ＷＯ９３／１２２２７を参照）。抗体は、生物学的サンプル中においてＯＰＧ結合性蛋白を検出するのに有用であり、それにより、蛋白を生成する細胞または組織が同定される。さらに、ＯＰＧ結合性蛋白に結合すると共に他の結合化合物との相互作用を遮断する抗体が、破骨細胞分化および骨吸収の調整において治療的用途を有する。

【００３６】

ＯＰＧ結合性蛋白への抗体は、骨粗鬆症およびページェット病のような骨疾患の治療において有用となり得る。抗体は、ＯＰＧの不存在または存在下におけるＯＰＧ結合性蛋白への結合について試験することができ、リガンド（ＯＰＧ結合性蛋白）媒介破骨細胞発生および／または骨吸収を抑制するその性能について試験することができる。ペプチド自体がリガンド：受容体相互作用の拮抗薬として作用することができ、ＯＰＧ結合性蛋白のペプチドがこの目的のためにも開発されることも予想される。

【００３７】

組成物

本発明は、また、治療有効量の本発明のＯＰＧ結合性蛋白を、薬学的に許容できる希釈剤、キャリア、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および／またはアジュバントと一緒に含んでなる薬剤組成物も提供する。本発明は、また、治療有効量のＯＰＧ結合性蛋白作用薬または拮抗薬を含んでなる薬剤組成物も提供する。「治療有効量」という用語は、特定の症状および投与経路に対して治療効果を提供する量を意味する。組成物は液体または凍結乾燥状であってよく、種々のｐＨ値およびイオン強度を有する希釈剤（Ｔｒｉｓ、酢酸塩またはリン酸塩緩衝剤）、ＴｗｅｅｎまたはＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅのような可溶化剤、ヒト血清アルブミンまたはゼラチンのようなキャリア、チメロサールまたはベンジルアルコール

のような防腐剤、およびアスコルビン酸またはメタ亜硫酸水素ナトリウムのような酸化防止剤を含む。特定の組成の選択は、治療すべき症状、投与経路、および所望の薬物動態パラメーターを含む因子の数に依存する。薬剤組成物に適した成分のより詳しい概要をＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１８版，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ編，Ｍａｃｋ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ（１９８０年）に見ることができる。

【００３８】

好ましい態様において、可溶性ＯＰＧ結合性蛋白を含む組成物も提供される。溶解性、安定性、プラズマ半減期および生物学的利用性が増加するように水溶性ポリマーで変性された可溶性ＯＰＧ結合性蛋白を含む組成物も含まれる。組成物は、長期間に渡って分配を制御するためにリポソーム、ミクロ乳濁液、ミセルまたは小胞中への可溶性ＯＰＧ結合性蛋白の混入も含み得る。可溶性ＯＰＧ結合性蛋白は、肺投与に適したミクロ粒子中に配合することができる。

【００３９】

本発明の組成物は、皮下、静脈内または筋肉内の注射により、または経口、鼻腔、肺もしくは直腸投与により投与することができる。選択される投与経路は、多くの因子に依存し、当業者により確定され得る。

【００４０】

本発明は、治療有効量の本発明の核酸を、薬学的に許容できるアジュバントと一緒に含んでなる薬剤組成物も提供する。核酸組成物は、ＯＰＧ結合性蛋白のコード領域および／または側部領域の一部または全てを、アンチセンス治療領域の一部として細胞および組織に送達するのに適している。

【００４１】

使用方法

ＯＰＧ結合性蛋白は、ＯＰＧを検出し、ＯＰＧとの相互作用を特徴付けるための種々のアッセイにおいて用いることができる。通常、そのアッセイは、ＯＰＧをＯＧＰ結合性蛋白に結合させる条件下においてＯＰＧ結合性蛋白をＯＰＧを含む生物学的サンプルと共にインキュベートすること、および結合の程度を測定することを含む。ＯＰＧは精製される、または体液もしくは培地のような混合物中に存在してよい。定性的または定量的であるアッセイを開発することができ、ＯＰＧ結合性蛋白へのＯＰＧの結合パラメーター（親和定数および動態）を決めること、および混合物中における生物学的活性ＯＰＧの水準を定量することには後者が有用である。ＯＰＧ結合性蛋白のフラグメント、類似体および誘導体へのＯＰＧの結合を評価するため、および新しいＯＰＧおよびＯＰＧ結合性蛋白ファミリーメンバーを同定するためにアッセイを用いることもできる。

【００４２】

ＯＰＧ結合性蛋白へのＯＰＧの結合は、細胞ベース（ｃｅｌｌ－ｂａｓｅｄ）結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイおよび免疫アッセイを含む種々の方法で行うことができる。通常、微量の標識化ＯＰＧをＯＰＧ結合性蛋白サンプルと一緒に特定時間インキュベートして、続いて、濾過、電気化学発光（ＥＣＬ、ＯＲＩＧＥＮシステム、ＩＧＥＮ製）、細胞ベースまたは免疫アッセイにより結合ＯＰＧを測定する。放射活性（ＳＰＡ；Ａｍｅｒｓｈａｍ製）および時間分解蛍光（ｔｉｍｅ　ｒｅｓｏｌｖｅｄ　ｆｌｕｏｒｅｓｅｎｃｅ）（ＨＴＲＦ、Ｐａｃｋａｒｄ製）についての相同性アッセイ技術も実施することができる。結合は、放射性同位体（１２５Ｉ、３５Ｓ、３Ｈ）、蛍光染料（フルオレセイン）、ランタニド（Ｅｕ３＋）キレートまたはクリプタート、球状ピリジル－ルテニウム（Ｒｕ２＋）錯体によりＯＰＧまたは抗ＯＰＧ抗体を標識することにより検出される。標識化プローブの選択が用いられるシステムの検出に依存することが理解される。また、ＯＰＧを非標識化エピトープタグ（例えば、ビオチン、ペプチド、His_6、ｍｙｃ）で変性し、前述のような検出可能な標識を有するストレプトアビジン、抗ペプチドまたは抗蛋白抗体のような蛋白に結合させることができる。

【００４３】

別の方法において、ＯＰＧ結合性蛋白を、免疫アッセイにおいてＯＰＧ結合性蛋白へのポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いて直接アッセイすることができる。前述のようなエピトープタグを含むＯＰＧ結合性蛋白のさらなる形状を、溶液および免疫アッセイにおいて用いることができる。

【００４４】

ＯＰＧ結合性蛋白と相互作用する化合物を同定する方法も、本発明に含まれる。この方法は、ＯＰＧ結合性蛋白を化合物と一緒にその化合物をＯＰＧ結合性蛋白に結合させる条件下にインキュベートし、結合の程度を測定することを含む。化合物は実質的に精製される、または粗混合物中に存在する。結合性化合物は核酸、蛋白、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量有機化合物であってよい。化合物は、作用薬として作用するか拮抗薬として作用するかを決めるために、ＯＰＧ結合性蛋白活性を増加または減少させる性能によりさらに特徴付けられる。

【００４５】

ＯＰＧ結合性蛋白は、酵母２ハイブリッドスクリーニングプロセスにより細胞質領域と相互作用する細胞内蛋白の同定にも有用である。例えば、酵母ＧＡＬ４－ＤＮＡ結合領域に融合しているＯＰＧ結合性蛋白のＮ－末端５０アミノ酸をコードするＤＮＡを含むハイブリッド構造体を、２ハイブリッドおとり（ｂａｉｔ）プラスミドとして用いることができる。このスクリーニングから出てくる陽性クローンを、相互作用蛋白を同定するためにさらに特徴付けることができる。この情報は、ＯＰＧ結合性蛋白に係わる細胞内信号発生機構を解明し、骨吸収を調整する新しい薬剤用の細胞内標的を提供するのに役立つ。

【００４６】

ＯＰＧ結合性蛋白を、過剰の骨密度により特徴付けられる症状の治療ために用いることができる。最も一般的症状は、遺伝的欠陥により骨質量が増加し、通常は生後数年以内に死に至る骨化石症である。骨化石症は、好ましくは、可溶性ＯＰＧ結合性蛋白の投与により治療される。

【００４７】

本発明は、ＯＰＧ結合性蛋白の調整剤（ｍｏｄｕｌａｔｏｒ）（作用薬および拮抗薬）およびそれを得るための方法も含む。ＯＰＧ結合性蛋白調整剤は、ＯＰＧもしくは幾つかの他の相互作用分子を結合するまたは破骨細胞成熟を調節する性能のようなＯＰＧ結合性蛋白に係わる少なくとも１つの活性を低下または上昇させることができる。典型的には、作用薬または拮抗薬は、ＯＧ結合性蛋白と相互作用してその活性を調節する蛋白、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子のような共因子であり得る。潜在的ポリペプチド拮抗薬は、可溶性または膜結合状態のＯＰＧ結合性蛋白、およびＯＰＧ結合性蛋白の細胞外領域の一部もしくは全部を含む可溶性形態のＯＰＧ結合性蛋白と反応する抗体を含む。ＯＰＧ結合性蛋白発現を調節する分子は、典型的に、ＯＰＧ結合性蛋白をコードする核酸に相補的であり発現のアンチセンス調節剤として作用する核酸を含む。

【００４８】

ＯＰＧ結合性蛋白は、成熟破骨細胞、すなわち骨吸収に関与する一次細胞型の形成の制御に関連する。（骨形成の速度を超える）骨吸収の速度の増加は、オステオペニアと総括的に呼ばれ、骨粗鬆症、骨髄炎、高カルシウム血症、手術またはステロイド投与により引き起こされるオステオペニア、ページェット病、骨壊死、リューマチ性関節炎による骨損失、歯周骨損失、固定化、補綴ゆるみ、および骨融解性転移を含む種々の骨疾患を導き得る。逆に、骨吸収速度の減少は、骨化石症、すなわち過剰骨密度により示される症状を導き得る。ＯＰＧ結合性蛋白の作用薬および拮抗薬は、破骨細胞形成を調整し、骨疾患を患っている患者に投与することができる。オステオペニアを治療するために用いられるＯＰＧ結合性蛋白の作用薬および拮抗薬は、単独で、またはＢＭＰ－１～ＢＭＰ－１２と表される骨形態形成因子、形質転換成長因子－βおよびＴＧＦ－βファミリーメンバー、骨芽細胞成長因子ＦＧＦ－１～ＦＧＦ－１０、インターロイキン－１抑制剤、ＴＮＦα抑制剤、副甲状腺ホルモン、Ｅ型プロスタグランジン、ビスホスホネート、およびフッ化物およびカルシウムのような骨向上性鉱物を含む骨成長促進剤の治療有効量と組み合わせて投与

することができる。ＯＰＧ結合性蛋白の拮抗薬は、オステオペニアの治療に特に有用である。

【００４９】

オステオプロテゲリン結合性蛋白の受容体

本発明は、ＯＰＧ結合性蛋白と相互作用する受容体も提供する。より詳しくは、本発明は、破骨細胞分化および活性化受容体（ＯＤＡＲ）を提供する。ＯＤＡＲは、ＴＮＦ受容体ファミリーメンバーであるＣＤ４０に最も高度の類似性を示す膜貫通ポリペプチドである。マウスＯＤＡＲの核酸配列およびコードされたポリペプチドを図１０に示す。マウスＯＤＡＲのヒト類似体は、図１０の核酸配列を有するゲノムライブラリーまたはヒトｃＤＮＡのハイブリッド形成スクリーニングにより容易に単離することができる。ヒトＯＤＡＲをクローニングする手順は、ヒトＯＰＧ結合性蛋白をクローニングするための実施例５に記載の手順に類似している。図１０に示すポリペプチドのヒト類似体はＡｎｄｅｒｓｏｎらの文献（Ｎａｔｕｒｅ　３９０巻，１７５～１７９頁（１９９７年））に見られ、そこでＲＡＮＫと呼ばれている。ＲＡＮＫは、ＴＮＦ受容体ファミリーメンバーへの類似性を有するＩ型膜貫通蛋白として特徴付けられ、樹枝状細胞機能に含まれる。

【００５０】

ＯＤＡＲとＯＰＧ結合性蛋白との相互作用の証拠が実施例１３に示される。可溶性形態のＯＤＡＲ（ＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白）は、生体外での破骨細胞の成熟を防止し（図１２）、皮下注射後に正常マウスの骨密度を増加させる（図１３）。結果は、破骨細胞成熟を促進するようにＯＤＡＲと相互作用し活性化するＯＰＧ結合性蛋白と一致する。

【００５１】

破骨細胞発達、および骨吸収の速度および程度は、ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの相互作用により調節される。ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの相互作用を低下または遮断する化合物は、ＯＰＧ結合性蛋白活性の潜在的拮抗薬であり、破骨細胞の発達を妨げて骨吸収を低下させる。また、ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの相互作用を増加させる化合物は、破骨細胞の発達を促進し骨吸収を増加させる潜在的作用薬である。

【００５２】

精製された蛋白を用いる生体外でのＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの相互作用を測定するために、種々のアッセイを用いることができる。これらのアッセイは、ＯＰＧ結合性蛋白によるＯＤＡＲへの結合の速度または程度を低下または増加させる性能について化合物をスクリーニングするのに用いることができる。１つのタイプのアッセイにおいて、ＯＤＡＲ蛋白を、微量定量プレートのウエルの底部に結合させることにより固定化することができる。次に、放射線標識化ＯＰＧ結合性蛋白（例えば、ヨウ素化ＯＰＧ結合性蛋白）および試験化合物を、それぞれ一度に（いずれかの順番で）または同時にウエルに添加することができる。インキュベーション後、ウエルを洗浄し、放射活性についてシンチレーションカウンターを用いてカウントして、試験化合物の存在下におけるＯＰＧ結合性蛋白によるＯＤＡＲへの結合の程度を決めることができる。典型的に、この化合物は、正確に結果を評価するために、ある範囲の濃度において試験され、試験アッセイの１または２以上の要素を欠く一連の対照ウエルを用いることができる。この方法の別の態様は、蛋白の「位置」を逆転させること、すなわち微量定量プレートウエルにＯＰＧ結合性蛋白を固定化し、試験化合物および放射線標識化ＯＤＡＲと一緒にインキュベートし、ＯＤＡＲ結合の程度を決めることを含む（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙの１８章，Ａｕｓｕｂｅｌら編，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＮＹ［１９９５年］を参照されたい。）。

【００５３】

放射線標識化の別の態様とし、ＯＰＧ結合性蛋白またはＯＤＡＲをビオチンに共役させ、次にビオチン化蛋白の存在を、色識別またはストレプトアビジンの蛍光標識により検出することができるワサビ過酸化酵素［ＨＲＰ］またはアルカリホスファターゼ［ＡＰ］のような酵素に結合したストレプトアビジンを用いて検出することができる。ビオチンに結合しているＯＰＧ結合性蛋白またはＯＤＡＲに対する抗体も用いることができ、ＡＰまた

はＨＲＰに結合している酵素結合ストレプトアビジンとインキュベーションした後に検出することができる。

【００５４】

ＯＰＧ結合性蛋白およびＯＤＡＲは、アガロースビーズ、アクリルビーズまたは、不活性基質のような他のタイプの化合物に結合させることにより固定化することもできる。基質－蛋白複合体は、相補蛋白および試験化合物を含む溶液中に入れることができ；インキュベーション後、ビーズを遠心分離により沈殿させることができ、ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの間の結合の量を前述の方法を用いて検定することができる。また、基質－蛋白複合体は、カラム内で固定化することができ、試験分子および相補蛋白がカラムを通される。次に、ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの間の複合体の形成を、前述の任意の技術、すなわち、放射性標識、抗体結合などを用いて検定することができる。

【００５５】

ＯＤＡＲ／ＯＰＧ結合性蛋白複合体の形成を低下または増加させる化合物を同定するのに有用なもう１つのタイプのｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイは、Ｂｉａｃｏｒｅアッセイシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）のような表面プラズモン共鳴検出器システムである。Ｂｉａｃｒｅシステムは、製造者のプロトコールを用いて実施することができる。このアッセイは、実質的に、検出器中に配されたデキストラン被覆センセーチップへのＯＰＧ結合性蛋白またはＯＤＡＲの共有結合を含む。次に、試験化合物および他の相補蛋白を、センサーチップを含むチャンバー内に、同時にまたは連続的に注入することができ、結合している相補蛋白の量を、センサーチップのデキストラン被覆側に物理的に結合している分子の質量の変化に基づき検定することができ、分子の質量の変化を検出器システムにより測定することができる。

【００５６】

ある場合には、ＯＤＡＲ／ＯＰＧ結合性蛋白複合体の形成の低下または増加において用いるために２つ以上の試験化合物を一緒に評価することが望ましい。これらの場合において、前述のアッセイは、そのような試験化合物を、第１の試験化合物と同時にまたは第１の試験化合物に続いて添加することにより容易に変性することができる。アッセイ中の残りの工程は前述した通りである。

【００５７】

前述したようなｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイは、ＯＤＡＲおよびＯＰＧ結合性蛋白による複合体形成への効果について多くの化合物を迅速にスクリーニングするのに有利に用いることができる。このアッセイは、ファージ表示、合成ペプチドおよび化学的合成ライブラリーにおいて発生する化合物をスクリーニングするように自動化することができる。

【００５８】

ＯＰＧ結合性蛋白およびＯＤＡＲの複合体形成を低下または増加させる化合物は、ＯＤＡＲ保持細胞および細胞系を用いて細胞培地中でスクリーニングすることもできる。細胞および細胞系は任意の動物から得ることができるが、好ましくはヒトまたは他の霊長類、イヌまたはげっ歯類から得られる。破骨細胞のようなＯＤＡＲ保持細胞は、公的に利用できる手順を用いる親和クロマトグラフィーにより他の細胞型から増やすことができる。ＯＤＡＲ含有細胞へのＯＰＧ結合性蛋白の結合は、試験化合物の存在または不存在下に評価され、結合の程度は、例えば、ＯＰＧ結合性蛋白へのビオチン化抗体を用いるフローサイトメトリーにより決めることができる。また、マウスまたはヒト破骨細胞培養を、実施例８に記載のように作ることができ、試験化合物を、ＣＳＦ－１およびＯＰＧ結合性蛋白の添加により刺激される破骨細胞成熟を遮断する性能について評価することができる。細胞培養アッセイは、前記の結合性蛋白アッセイにおいて陽性となる化合物をさらに評価するのに、有利に使用しうる。

【００５９】

ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの相互作用を増加または低下させる化合物は、マウスに化合物を投与し、続いて骨走査密度測定または放射線法を用いて骨密度を測定することにより評価することもできる。骨密度を測定する手順が、ＰＣＴ出願ＷＯ９７／２３６１４

及び実施例１３に記載されている。

【００６０】

本発明は、ＯＰＧ結合性蛋白とＯＤＡＲとの相互作用を低下または遮断するもので、破骨細胞形成の拮抗薬である化合物を提供する。そのような化合物は、通常、２つの群に分けられる。１つの群は、ＯＰＧ結合性蛋白から誘導されるまたはＯＰＧ結合性蛋白と相互作用する化合物を含む。これらは、先に記載されている。第２の群は、ＯＤＡＲから誘導されるまたはＯＤＡＲと相互作用する化合物を含む。ＯＤＡＲの拮抗薬である化合物の例は、核酸、蛋白、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量有機化合物を含む。

【００６１】

拮抗薬またはＯＤＡＲは、ＯＤＡＲ細胞外領域においてＯＰＧ　ｂｐのための１または２以上の結合部位においてまたはその近くに結合し、複合体形成を低下させるまたは完全に遮断する化合物であり得る。ＯＰＧ結合性蛋白との複合体形成に含まれるＯＤＡＲ上のこれらの領域は、Ｂａｎｎｅｒらの文献（Ｃｅｌｌ　第７３巻，４３１～４４５頁（１９９３年））記載されている相同性ＴＮＦβ／ＴＮＦ－Ｒ５５複合体の構造との類似性により同定することができる。例えば、ＴＮＦβ／ＴＮＦ－Ｒ５５複合体の構造を用いて、複合体形成に含まれるＯＰＧ結合性蛋白およびＯＤＡＲの領域を同定することができる。次に、複合体形成に含まれる領域に選択的に結合し拮抗薬として作用する化合物を設計することができる。実施例１１に示す１つの手法において、拮抗薬として作用するＯＰＧ結合性蛋白への抗体の増加に用いられるようにペプチド抗原を設計した。これらの抗体は、ＯＰＧ結合性蛋白に結合し、ＯＤＡＲとの複合体形成を遮断することが予想される。同様の方法において、ＯＤＡＲ構造に基づくペプチド抗原を用いて、拮抗薬として作用する抗ＯＤＡＲ抗体を増加させることができる。

【００６２】

ＯＤＡＲの拮抗薬は、ＯＰＧ　ｂｐのための結合部位から離れた位置においてＯＤＡＲに結合し、ＯＤＡＲポリペプチドの構造変化を誘発することができ、それにより、ＯＰＧ結合性蛋白との複合体形成が低下または非産生的になる。

【００６３】

１つの態様において、機能的膜貫通領域を欠く可溶性状態のＯＤＡＲである。可溶性状態のＯＤＡＲは、膜貫通領域に１または２以上のアミノ酸からなる欠失を有し得る（図１０に示すアミノ酸２１４～２３４）。可溶性ＯＤＡＲポリペプチドは、細胞外領域の一部または全部を有することができ、ＯＰＧ結合性蛋白を結合することができる。任意に、可溶性ＯＤＡＲは、ＯＤＡＲの細胞外領域の一部または全部が非相同アミノ酸配列に融合しているキメラ蛋白の一部であってよい。１つの態様において、非相同アミノ酸配列は、ヒトＩｇＧからのＦｃ領域である。

【００６４】

骨粗鬆症、骨髄炎、悪性の高カルシウム血症、手術またはステロイド投与により引き起こされるオステオペニア、ページェット病、骨壊死、リューマチ性関節炎による骨損失、歯周骨損失、固定化、補綴ゆるみ、および骨融解性転移を含む含むオステオペニアの予防または治療のためにＯＤＡＲの調整剤（作用薬および拮抗薬）を用いることができる。オステオペニアの治療のために用いられるＯＤＡＲの作用薬および拮抗薬は、単独で、または、ＢＭＰ－１～ＢＭＰ－１２と表される骨形態形成因子、形質転換成長因子－βおよびＴＧＦ－βファミリーメンバー、骨芽細胞成長因子ＦＧＦ－１～ＦＧＦ－１０、インターロイキン－１抑制剤、ＴＮＦα抑制剤、副甲状腺ホルモン、Ｅ型プロスタグランジン、ビスホスホネート、エストロゲン、ＳＥＲＭ、およびフッ化物およびカルシウムのような骨向上性鉱物を含む骨成長促進剤の治療有効量と組み合わせて投与することができる。ＯＤＡＲの拮抗薬は、オステオペニアの治療に特に有用である。

【００６５】

本発明をより詳細に説明するために、以下の実施例が提供されるが、本発明の範囲を制限すると解すべきではない。

【実施例１】

【００６６】
ＯＰＧ結合性蛋白のための細胞系供給源の同定
オステオプロテゲリン（ＯＰＧ）は、生体外および生体内の破骨細胞発生を抑制制御する。ＯＰＧは、ＴＮＦＲ関連蛋白であるので、ＴＮＦ関連ファミリーメンバーと相互作用し易いと共にその効果を媒介する。１つの例を除いて、ＴＮＦスーパーファミリーの全ての既知のメンバーは、細胞表面に発現されるＩＩ型膜貫通蛋白である。ＯＰＧ結合性蛋白の供給源を同定するために、種々の細胞系および一次造血細胞の表面に配されたＯＰＧ結合性蛋白についてスクリーニングするための免疫プローブとして、組換えＯＰＧ－Ｆｃ融合蛋白を用いた。
【００６７】
生体外で接着培養として成長した細胞系を、次の方法を用いて処理した：細胞を、２４ウエル組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ製）内に入れ、次に約８０％の集密性まで増殖させた。次に増殖培地を除去し、接着培養を、１％胎児ウシ血清（ＦＣＳ）を含む燐酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ製）で洗った。組換えマウスＯＰＧ［２２－１９４］－ＦｃおよびヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ融合蛋白（１９９６年９月３日付けの米国出願Ｎｏ．０８／７０６，９４５を参照）を、個々に、１％ＦＣＳ含有ＰＢＳ中に５ｕｇ／ｍｌの濃度まで希釈し、培地に添加し０℃で４５分間インキュベートした。ＯＰＧ－Ｆｃ融合蛋白溶液を廃棄し、細胞を前述のようにＰＢＳ－ＦＣＳ溶液で洗った。次に、培養を、ＰＢＳ－ＦＣＳ中に希釈されたフィコエリスリン結合ヤギＦ（ａｂ’）抗ヒトＩｇＧ２次抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｃａｔ．＃２０４３～０９）にさらした。０℃で３０～４５分間インキュベーションした後、溶液を廃棄し、培養を前述のように洗った、次に、細胞を、免疫蛍光顕微鏡法により分析して、細胞表面ＯＰＧ結合性蛋白を発現する細胞系を検出した。
【００６８】
細胞浮遊培養を、以下の変法と類似の方法で分析した：希釈剤および洗浄緩衝液は、１％ＦＣＳを含んでいるカルシウムおよびマグネシウム非含有リン酸塩緩衝生理食塩水からなっていた。細胞を、増殖培地中の対数増殖している培地から収穫し、遠心分離によりペレット化し、次に、９６ウエル微量定量組織培地プレート（Ｆａｌｃｏｎ製）において1×10^{7}細胞／ｍｌの濃度で再懸濁した。細胞を、組換えＯＰＧ－Ｆｃ融合蛋白に、次に、前述のような２次抗体に連続的にさらし、細胞を各工程間の遠心分離により洗浄した。次に、細胞を、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣｓｃａｎを用いて蛍光活性細胞分類（ＦＡＣＳ）により分析した。
【００６９】
この手法を用いて、マウス骨髄単球細胞系３２Ｄ（ＡＴＣＣアクセスｎｏ．ＣＲＬ－１３４６）が、マウスＯＰＣ［２２－１９４］－ＦｃおよびヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ融合蛋白の両方を用いて検出することができる表面分子を発現することがわかった。２次抗体のみでは、３２Ｄ細胞の表面に結合せず、またヒトＩｇＧ１　Ｆｃを精製せず、これは、ＯＰＧ－Ｆｃ融合蛋白の結合がＯＰＧ分子によるものであることを示している。この結合は、組換えマウスまたはヒトＯＰＧ［２２－４０１］蛋白の添加により投与量依存的に競合することができた。すなわち、この生物学的活性のために必要なＯＰＧ領域は、３２Ｄ誘導表面分子に特異的に結合することができる。
【実施例２】
【００７０】
マウスＯＰＧ結合性蛋白の発現クローニング
ｃＤＮＡライブラリーを３２Ｄ　ｍＲＮＡから調製し、哺乳動物発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）中に結合させた。組換えインターロイキン－３の存在下に維持された指数増殖期の３２Ｄ細胞を収穫し、全細胞ＲＮＡを酸性チオシアン酸グアニジニウム－フェノール－クロロホルム抽出により精製した（ＣｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉおよびＳａｃｃｈｉのＡｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．第１６２巻，１５６～１５９頁（１９８７年））。製造者の推薦手順を用いてＤｙｎａｂｅａ

ｄｓ Ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）２５（Ｄｙｎａｌ Ｃｏｒｐ製）への吸着またはそこからの溶離により、全ＲＮＡ製剤からポリ（Ａ＋）ｍＲＮＡフラクションを得た。指向的オリゴ－ｄＴでプライミングしたｃＤＮＡライブラリーを、製造者の推薦手順を用いてＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍｄ）を用いて調製した。得られるｃＤＮＡを、Ｓａｌ ＩおよびＮｏｔ Ｉ制限エンドヌクレアーゼを用いて完全に消化し、次に、サイズ排除ゲルクロマトグラフィーにより分画した。最も分子量の大いフラクションを選択し、次に、プラスミドベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）のポリリンカー領域に結合させた。このベクターは、複クローニング部位の上流のＣＭＶプロモーターを含み、真核生物細胞中に高水準の発現を導いた。次に、ライブラリーを、電気穿孔によりコンピテント大腸菌中に入れ（ＥｌｅｃｔｒｏＭＡＸ ＤＨ１０Ｂ，Ｇｉｂｃｏ，ＮＹ）、１００ｕｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢ寒天上に滴下した。次に、ライブラリーを、約１０００クローン／プールを含む分離プール中に配置し、各プールの培地１．０ｍｌを３７℃で１６～２０時間増殖させた。各培地からのプラスミドＤＮＡを、製造者の推薦手順に従って、Ｑｉａｇｅｎ Ｑｉａｗｅｌｌ ９６ Ｕｌｔｒａ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｋｉｔ（カタログ＃１６１９１）を用いて調製した。

【００７１】

３２Ｄ ｃＤＮＡ発現ライブラリーの配列プールを、個々に、ＣＯＳ－７培地中に脂質移入（ｌｉｐｏｆｅｃｔ）し、次に、細胞表面ＯＰＧ結合性蛋白を得るために検定した。このために、ＣＯＳ－７細胞を、６ウエル組織培地プレート（Ｃｏｓｔａｒ製）内に1×10^{6}／ｍｌの濃度で置き、次に１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ）中で一晩培養した。各プールからの約２μｇのプラスミドＤＮＡを、血清非含有ＤＭＥＭ０．５ｍｌ中に希釈し、次に、０．２μｍのＳｐｉｎ－Ｘカラム（Ｃｏｓｔａｒ）を通して遠心分離することにより滅菌した。同時に、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｃａｔ＃１８３２４～０１２）１０μｌを、血清非含有ＤＭＥＭ０．５ｍｌを含む別の管に添加した。ＤＮＡおよびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ溶液を混合し、室温で３０分間インキュベートした。次に、ＣＯＳ－７細胞培地を、血清非含有ＤＭＥＭで洗い、ＤＮＡ－ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ複合体を３７℃で培地に２～５時間さらした。この期間後、培地を除去し、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭで置換した。次に、細胞を３７℃で４８時間培養した。

【００７２】

ＯＰＧ結合性蛋白を発現する培養を検出するために、増殖培地を除去し、細胞をＰＢＳ－ＦＣＳ溶液で洗った。ヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ融合蛋白を５μｇ／ｍｌ含むＰＢＳ－ＦＣＳ溶液の１．０ｍｌを各ウエルに添加し、室温で１時間インキュベートした。細胞をＰＢＳ－ＦＣＳ溶液で３回洗い、次に、２％パラホルムアルデヒドおよび０．２％グルタルアルデヒドを含むＰＢＳ中にて室温で５分間固定した。培地をＰＢＳ－ＦＣＳで１回洗い、次に、ＰＢＳ－ＦＣＳ溶液に漬しつつ６５℃で１時間インキュベートした。培地を冷却し、ＰＢＳ－ＦＣＳ溶液を吸引した。次に、培地を、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ特異的）抗体（ＳＩＧＭＡ製、製造＃Ａ－９５４４）と一緒に室温で３０分間インキュベートし、次に、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ７．６）および１３７ｍＭ ＮａＣｌで３回洗った。これらの工程中に形成された免疫複合体は、製造者の推薦手順に従ってＦａｓｔ Ｒｅｄ ＴＲ／ＡＳ－ＭＸ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ Ｋｉｔ（Ｐｉｅｒｃｅ，カタログ＃３４０３４）を用いてアルカリホスファターゼ活性について検定することにより検出した。

【００７３】

この手法を用いて、合計で約３００，０００の独立３２Ｄ ｃＤＮＡクローン、即ち各々１０００クローンを含む３００のトランスフェクトしたプールをスクリーニングした。ＯＰＧ－Ｆｃ融合蛋白により特異的に修飾される能力を獲得した細胞を含む単一のウエルを同定した。このプールを、同胞選択の連続的繰り返しにより分割し、単一プラスミドクローン３２Ｄ－Ｆ３を得た（図１）。次に、３２Ｄ－Ｆ３プラスミドＤＮＡを、ＣＯＳ－

７細胞中にトランスフェクトし、それを、ＦＩＴＣ－結合ヤギ抗ヒトＩｇＧ２次抗体単独、ヒトＯＰＧ［２２－２０１］－Ｆｃ融合蛋白＋２次、またはＡＴＡＲ－Ｆｃ融合蛋白（ＨＶＥＭとしても知られているＡＴＡＲ；Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙら著，Ｃｅｌｌ　第８７巻，４２７～４３６（１９９６年））で免疫染色した（図２）。２次抗体単独はＣＯＳ－７／３２Ｄ－Ｆ３細胞に結合せず、ＡＴＡＲ－Ｆｃ融合蛋白にも結合しなかった。ＯＰＧ　Ｆｃ融合蛋白のみが、ＣＯＳ－７／３２Ｄ－Ｆ３細胞に結合し、このことは、ＯＰＧ結合性蛋白をコードする３２Ｄ－Ｆ３が発現細胞の表面に表示されることを示している。

【実施例３】

【００７４】

ＯＰＧ結合性蛋白配列

先に単離した３２Ｄ－Ｆ３は、約２．３ｋｂのｃＤＮＡ挿入部を含み（図１）、それを、製造者の推薦手順に従って、プライマー誘導Ｔａｑ染料ターミネーター反応（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３７３Ａ自動ＤＮＡ配列機において両方向に配列決定した。得られるヌクレオチド配列を、ＦＡＳＴＡプログラム（ＧＣＧ，ウイスコンシン大学）を用いてＤＮＡ配列データベースと比較し、「６方向（ｓｉｘ－ｗａｙ）オープンリーディングフレーム」アプリケーション（Ｆｒａｍｅｓ）（ＧＣＧ，ウイスコンシン大学）を用いて長いオープンリーディングフレーム（ＬＯＲＦ’ｓ）の存在について分析した。メチオニンで始まっている３１６アミノ酸（ａａ）残基のＬＯＲＦを適当な方向において検出し、このＬＯＲＦに続いて約１５０ｂｐの５’非翻訳領域が存在した。５’非翻訳領域は、予想される開始コドンの上流にフレーム内停止コドンを含んでいた。これは、３２Ｄ－Ｆ３プラスミドの構造が、哺乳動物細胞中で３１６ａａ遺伝子生成物の発現を導くようにＣＭＶプロモーター領域を利用するその性能に一致することを示している。

【００７５】

次に、予想されるＯＰＧ結合性蛋白配列を、ＦＡＳＴＡプログラムの改良バージョン（Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．第１８３巻，６３～９８頁（１９９０年））を用いて既知の蛋白配列のデータベースと比較した。ＬｕｅｔｈｙらのＰｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．第３巻，１３９～１４６頁（１９９４年）により改良された（Ｇｒｉｂｓｋｏｖら著，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．米国　第８３巻，４３５５～４３５９頁（１９８７年））の配列プロフィール法を用いて、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーの全ての既知のメンバー中に維持される特定のモチーフの存在についても、アミノ酸配列を分析した。ＯＰＧ結合性蛋白全体において、ＴＮＦスーパーファミリーの幾つかのメンバーへの強い類似性が見られた。マウスＯＰＧ結合性蛋白は、ＴＲＡＩＬおよびＣＤ４０リガンドの両方のマウスおよびヒト類似体に最も密接に関係しているようである。ＯＰＧ結合性蛋白配列のさらなる分析は、１９．４６の高度に有意義なＺスコアを有するＴＮＦスーパーファミリーへの強度の調和性を示した。

【００７６】

ＯＰＧ結合性蛋白アミノ酸配列は、Ｍ４９で始まりＬ６９まで伸びる検知可能な疎水性膜貫通領域を含む。メチオニン開始コドンに対するこの構造に基づいて、ＯＰＧ結合性蛋白は、短いＮ－末端細胞内領域および長いＣ－末端細胞外領域を有するＩＩ型膜貫通蛋白であると予想される（図４）。これは、リンホトキシンαを除いて、全ての既知のＴＮＦファミリーメンバーに類似している（ＮａｇａｔａおよびＧｏｌｓｔｅｉｎ著，Ｓｃｉｅｎｃｅ　第２６７巻，１４４９～１４５６頁（１９９５年））。

【実施例４】

【００７７】

ヒトＯＰＧ結合性蛋白ｍＲＮＡの発現

様様な複合ヒト組織ノーザンブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）を、^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ標識化３２Ｄ－Ｆ３制限フラグメントを用いて検知することにより、ヒト転写の寸法を検出し、発現のパターンを決定した。ノーザンブロット体は、５×ＳＳＰＥ、５０％ホルムアミド、５×デンハート溶液、０．５％ＳＤＳ、および１００μ

ｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ中で４２℃で２～４時間、プレハイブリダイゼーションを行った。次に、ブロット体を、５×ＳＳＰＥ、５０％ホルムアミド、２×デンハート溶液、０．１％ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ、および５ｎｇ／ｍｌ標識化プローブ中で４２℃で１８～２４時間、ハイブリダイゼーションを行った。次に、ブロット体を、２×ＳＳＣ中にて室温で１０分間、１×ＳＳＣ中にて５０℃で１０分間、次に、０．５×ＳＳＣにて１０～１５分間洗った。

【００７８】

マウスｃＤＮＡから誘導されたプローブおよび緊縮条件下のハイブリダイゼーションを用いて、約２．５ｋｂの相対分子量を有する優勢量のｍＲＮＡ種をリンパ節中において検出した（図３）。胎児肝臓ｍＲＮＡ中で同じ相対的分子量の位置に弱い信号も検出される。実験した他の組織中にはＯＰＧ結合性蛋白転写体が検出されなかった。データは、ＯＰＧ結合性蛋白ｍＲＮＡの発現がヒト組織において著しく制限されていることを示している。データは、単離されたｃＤＮＡクローンが、天然転写体の寸法に非常に近いことも示しており、これは、３２Ｄ－Ｆ３が全長クローンであることを示唆している。

【実施例５】

【００７９】

ヒトＯＰＧ結合性蛋白の分子クローニング

ＯＰＧ結合性蛋白のヒト相同体が、ヒト末梢リンパ節中に約２．５ｋｂのｍＲＮＡとして発現され、緊縮ハイブリッド形成条件下にマウスｃＤＮＡプローブとのハイブリッド形成により検出される。ヒトＯＰＧ結合性蛋白をコードするＤＮＡが、組換えバクテリオファージプラーク、または形質転換バクテリアコロニーハイブリッド形成法によりヒトリンパ節ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることにより得られる（Ｓａｍｂｒｏｏｋら著，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９年））。このために、マウスＯＰＧ結合性蛋白クローン３２Ｄ－Ｆ３を放射能で標識したプローブを用いて、そのファージまたはプラスミドｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする。プレート上のライブラリーから持ち上げられたニトロセルロースフィルターをプローブを用いてスクリーニングする。これらのフィルターはプレハイブリダイゼーションを行い、次に実施例４に特定された条件を用いてハイブリダイゼーションを行い、最終的にヒトＯＰＧ結合性蛋白ｃＤＮＡの精製クローンを得た。任意のヒトＯＰＧ結合性蛋白クローンから得られた挿入物を、実施例３に記載のように配列決定および分析する。

【００８０】

ヒトリンパ節ポリＡ＋ＲＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）を、１９９５年１２月２２日付けの米国出願Ｎｏ．０８／５７７，７８８に予め示されているように、ＯＰＧ－ｂｐ転写体の存在について分析した。３２Ｐ－標識化マウスＯＰＧ－ｂｐプローブを用いて緊縮条件下に検知したこのＲＮＡサンプルのノーザンブロットは、ヒトＯＰＧ－ｂｐ転写体の存在を示した。次に、オリゴｄＴでプライミングしたｃＤＮＡライブラリーを、実施例２に記載されているようにＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ｋｉｔ（ＧＩＢＣＯ ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ，ＭＤ）を用いてリンパ節ｍＲＮＡから合成した。得られるｃＤＮＡを寸法的に選択し、高分子量フラクションをプラスミドベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）に結合した。エレクトロコンピテント大腸菌ＤＨ１０（ＧＩＢＣＯ ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ，ＭＤ）を形質転換し、1×10^{6}のアンピシリン抵抗性形質転換体を、３２Ｐ－標識化マウスＯＰＧ結合性蛋白プローブを用いてコロニーハイブリッド形成によりスクリーニングした。

【００８１】

推定ヒトＯＰＧ結合性蛋白ｃＤＮＡのプラスミドクローンｐｈｕＯＰＧｂｐ－１．１を単離し、２．４ｋｂの挿入体を含んでいた。得られるｐｈｕＯＰＧｂｐ－１．１挿入体のヌクレオチド配列は、マウスＯＰＧ結合性蛋白ｃＤＮＡ配列に約８０～８５％相同であった。挿入体ＤＮＡ配列の翻訳は、３１７ａａポリペプチドをコードすると予想される長い

オープンリーディングフレームの存在を示した（図４）。マウスとヒトのＯＰＧ－ｂｐポリペプチドを比較すると８７％までの相同性が示され、これは、この蛋白が、進化の過程で高度に保存されることを示している。

【００８２】

ヒトＯＰＧ結合性蛋白ＤＮＡおよび蛋白配列がＧｅｎｂａｎｋには存在せず、相同性のＥＳＴ配列が無かった。マウス相同体の場合のように、ヒトＯＰＧ結合性蛋白は、サイトカインのＴＮＦ$_{\alpha}$スーパーファミリーの全てのメンバーに強度の配列類似性を示す。

【実施例６】

【００８３】

ＯＰＧ結合性蛋白のクローニングおよびバクテリアにおける発現

プライマー対と以下に記載するテンプレートを用いるＰＣＲ増幅を利用して、種々の形状のマウスＯＰＧ結合性蛋白を合成する。各対の１つのプライマーは、遺伝子のカルボキシ末端に続いて、ＴＡＡ停止コドンおよび独自のＸｈｏＩまたはＳａｃＩＩ部位を導入する。各対の他のプライマーは、独自のＮｄｅＩ部位、Ｎ－末端メチオニン、および遺伝子のアミノ末端部分への最適化コドンを誘導する。ＰＣＲおよび熱循環は、標準的組換えＤＮＡ法を用いて行う。ＰＣＲ生成物を精製し、制限酵素で消化し、ベクターｐＡＭＧ２１（ＡＴＣＣアクセス番号９８１１３）の独自のＮｄｅＩおよびＸｈｏＩまたはＳａｃＩＩ部位に挿入し、原栄養大腸菌３９３または２５９６中に形質転換する。他の一般的に用いられる大腸菌発現ベクターおよび宿主細胞も発現に適している。形質転換後、クローンを選択し、プラスミドＤＮＡを単離し、ＯＰＧ結合性蛋白挿入体の配列を確認する。

【００８４】

ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［７５－３１６］

この構造体を、２４２アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。

【００８５】

NH_2-Met(75)-Asp-Pro-Asn-Arg-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.

【００８６】

ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５８１～７２および＃１５８１～７６は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。

【００８７】

１５８１－７２

【００８８】

【化１】

5′-GTTCTCCTCATATGGATCCAAACCGTATTTCTGAAGACAGCACTCACTGCTT-3′

（配列番号５）

【００８９】

１５８１－７６

【００９０】

【化２】

5′-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3′

（配列番号６）

【００９１】

ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［９５－３１６］

この構造体を、２２３アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。

【００９２】
NH_2-Met-His(95)-Glu-Asn-Ala-Gly-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【００９３】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５９１～９０および＃１５９１～９５は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【００９４】
１５９１－９０
【００９５】
【化３】

5′-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCATGAAAACGCAGGTCTGCAG-3′

（配列番号７）
【００９６】
１５９１－９５
【００９７】
【化４】

5′-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3′

（配列番号８）
【００９８】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１０７－３１６］
この構造体を、２１１アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【００９９】
NH_2-Met-Ser(107)-Glu-Asp-Thr-Leu-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１００】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５９１～９３および＃１５９１～９５は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１０１】
１５９１－９３
【０１０２】
【化５】

5′-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTGAAGACACTCTGCCGGACTCC-3′

（配列番号９）
【０１０３】
１５９１－９５
【０１０４】
【化６】

5′-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3′

（配列番号１０）
【０１０５】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１１８－３１６］

この構造体を、１９９アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。

【０１０６】

NH_2-Met(118)-Lys-Gln-Ala-Phe-Gln-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.

【０１０７】

ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５９１～９４および＃１５９１～９５は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。

【０１０８】

１５９１－９４

【０１０９】

【化７】

5′-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAACAAGCTTTTCAGGGG-3′

（配列番号１１）

【０１１０】

１５９１－９５

【０１１１】

【化８】

5′-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3′

（配列番号１２）

【０１１２】

ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１２８－３１６］

この構造体を、１９０アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。

【０１１３】

NH_2-Met-Lys(128)-Glu-Leu-Gln-His-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.

【０１１４】

ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５９１～９１および＃１５９１～９５は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。

【０１１５】

１５９１－９１

【０１１６】

【化９】

5′-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAAGAACTGCAGCACATTGTG-3′

（配列番号１３）

【０１１７】

１５９１－９５

【０１１８】

【化１０】

5′-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3′

（配列番号１４）

【０１１９】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１３７－３１６］
この構造体を、１８１アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【０１２０】
NH_2-Met-Gln(137)-Arg-Phe-Ser-Gly-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１２１】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５９１～９２および＃１５９１～９５は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１２２】
１５９１－９２
【０１２３】
【化１１】

5′-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCAGCGTTTCTCTGGTGCTCCA-3′

（配列番号１５）
【０１２４】
１５９１－９５
【０１２５】
【化１２】

5′-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3′

（配列番号１６）
【０１２６】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１４６－３１６］
この構造体を、１７１アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【０１２７】
NH_2-Met(146)-Glu-Gly-Ser-Trp-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１２８】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、先に記載されているｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［７５－３１６］であり、オリゴヌクレオチド＃１６００～９８および＃１５８１～７６は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１２９】
１６００－９８
【０１３０】
【化１３】

5′- GTTCTCCTCATATGGAAGGTTCTTGGTTGGATGTGGCCCA-3′

（配列番号１７）
【０１３１】
１５８１－７６
【０１３２】

【化１４】

5′-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3′

（配列番号１８）
【０１３３】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１５６－３１６］
この構造体を、１６２アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【０１３４】
NH_2-Met-Arg(156)-Gly-Lys-Pro-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１３５】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、先に記載されているｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］であり、オリゴヌクレオチド＃１６１９～８６および＃１５８１～７６は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１３６】
１６１９－８６
【０１３７】
【化１５】

5′- GTTCTCCTCATATGCGTGGTAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCA-3′

（配列番号１９）
【０１３８】
１５８１－７６
【０１３９】
【化１６】

5′-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3′

（配列番号２０）
【０１４０】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］
この構造体を、１６０アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【０１４１】
NH_2-Met-Lys(158)-Pro-Glu-Ala-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１４２】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５８１～７３および＃１５８１～７６は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１４３】
１５８１－７３
【０１４４】
【化１７】

5′-GTTCTCCTCATATGAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCACACCTCACCATCAAT-3′

（配列番号２１）

【０１４５】
１５８１－７６
【０１４６】
【化１８】

5′-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3′

（配列番号２２）
【０１４７】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１６６－３１６］
この構造体を、１５２アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【０１４８】
NH_2-Met-His(166)-Leu-Thr-Ile-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１４９】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５８１～７５および＃１５８１～７６は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１５０】
１５８１－７５
【０１５１】
【化１９】

5′-GTTCTCCTCATATGCATTTAACTATTAACGCTGCATCTATCCCAT
CGGGTTCCCATAAAGTCACT-3′

（配列番号２３）
【０１５２】
１５８１－７６
【０１５３】
【化２０】

5′-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3′

（配列番号２４）
【０１５４】
ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［１６８－３１６］
この構造体を、１５０アミノ酸の長さに加工し、それは次のＮ－末端およびＣ－末端残基を有する。
【０１５５】
NH_2-Met-Thr(168)-Ile-Asn-Ala-------Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH.
【０１５６】
ＰＣＲに用いられるテンプレートは、ｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３であり、オリゴヌクレオチド＃１５８１～７４および＃１５８１～７６は、ＰＣＲおよびこの遺伝子構造体のクローニングのために用いられるプライマー対であった。
【０１５７】
１５８１－７４
【０１５８】

【化２１】

5′-GTTCTCCTCATATGACTATTAACGCTGCATCTATCCCATCGGGTTCCCATAAAGTCACT-3′

（配列番号２５）
【０１５９】
１５８１－７６
【０１６０】
【化２２】

5′-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3′

（配列番号２６）
【０１６１】
上記構造体は実施例であり、当業者はここに記載の一般的方法を用いて他の形状のＯＰＧ結合性蛋白を容易に得ることができることが理解される。
【０１６２】
組換えバクテリア構造体ｐＡＭＧ２１－マウスＯＰＧ結合性蛋白［７５－３１６］、［９５－３１６］、［１０７－３１６］、［１１８－３１６］、［１２８－３１６］、［１３７－３１６］、および［１５８－３１６］をクローニングし、ＤＮＡ配列を確認し、誘発に続く組換え遺伝子生成物発現の水準を試験した。全ての構造体が、粗溶解物のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動およびクーマシー染色の後に容易に認識される組換え遺伝子生成物の水準を提供した。形質転換大腸菌３９３または２５９６の増殖、ＯＰＧ結合性蛋白発現の誘発およびＯＰＧ結合性蛋白を含む封入体の単離を、ＰＣＴ　ＷＯ９７／２３６１４に記載の手順に従って行う。封入体からのＯＰＧ結合性蛋白の精製は、当業者が利用できる手順を用いてＯＰＧ結合性蛋白を可溶化および再生することを必要とする。組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］は、大部分が不溶性で生成されることがわかったが、約４０％は可溶性フラクション中に見つかった。組換え蛋白を、以下に記載するように可溶性フラクションから精製し、その生物学的活性を試験した。
【実施例７】
【０１６３】
組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の精製
発現されたマウスＯＰＧ結合性蛋白（１５８－３１６）を有する凍結バクテリア細胞を解凍し、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．０、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ中に再び懸濁させた。次に、細胞懸濁液（２０％ｗ／ｖ）を、マイクロフルイダイザイーを３回通過させることにより均質化した。溶解された細胞懸濁液を、ＪＡ１４ローター内で１００００ｒｐｍにて４５分間遠心分離した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析は、封入体および上清の両方において存在する分子量約１８ｋｄのバンドを示した。次に、可溶性フラクションを、１０ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．０で平衡させたＰｈａｒｍａｃｉａ　ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４ＦＦカラムに適用した。ＯＰＧ結合性蛋白を、ＭＥＳ　ｐＨ６．０中に０～０．４ＭのＮａＣｌを含む２０カラム体積のグラジエントで溶離した。次に、ＯＰＧ結合性蛋白を含むフラクションを、２０ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．０で平衡させたＡＢＸ　Ｂａｋｅｒｂｏｎｄカラムに適用した。ＯＰＧ結合性蛋白を、ＭＥＳ　ｐＨ６．０中に０～０．５ＭのＮａＣｌを含む１５ＣＶのグラジエントで溶離した。最終生成物は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによると９５％を超える均質さであった。Ｎ－末端配列化により、次の配列が得られた：Ｍｅｔ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｈｉｓ：これは、残基１５８で開始（メチオニンイニシエーター）するポリペプチドについて予想されるものと同様である。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ中の蛋白の相対分子量は還元時に変化しない。
【実施例８】
【０１６４】

組換え可溶性ＯＰＧ結合性蛋白の生体外生物学的活性

組換えＯＰＧ蛋白が、先に、米国出願０８／５７７，７８８に記載されているように、破骨細胞形成アッセイにおいて骨髄および脾臓前駆体からのビタミンＤ３－依存性破骨細胞形成を阻害することが示された。ＯＰＧ結合性蛋白は、ＯＰＧに結合し、リガンドのＴＮＦファミリーの新しいメンバーであるので、ＯＰＧ生物学的活性の潜在的標的である。最少コアＴＮＦα様領域を表す組換え可溶性ＯＰＧ結合性蛋白（１５８～３１６）を、破骨細胞前駆体からの破骨細胞の分化を調整する性能について試験した。骨髄細胞を成体マウス大腿骨から単離し、Ｍ－ＣＳＦで処理した。非接着性フラクションを、ビタミンＤ３およびデキサメタゾン両方の存在または不存在下にＳＴ２細胞と一緒に共培養した。先に示したように、破骨細胞は、基質細胞（ＳＴ２）、ビタミンＤ３およびデキサメタゾンを含む共培養からでないと発達しない。組換え可溶性ＯＰＧ結合性蛋白を、０．１６～５００ｎｇ／ｍｌの種々の濃度で添加し、破骨細胞成熟を、ＴＲＡＰ溶液アッセイにより、および視覚的観察により測定した。ＯＰＧ結合性蛋白は、破骨細胞分化および成熟を投与量に依存して強度に刺激し、１～２ｎｇ／ｍｌの範囲において最大の半分の効果を有しており、このことは生体外での破骨細胞発生の潜在的誘発剤として作用することを示している（図５）。ＯＰＧ結合性蛋白の効果は、組換えＯＰＧにより阻害される（図６）。

【０１６５】

ＯＰＧ結合性蛋白が基質および添加ステロイドを置換し得るか試験するために、破骨細胞前駆体の成長を促進するようにＭ－ＣＳＦを種々の濃度で用いることにより培地を形成し、種々の量のＯＰＧ結合性蛋白も添加した。図６に示すように、ＯＰＧ結合性蛋白は投与量依存的にＴＲＡＰ活性を刺激し、刺激の大きさは、添加されたＭ－ＣＳＦの水準に依存し、このことは、これらの２つの因子が一緒になって、破骨細胞発達のための要であることを示している。この最後の観察の生物学的関連性を確認するために、ウシ皮質骨スライス上に培地を形成し、Ｍ－ＣＳＦおよびＯＰＧ結合性蛋白の単独または一緒になった効果を示した。図７に示すように、Ｍ－ＣＳＦの存在下におけるＯＰＧ結合性蛋白は、骨表面を腐食して多孔状にする大きなＴＲＡＰ陽性破骨細胞の形成を刺激した。すなわち、ＯＰＧ結合性蛋白は、破骨細胞発生刺激（分化）因子として作用する。このことは、ＯＰＧが、ＯＰＧ結合性蛋白を隔離することにより破骨細胞の発達を阻害することを示している。

【実施例９】

【０１６６】

組換え可溶性ＯＰＧ結合性蛋白の生体内活性

生体外研究に基づき、大腸菌内で生成した組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］は、骨髄性前駆体からの破骨細胞発達の潜在的誘発剤である。生体内におけるその効果を決めるために、４～５週齢のオスＢＤＦ１マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に、ＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の皮下注射を、１日２回で３日間および４日目の朝に行った（０、１、２および３日目）。５つの群のマウス（ｎ＝４）にキャリアのみ、または一日当り１、５、２５もしくは１００μｇ／のＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］を与えた。さらに５つの群のマウス（ｎ＝４）に上記投与量のキャリアまたはＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］を与え、さらにヒトＦｃ－ＯＰＧ［２２－１９４］を１日１回の皮下注射により１ｍｇ／ｋｇ／日（約２０μｇ／日）の割合で与えた。全血イオン化カルシウムを、０日目の処理前、および１、２および３日目のＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の最初日毎注射の３～４時間後に決めた。３日目の最後の注射から４時間後、マウスを殺し、放射線撮影を行った。

【０１６７】

ＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の組換えにより、５μｇ／日以上の投与量での治療の２日後に血液イオン化カルシウム量が大きく増加した（図８）。高カルシウム血症の程度は、増加した骨吸収から生じる破骨細胞活性の潜在的誘発を示す。ＯＰＧを並行して投与すると、５および２５μｇ／日のＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の投与量において高カルシウム血症が制限されたが、１００μｇ／日では制限されなかった。これら同

じ動物を、放射線撮影により分析して、Ｘ－線により見える骨鉱物密度への影響があるかどうかを決めた（図９）。３日間注射されたＯＰＧ結合性蛋白の組換え体［１５８－３１６］は、マウスの近位けい骨における骨密度を投与量依存的に低下させた。骨密度の低下は、１００μｇ／日で投与されるマウスにおいて特に明確であり、これらの動物における重度の高カルシウム血症が増加した骨吸収から生じ、結果として骨からのカルシウムが放出されることが確認される。これらのデータは、ＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］が生体内で骨吸収を促進し、それにより全身性高カルシウム血症を導くこと、および組換えＯＰＧがこれらの効果を排除することを明らかに示している。

【実施例１０】

【０１６８】

哺乳動物細胞における可溶性ＯＰＧ結合性蛋白クローニングおよび発現

マウスおよびヒトＯＰＧ結合性蛋白の全長クローンを、先に実施例２で記載したように哺乳動物細胞において発現することができる。また、哺乳動物細胞内で発現されたときに、分泌された状態の蛋白をコードするようにｃＤＮＡクローンを変性することができる。このために、開始コドンをコードし、膜貫通拡張領域を含む蛋白の最初の６９のアミノ酸を略通過して伸びるｃＤＮＡの天然５’末端を、シグナルペプチドリーダー配列で置換することができる。例えば、既知の遺伝子の最初のコドンおよびシグナルペプチドをコードするＤＮＡ配列を切断して、アミノ酸残基６８をコードする領域の後の任意の位置で始まるＯＰＧ結合性蛋白ｃＤＮＡ配列にすることができる。得られる組換えクローンは、動物細胞内で分泌状態のＯＰＧ結合性蛋白を生成することが予想され、グリコシル化のようなＯＰＧ結合性蛋白のＣ末端細胞外領域において通常起こる翻訳後変性を起こすべきである。この方式を用いて、マウスＯＰＧ結合性蛋白の５’末端およびその３’末端にヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域を有する分泌状態のＯＰＧ結合性蛋白を組み立てた。１９９５年１２月２２日付けの米国出願Ｎｏ．０８／５７７，７８８に記載のプラスミドベクターｐＣＥＰ４／ｍｕＯＰＧ［２２－４０１］を、ＮｏｔＩで消化してＯＰＧの３’末端とＦｃ遺伝子との間を開裂させる。線状化したＤＮＡを、次に、ＸｍｎＩで部分的に消化してＯＰＧの残基２３と残基２４との間のみを開裂してブラント末端を残した。制限酵素による消化物を、次に、ＣＩＰを用いて脱リン酸し、この消化物（ＯＰＧおよびＦｃの１～２３残基を含む）のベクター部分をゲル精製した。

【０１６９】

アミノ酸残基６９～３１６をコードするマウスＯＰＧ結合性蛋白ｃＤＮＡ領域を、Ｐｆｕポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて、プラスミドテンプレートから、以下のオリゴヌクレオチドのプライマーを用いてＰＣＲで増幅した。

【０１７０】

１６０２－６１：

【０１７１】

【化２３】

```
CCT CTA GGC CTG TAC TTT CGA GCG CAG ATG
```

（配列番号２７）

【０１７２】

１６０２－５９：

【０１７３】

【化２４】

```
CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG
```

（配列番号２８）

【０１７４】
１６０２～６１オリゴヌクレオチドが、遺伝子の５’末端を増幅し、人工的なＳｔｕＩ部位を含む。１６０２～５９プライマーが遺伝子の３’末端を増幅し、人工的なＮｏｔＩ部位を含む。得られるＰＣＲ生成物を、ＮｏｔＩおよびＳｔｕＩを用いて消化し、次にゲルで精製した。精製されたＰＣＲ生成物をベクターと結合し、次に電気的コンピテント大腸菌ＤＨ１０Ｂ細胞の形質転換に用いた。得られたクローンを配列させて、増幅した配列と制限部位接合部の一体性を確認した。次にこのプラスミドを用いてヒト２９３線維芽細胞をトランスフェクトし、ＯＰＧ結合性蛋白－Ｆｃ融合蛋白を、先に１９９５年１２月２２日付けの米国出願Ｎｏ．０８／５７７，７８８に記載されているように培地から収集した。

【０１７５】
同様の方式を用いて、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に融合したＮ－末端截形部を発現することのできる発現ベクターを示した。この構造物は、枠内でマウスＯＰＧ結合性蛋白残基１５８～３１６に融合し、続いてヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に枠内で融合したマウスＯＰＧ結合性蛋白（ａａ残基１～２１）からなる。このために、プラスミドベクターｐＣＥＰ４／マウスＯＰＧ［２２－４０１］（１９９５年１２月２２日付けの米国出願Ｎｏ．０８／５７７，７８８）を、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｏｔＩで消化して全ＯＰＧ読み枠を除去した。マウスＯＰＧ結合性蛋白の残基１５８～３１６を、以下のプライマーを用いてプラスミドテンプレートｐｃＤＮＡ／３２Ｄ－Ｆ３からＰＣＲ増幅した。

【０１７６】
１６１６－４４：

【０１７７】
【化２５】

CCT CTC TCG AGT GGA CAA CCC AGA AGC CTG AGG
CCC AGC CAT TTG C

（配列番号２９）

【０１７８】
１６０２－５９：

【０１７９】
【化２６】

CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG

（配列番号３０）

【０１８０】
残基１５８で開始すると共に、人工的ＸｈｏＩ部位を有するｍｕＯＰＧシグナルペプチドの残基１６～２１を含んでいるＯＰＧ結合性蛋白を、１６１６～４４が増幅する。１６０２～５９は、遺伝子の３’末端を増幅し、枠内ＮｏｔＩ部位を加える。ＰＣＲ生成物を、ＮｏｔＩおよびＸｈｏＩで消化し、次に、ゲルで精製する。

【０１８１】
以下の相補プライマーを互いにアニーリングして、翻訳開始部位を包囲するＫｏｚａｋ配列およびマウスＯＰＧシグナルペプチドをコードするアダプターを形成する。

【０１８２】
１６１４－４１

【０１８３】

【化２７】

AGC TTC CAC CAT GAA CAA GTG GCT GTG CTG CGC
ACT CCT GGT GCT CCT GGA CAT CA

（配列番号３１）

【０１８４】

１６１６－４２

【０１８５】

【化２８】

TCG ATG ATG TCC AGG AGC ACC AGG AGT GCG CAG
CAC AGC CAC TTG TTC ATG GTG GA

（配列番号３２）

【０１８６】

これらのプライマーをアニーリングし、５’末端のＨｉｎｄＩＩＩおよび３’末端のＸｈｏＩと相溶性の５’突出部を発生させた。先に得られた消化ベクターを、アニーリングされたオリゴ、および消化されたＰＣＲフラグメントを併せて結合し、電気穿孔によりＤＨ１０Ｂ細胞に入れた。得られるクローンを配列決定して、シグナルペプチド、残基１５８～３１６をコードするＯＰＧ結合性蛋白フラグメント、およびＩｇＧ１　Ｆｃ領域の間の結合の正確な再構築を確認した。組換えプラスミドを精製し、ヒト２９３線維芽細胞内にトランスフェクトし、前述のように調整済媒体産物として発現させた。

【０１８７】

全長マウスおよびヒトｃＤＮＡを、ｐＣＥＰ４発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）内にクローニングし、次に実施例１に記載のようにヒト２９３線維芽細胞の培地内にトランスフェクトした。細胞培地を、前述のようにハイグロマイシンを用いて選択し、血清非含有調整培地を調製した。調整培地を、固定化組換えＯＰＧのカラムに通し、格納庫状態（ｓｈｅｄ　ｆｏｒｍ）のマウスおよびヒト組換えＯＰＧ　ｂｐを親和性を利用して精製した。精製した可溶性ＯＰＧ結合性蛋白のＮ－末端配列分析は、マウス蛋白が、フェニルアラニン１３９の前で選択的に開裂し、ヒト蛋白が、相同性残基であるイソロイシン１４０の前で選択的に開裂することを示している。さらに、ヒト蛋白は、グリシン１４５の前でも選択的に開裂する。このことは、天然産の可溶性状態のヒトＯＰＧ結合性蛋白が、位置１４０のイソロイシンまたは位置１４５のグリシンの位置においてアミノ末端残基を有することを示唆している。

【実施例１１】

【０１８８】

ＯＰＧ結合性蛋白のペプチド、および蛋白に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製

ＯＰＧ結合性蛋白の特定領域への抗体を、ＯＰＧ結合性蛋白からのペプチドを用いて免疫化することにより得ることができる。これらのペプチドを単独で用いて、または共役状態のペプチドを用いて免疫化することができる。

【０１８９】

成熟ＴＮＦαの結晶構造が記載され［Ｅ．Ｙ．Ｊｏｎｅｓ，Ｄ．Ｉ．ＳｔｕａｒｔおよびＮ．Ｐ．Ｃ．Ｗａｌｋｅｒ、（１９９０年），Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉ．Ｓｕｐｐｌ．第１３巻，１１～１８頁］、モノマーが、ゼリーロールとの逆並行βプリーツシート状サンドイッチを形成する。１０の逆並行βストランドが、この結晶構造内で観察され、βサンドイッチを形成し、一方のβシートはストランドＢ’ＢＩＤＧからなり、他方のシートはストランドＣ’ＣＨＥＦからなる［Ｅ．Ｙ．Ｊｏｎｅｓら，前掲書］。成熟ＴＮＦαの２つのループが、変異発生研究から受容体と接触することが示され、これらは、βストランドＢとＢ’との間に形成されるループと、βストランドＥとＦとの間に形成されるループである［Ｃ．Ｒ．Ｇｏｈ，Ｃ－Ｓ．Ｌｏｈ，及びＡ．Ｇ．Ｐｏｒｔｅｒ（１９９１年）Ｐ

ｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，第４巻，７８５～７９１頁］。ＴＮＦβと、５５ｋｄのＴＮＦ受容体（ＴＮＦ－Ｒ５５）の細胞外領域との間に形成される複合体の結晶構造が解明され、受容体－リガンド接触体が記載されている［Ｄ．Ｗ．Ｂａｎｎｅｒ，Ａ．Ｄ’Ａｒｃｙ，Ｗ．Ｊａｎｅｓ，Ｒ．Ｇｅｎｔｚ，Ｈ－Ｊ．Ｓｃｈｏｅｎｆｅｌｄ，Ｃ．Ｂｒｏｇｅｒ，Ｈ．Ｌｏｅｔｓｃｈｅｒ，およびＷ．Ｌｅｓｓｌａｕｅｒ（１９９３年），Ｃｅｌｌ，第７３巻，４３１～４４５頁］。前述の変異発生の研究に一致して［Ｃ．Ｒ．Ｇｏｈら，前掲書］、リガンドＴＮＦβの対応するループＢＢ’およびＥＦが、ＴＮＦｂ：ＴＮＦ－Ｒ５５複合体の溶解した結晶構造中の受容体との接触体の主用部分を形成することがわかった。マウスＯＰＧ結合性蛋白のアミノ酸配列を、ＴＮＦαおよびＴＮＦβのアミノ酸配列と比較した。ＢＢ’およびＥＦループに対応するマウスＯＰＧ結合性蛋白の領域を、この比較に基づき予想し、ペプチドを設計し、それを以下に記載する。

【０１９０】

Ａ．抗原：以下に記載するように動物を免疫化するための抗原（ａｇ）として組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］を用い、以下に記載の手段を用いて血清を試験した。マウスＯＰＧ結合性蛋白の推定上ＢＢ’およびＥＦループへのペプチドを用いて合成して、免疫化を行った。これらのペプチドを以下に示す。

【０１９１】

ＢＢ’ループペプチド

【０１９２】

【化２９】

NH2--NAASIPSGSHKVTLSSWYHDRGWAKIS-COOH

（配列番号３３）

【０１９３】

ＢＢ’ループシスペプチド

【０１９４】

【化３０】

NH2--NAASIPSGSHKVTLSSWYHDRGWAKISC-COOH

（配列番号３４）

【０１９５】

ＥＦループペプチド

【０１９６】

【化３１】

NH2--VYVVKTSIKIPSSHNLM-COOH

（配列番号３５）

【０１９７】

ＥＦループシスペプチド

【０１９８】

【化３２】

NH2--VYVVKTSIKIPSSHNLMC-COOH

（配列番号３６）

【０１９９】

以下のセクションＢに記載の手法を使用して、カルボキシ末端システイン残基を有するペプチドを結合のために用い、免疫化のために用いた。

【０２００】

Ｂ．キーホールリンペットヘモシアニンまたはウシ血清アルブミン結合体：選択された

ペプチドまたは蛋白フラグメントを、動物におけるその免疫原性を増加させるために、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）に結合することができる。また、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）結合ペプチドまたは蛋白フラグメントを、ＥＩＡプロトコールにおいて利用することができる。Ｉｍｊｅｃｔ Ｍａｌｅｉｍｉｄｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ ＫＬＨまたはＢＳＡ（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を、最終的濃度が１０ｍｇ／ｍｌとなるようにdH_2O中で再構成する。ペプチドまたは蛋白フラグメントを、リン酸塩緩衝液中に溶解し、次に同等質量（ｇ／ｇ）のＫＬＨまたはＢＳＡと混合した。結合体を穏やかな攪拌下に室温（ｒｔ）で２次間反応させた。次に、溶液を脱塩カラムを通す、またはＰＢＳで一晩透析する。ペプチド結合体を、免疫化またはＥＩＡにおいて用いられるまで－２０℃で貯蔵する。

【０２０１】

Ｃ．免疫化：Ｂａｌｂ／ｃマウス、（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）Ｌｏｕラット、またはニュージーランド白色ウサギに、完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ，５０％ｖｏｌ／ｖｏｌ；Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ）中に乳濁されたａｇ（それぞれ、５０μｇ、１５０μｇおよび１００μｇ）を皮下注射（ＳＱＩ）した。次に、ウサギに、不完全フロイントアジュバント（ＩＣＦＡ；Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ）中で同様にして調製した抗原を、２週間の間隔で２回または３回、追加注射した。マウスおよびラットに、約４週間毎に追加注射する。第２回目の追加注射から７日後、試験採血を行い、血清抗体価を決めた。ウサギにおいて定量を始めてから、１週間に５０ｍＬの採血を６週間連続して行う。マウスおよびラットを、血清抗体価に基づきハイブリドーマ産生について選択し；最大量の半分の力価が５０００以上である動物を用いる。当業者はこのプロトコールへの調節を行うことができ；例えば、種々のタイプの免疫調整剤が利用でき、このプロトコールに組み込むことができる。

【０２０２】

Ｄ．酵素結合免疫吸着剤アッセイ（ＥＩＡ）：　個々の動物の血清抗体（ａｂ）価を決めるため、およびその後有効なハイブリドーマをスクリーニングするためにＥＩＡを行う。平底で高結合性の９６ウエル微量定量ＥＩＡ／ＲＩＡプレート（Ｃｏｓｔａｒ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）を、炭酸塩－重炭酸塩緩衝液、ｐＨ９．２（０．０１５Ｍ Na_2CO_3，０．０３５Ｍ $NaHCO_3$）の１ｍｌ当り５μｇの濃度の精製組換え蛋白または蛋白フラグメントで被覆する。蛋白フラグメントを、要すれば、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）に結合させることができる。５０μｌのａｇを、各ウエルに添加する。次に、プレートを、酢酸塩フィルム（ＩＣＮ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，Ｃｏｓｔａ Ｍｅｓａ，ＣＡ）で覆い、揺動台上で室温（ｒｔ）で２時間または４℃で一晩インキュベートする。ＢＳＡ希釈剤／ブロッキング溶液濃縮液（Ｋｉｒｋｅｇａａｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）１部を脱イオン水（dH_2O）１部と混合することにより調製した５％ＢＳＡ溶液をウエル当り２５０μｌ用いて室温で３０分間ブロッキングする。ブロッキング溶液を廃棄すると、血清２倍希釈液またはハイブリドーマ組織培地懸濁液の５０μｌを各ウエルに添加する。血清希釈剤は１％ＢＳＡ（１０％ＢＳＡ希釈剤／ブロッキング溶液濃縮液が、ダルベッコリン酸塩緩衝生理生塩水Ｄ－ＰＢＳ中に１：１０で希釈されたもの；Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）であり、ハイブリドーマ上清を希釈しないで試験する。ハイブリドーマスクリーニングの場合、１つのウエルを結合体対照として維持し、第２のウエルを陽性ａｂ対照とする。プレートを、再び揺動しながら室温で１時間インキュベートし、次に、dH_2O中の２０倍濃厚物（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）の洗浄溶液の１倍製剤を用いて４回洗った。次に、１％ＢＳＡ中に希釈したワサビ過酸化酵素結合２次ａｂ（Ｂｏｅｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を各ウエルにおいて３０分間インキュベートする。プレートを前述のように洗い、吸取り紙で乾燥し、ＡＢＴＳ過酸化酵素

単一成分基質（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を添加する。ミクロプレートＥＬ３１０リーダー（Ｂｉｏ－ｔｅｋ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）を用いて各ウエルについて吸光度を４０５ｎｍで読む。４０５における光学密度に対して血清希釈の$\log_{10}$をプロットし、つぎにその血清により得られた最大光学密度の５０％のポイントを外挿することにより、血清抗体の最大の半分の力価を計算する。光学濃度が前記バックグラウンドより５倍以上大きい場合、ハイブリドーマを陽性として選択する。このプロトコールへの調節を行い；例えば、特異性または非相互反応性について共役２次抗体を選択することができる。

【０２０３】

Ｅ．細胞融合：　ハイブリドーマ生成のために選択された動物に、ＰＢＳ中の５０～１００μｇのａｇを静脈内注射する。４日後、動物を二酸化炭素で殺し、脾臓を滅菌条件下に、２００Ｕ／ｍｌのペニシリン Ｇ、２００μｇ／ｍｌの硫酸ストレプトマイシンおよび４ｍＭのグルタミン（２×Ｐ／Ｓ／Ｇ　ＤＭＥＭ）を含むダルベッコ変性イーグル培地３５ｍＬ中に収集する。脾臓から過剰の脂肪組織を切除し、次に、シャーレ４枚の清浄２×Ｐ／Ｓ／Ｇ　ＤＭＥＭを通して濯ぐ。これを、次に、１０ｍｌの２×Ｐ／Ｓ／Ｇ　ＤＭＥＭを含む滅菌ストマッチャー（ｓｔｏｍａｃｈｅｒ）袋（Ｔｅｋｍａｒ，Ｃｉｎｃｉｎｎａｔｉ，ＯＨ）に移し、ストマッチャー・ラボ・ブレンダー８０（Ｓｅｗａｒｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ＵＡＣ Ｈｏｕｓｅ；Ｌｏｎｄｏｎ，Ｅｎｇｌａｎｄ）を用いて単一細胞懸濁液に分けた。細胞が脾臓カプセルから培地中に放出されるときに、袋から取り出し、滅菌５０ｍｌ円錐遠心分離管（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｌｉｎｃｏｌｎ Ｐａｒｋ，ＮＪ）に移す。新しい培地を袋に添加し、脾臓の全ての内容物細胞が放出されるまでプロセスを続ける。これらの脾臓細胞を、２２５×ｇで１０分間遠心分離することにより３回洗う。

【０２０４】

並行して、完全培地（ＤＭＥＭ、１０％非動化胎児ウシ血清、２ｍＭグルタミン、０．１ｍＭ非必須アミノ酸、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、および１０ｍＭヘペス緩衝液；Ｇｉｂｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）中で増殖させた、骨髄腫細胞の対数相培地、マウスまたはラット脾臓細胞溶融物のＳｐ２／０－Ａｇ１４またはＹ３－Ａｇ１．２．３（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）を同様にして洗う。脾臓細胞をミエローマ細胞と組み合わせて、再度ペレット化する。培地を細胞ペレットから吸引し、２ｍｌのポリエチレングリコール１５００（ＰＥＧ１５００；Ｂｏｅｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を１分間かけて細胞中に穏やかに混入する。その後、等量の２×Ｐ／Ｓ／Ｇ　ＤＭＥＭをゆっくり添加する。細胞を３７℃で２分間融合させ、次に、さらに６ｍｌの２×Ｐ／Ｓ／Ｇ　ＤＭＥＭを添加する。細胞を再び３７℃で３分保温する。最後に、３５ｍｌの２×Ｐ／Ｓ／Ｇ　ＤＭＥＭを細胞懸濁液に添加し、細胞を遠心分離によりペレット化する。培地をペレットから吸引し、細胞を完全培地中に穏やかに再懸濁する。細胞を、５ｍｌのペレットから１回滴下することにより９６ウエル平底組織培地プレート（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｌａｂｗａｒｅ；Ｌｉｎｃｏｌｎ Ｐａｒｋ，ＮＪ）上に分配する。プレートを、３７℃で５％CO_2の加湿条件において一晩インキュベートする。翌日、等体積の選択培地を各ウエルに添加する。選択培地は、完全培地中の０．１ｍＭのヒポキサンチン、4×10^{-4}ｍＭのアミノプテリン、および1.6×10^{-2}ｍＭのチミジンからなる。融合プレートを７日間インキュベートし、次の３日間に培地を２回交換し；培地交換後にＨＡＴ選択培地を用いる。組織培地上澄みを、各ハイブリドーマ含有ウエルから、最後の培地交換から３～４日後に取り出し、特異的抗体反応性についてＥＩＡで試験する。このプロトコールは、ＨｕｄｓｏｎおよびＨａｙ著，「Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第２版」，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓにおいて改良された。

【実施例１２】
【０２０５】
造血前駆細胞上に発現されたＯＰＧ結合性蛋白受容体のクローニング
生物学的活性組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］をフルオレセイン－イソチオシアネート（ＦＩＴＣ）に結合させて蛍光プローブを形成した。組換えマウスＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］を、６－フルオレセイン－５－（および６）カルボキシアミドヘキサン酸スクシンイミジルエステル（Ｍｏｌｅｃｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎ、ＯＲ）と、１：６のモル比にて４℃で１２時間インキュベートすることにより蛍光標識化を行った。ＦＩＴＣ標識化ＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］をゲル濾過クロマトグラフィーによりさらに精製した。マウス骨髄細胞を単離し、実施例１０に記載のようにＣＳＦ－１およびＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］の存在下に培地中でインキュベートした。マウス骨髄細胞をＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）およびＯＰＧ結合性蛋白［１５８－３１６］（２０ｎｇ／ｍｌ）中で一晩培養した。非接着性細胞を最初に除去し、氷上に貯蔵し、残りの接着性細胞を、細胞剥離緩衝液（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）と一緒にインキュベートすることにより除去し、非接着性集合と共にプールし、次に、前述のようにＦＩＴＣ－ＯＰＧ結合性蛋白で染色した。洗浄し、０．５％ＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁させた後、細胞をＦＩＴＣ－ＯＰＧ結合性蛋白にさらし、洗い、次にＦＡＣＳにより分類した。ＦＩＴＣ－ＯＰＧ結合性蛋白での染色に陽性である細胞の集合を集め、実施例２のようにｍＲＮＡを単離した。実施例２に記載の手順に従って、このｍＲＮＡ製剤を用いてｃＤＮＡライブラリーを形成した。
【０２０６】
この供給源から製造されたｃＤＮＡライブラリーを、ＰＣＴ公開Ｎｏ．ＷＯ９７／２３６１４およびＳｉｍｏｎｅｔら著（Ｃｅｌｌ　第８９巻，３０９～３１９頁（１９９７年））に記載のように、ランダムＥＳＴ配列分析のために用いた。この方法を用いて、新規ＴＮＦＲ関連蛋白をコードする２．１ｋｂまでのｃＤＮＡを検出した。マウスＯＤＡＲｃＤＮＡの長いオープンリーディングフレームは６２５アミノ酸残基の蛋白をコードし、ＴＮＦＲ関連蛋白：Ｎ－末端の疎水性シグナルペプチド、４タンデムシステイン富含繰り返し配列、疎水性膜貫通領域、および細胞質信号発生領域のホールマーク特徴を含む。この蛋白と、ＴＮＦ受容体ファミリーの他のメンバーとの相同性、およびＦＩＴＣ標識化ＯＰＧ結合性蛋白を結合する骨髄細胞中のその発現は、それがＴＮＦ関連ＯＰＧ結合性蛋白のための潜在的受容体であることを示唆している。この蛋白はＯＤＡＲ、すなわち破骨細胞分化および活性化受容体と表示される。マウスＯＤＡＲの核酸配列および予想されるアミノ酸配列を図１０に示す。
【０２０７】
公に利用できるデータベースにおける最近の配列分析は、この蛋白が、ＲＡＮＫとして知られているヒトＴＮＦＲ関連蛋白のマウス相同体であることを示している（Ａｎｄｅｒｓｏｎｒａら，Ｎａｔｕｒｅ，第３９０巻，１７５～１７９頁（１９９７年））。
【実施例１３】
【０２０８】
哺乳動物細胞における組換えＯＤＡＲ蛋白の生成
ヒトＩｇＧγ１のＦｃ領域に融合している可溶性ＯＤＡＲ細胞外領域を、ＷＯ９７／２３６１４およびＳｉｍｏｎｅｔらの前掲書に既述しているようにＦｃ融合蛋白の組み立ておよび発現のための手順を用いて処理した。哺乳動物細胞中に可溶性ＯＤＡＲ蛋白を発生させるために、マウスＯＤＡＲ（アミノ酸２７～２１１）のｃＤＮＡコード化細胞外領域を、以下のセットのオリゴヌクレオチドプライマーを用いてＰＣＲ増幅した：
【０２０９】
【化３３】

5′ TCT CCA AGC TTG TGA CTC TCC AGG TCA CTC C-3′

（配列番号３７）

【０２１０】
【化３４】

5′ TCT CCG CGG CCG CGT AAG CCT GGG CCT CAT TGG GTG-3′

（配列番号３８）
【０２１１】
ＰＣＲ反応を、２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．８、１０ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭの（NH_4）$_2SO_4$、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００、１０μＭの各ｄＮＴＰ、１μＭの各プライマー、および１０ｎｇのＯＤＡＲ　ｃＤＮＡテンプレート中の、１単位のベントＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を有する５０μｌの体積中で行った。反応は９４℃で３０秒、５５℃で３０秒および７２℃で１分として、合計で１６サイクル行った。ＰＣＲフラグメントを電気泳動により単離した。ＰＣＲフラグメントは、５’末端にＨｉｎｄＩＩＩ制限部位、および３’末端にＮｏｔＩ制限部位を形成する。ＨｉｎｄＩＩＩ－ＮｏｔＩ消化ＰＣＲフラグメントを、次に、枠内で、ＷＯ９７／２３６１４およびＳｉｍｏｎｅｔらの前掲書に既述しているように、ヒトＩｇG_γ１重鎖配列の正面の変性ｐＣＥＰ４－Ｆｃベクター内に下位クローニングした。ＯＤＡＲ細胞外領域とＩｇＧ　Ｆｃ領域との間の結合部に及ぶ２つの関連するアミノ酸をコードするリンカーを導入した。
【０２１２】
次に、構造を、ＮｈｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ＯＰＧシグナルペプチド（アミノ酸１～２１）をコードする以下のアニーリングされたオリゴヌクレオチド対を枠内に挿入した。
【０２１３】
【化３５】

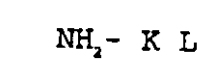
5′CTA GCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GCG CAC TCC TGG
TGC TCC TGG ACA TCA TTG AAT GGA CAA CCC AGA-3′ (SEQ ID

（配列番号３９）
【０２１４】
【化３６】

5′AGC TTC TGG GTT GTC CAT TCA ATG ATG TCC AGG AGC ACC
AGG AGT GCG CAG CAC AGC CAC TTG TTC ATG GTG-3′ (SEQ ID

（配列番号４０）
【０２１５】
２つの関連するアミノ酸をコードするリンカーを、ＯＰＧシグナルペプチドとＯＤＡＲ配列との間に導入した。この最終的に加工された構造体（ＯＤＡＲ－Ｆｃ／ｐＣＥＰ４）は、アミノ末端からカルボキシ末端までを含む融合蛋白をコードする：ＯＰＧシグナルペプチド（アミノ酸１～２１）－リンカー（ＬｙｓＬｅｕ）－ＯＤＡＲ（アミノ酸２７～２１１）－リンカー（ＡｌａＡｌａ）－ヒトＩｇＧ　Ｆｃ。
【０２１６】
構造体を、（Ａｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．第１巻，９．１．１～９．１．３（１９９４年））に記載されたリン酸カルシウム法により２９３－ＥＢＮＡ－１細胞中にトランスフェクトした。次に、トランスフェクトされた細胞を、２００μｇ／ｍｌのハイグロマイシン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）中で選択し、得られた抗薬剤塊培養をプールし、集密化するまで増殖させた。細胞を、ＰＢＳ中で１回洗い、次に血清非含有培地中で７２時間培養した。調整培地を集めた。培地中のＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白を

、抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体を用いるウエスタンブロット分析により検出した。
【０２１７】
Ｆｃ融合蛋白を、製造者の推薦手順を使用してプロテイン－Ａカラムクロマトグラフィー（Ｐｉｅｒｃｅ製）により精製した。次に、精製蛋白５０ｐモルを、本質的にＭａｔｓｕｄａｉｒａらの（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．第２６２巻，１０～３５頁（１９８７年））に記載されているように自動エドマン分解によりＮ－末端配列分析に付した。１０サイクル後に、以下のアミノ酸配列を読んだ。
【０２１８】
【化３７】



【０２１９】
ＯＤＡＲ－ＦｃとＯＰＧ結合性蛋白との結合活性を、実施例２に記載のようにトランスフェクトされたＣＯＳ－７細胞培地の免疫蛍光染色により試験した。ＣＯＳ－７細胞を、マウスＯＰＧ結合性蛋白をコードするＤＮＡを含む発現ベクター１μｇで脂質移入した。インキュベーションを４８時間した後、細胞を、１０ｍｇ／μｌのヒトＩｇＧ　Ｆｃ、ＯＤＡＲ－Ｆｃ、またはＯＰＧ－Ｆｃ蛋白を含むＰＢＳ－ＦＢＳ溶液中で４℃で１時間インキュベートした。次に、細胞をＰＢＳで２回洗い、次に、２０μｇ／ｍｌのＦＩＴＣ標識化ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ製）を含むＰＢＳ－ＦＢＳ溶液中でさらに１時間インキュベートした。ＰＢＳで洗った後、細胞を、共焦点顕微鏡検査（ＡＣＡＳ，Ｕｌｔｉｍａ，Ｉｎｓｉｇｈｔ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ，Ｉｎｃ．，Ｏｋｅｍｏｓ，ＭＩ）により試験した。ＯＤＡＲ－ＦｃおよびＯＰＧ－Ｆｃの両方がＯＰＧＬトランスフェクトＣＯＳ－７細胞に結合する（図１１）。
【実施例１４】
【０２２０】
組換え可溶性ＯＤＡＲの生体外生物学的活性
ＯＤＡＲがＯＰＧ結合性蛋白により破骨細胞形成の刺激を抑制する性能を、ＣＳＦ－１（３０ｎｇ／ｍｌ）およびＯＰＧ結合性蛋白（５ｎｇ／ｍｌ）の存在下にマウス骨髄培地中で検定した。破骨細胞成熟を研究するためにマウス骨髄培地を使用する手順は、ＷＯ９７／２３６１４および実施例８に記載されている。実施例１２に記載されているＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白を、６５～１５００ｎｇ／ｍｌの濃度になるように添加した。破骨細胞形成を、培地中で５日間後、抗酒石酸塩アルカリホスファターゼ（ＴＲＡＰ）細胞化学およびＴＲＡＰ溶液アッセイにより検定した。
【０２２１】
ＯＤＡＲ－Ｆｃ融合による破骨細胞形成の投与量依存抑制を、細胞化学およびＴＲＡＰ活性の両方により観察した（図１２）。ＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白は、約１０～５０ｎｇ／ｍｌのED_{50}で、破骨細胞形成を抑制した。
【実施例１５】
【０２２２】
組換え可溶性ＯＤＡＲの生体内生物学的活性
３～４週齢の若い成長の早いオスＢＤＦ１マウスに、種々の投与量のＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白を、キャリアに溶かせ（ＰＢＳ／０．１％ＢＳＡ）て毎日１回４日間、皮下注射した。５日目にマウスにＸ線照射した。使用したＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白の投与量は０．５、１．５および５ｍｇ／ｋｇ／日であった。各処理において、その群、およびＰＢＳ／０．１％ＢＳＡを受けた対照群における全てのマウスを１枚のフィルム上でＸ線照射した。近位けい骨骨幹端領域を、対照対と処理けい骨との間で比較し、処理けい骨が、以下に示すスコアー８を与える対照よりも視覚評価で密度が高いと「＋」と記録した。「陽性」と判断されるには５／８の観察スコアーを必要としている。（投与量はｍｇ／ｋｇ／日で示

す）（ｎ＝４）
【０２２３】
マウスを殺した後、右けい骨を各動物から外し、近位けい骨骨幹端領域の骨密度を、末梢定量コンピューター補助断層撮影（ｐＱＣＴ）（Ｓｔｒａｔｅｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ）により測定した。けい骨の近位端部から１．５ｍｍおよび２．０ｍｍにおける２つの０．５ｍｍの骨の断面を分析（ＸＭＩＣＥ５．２，Ｓｔｒａｔｅｃ，Ｇｅｒｍａｎｙ）して、骨幹端の全骨鉱物密度を決めた。１５００の軟質組織分離閾値を用いて、骨幹端骨の境界を定義した。
【０２２４】
若い成長中のマウスにおけるＯＤＡＲ－Ｆｃの投与は、近位けい骨成長プレートにおける骨吸収を抑制して、放射線写真で視覚的に明らかな骨密度の増加した領域を形成した。放射線写真変化は、２つの実験において１．５ｍｇ／ｋｇ／日以上の投与量において明らかであった（表１）。けい骨の類似領域における第２の実験からのサンプル中のｐＱＣＴによる骨密度の測定により、これらのマウスにおける骨密度の投与量依存増加を確認した。
【０２２５】
表１
ＯＤＡＲ－Ｆｃ融合蛋白による骨吸収の抑制
【０２２６】

【表１】

実験１

要素	用量	1	2	3	4	5	6	7	8	結果
ODAR-Fc	5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	陽性 8/8
ODAR-Fc	1.5	-	+	+	-	-	+	+	+	陽性 6/8
ODAR-Fc	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性 0/8
ODAR-Fc	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性 0/8

実験２

要素	用量	1	2	3	4	5	6	7	8	結果
ODAR-Fc	5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	陽性 8/8
ODAR-Fc	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	陽性 8/8
ODAR-Fc	0.5	-	-	-	+	-	-	-	-	陰性 1/8

【０２２７】

本発明を好ましい態様により説明したが、当業者は変更および修正できるものと解される。従って、添付の請求の範囲は、本発明の請求の範囲に含まれる全てのそのような等価変更を包含するものとされる。

【図１Ａ】

```
GAGCTCGGAT CCACTACTCG ACCCACGCGT CCGGCCAGGA CCTCTGTGAA CCGGTCGGGG      60

CGGGGGCCGC CTGGCCGGGA GTCTGCTCGG CGGTGGGTGG CCGAGGAAGG GAGAGAACGA     120

TCGCGGAGCA GGGCGCCCGA ACTCCGGGCG CCGCGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA      175
                                          Met Arg Arg Ala Ser Arg
                                            1               5

GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC       223
Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro
             10                  15                  20

GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC CCC GCG CCT TCT GCA CCG GCT       271
Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
         25                  30                  35

CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC CTG       319
Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu
     40                  45                  50
```

FIG.1A

【図１Ｂ】

```
GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG TAC       367
Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr
 55                  60                  65                  70

TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT CAC       415
Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His
                 75                  80                  85

TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GGT TTG CAG GAC       463
Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp
             90                  95                 100

TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG ATG       511
Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met
         105                 110                 115

AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT GTG       559
Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val
     120                 125                 130
```

FIG.1B

【図１Ｃ】

```
GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA GCT ATG ATG GAA GGC TCA TGG       607
Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp
135                 140                 145                 150

TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT GAG GCC CAG CCA TTT GCA CAC       655
Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His
                155                 160                 165

CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC ACT       703
Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr
            170                 175                 180

CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC TGG GCC AAG ATC TCT AAC ATG       751
Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met
        185                 190                 195
```

FIG.1C

【図１Ｄ】

```
ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT TAC       799
Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr
    200                 205                 210

CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC GTA       847
Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val
215                 220                 225                 230

CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC ATC       895
Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile
                235                 240                 245

AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA AAC       943
Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn
            250                 255                 260

TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG GGA       991
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
        265                 270                 275
```

FIG.1D

【図１Ｅ】

```
                                                                    1039
TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA ATT AGC ATT CAG GTG TCC AAC
Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn
    280                 285                 290

                                                                    1087
CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT GCG ACG TAC TTT GGG GCT TTC
Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
295                 300                 305                 310

                                                                    1136
AAA GTT CAG GAC ATA GAC T GAGACTCATT TCGTGGAACA TTAGCATGGA
Lys Val Gln Asp Ile Asp
            315

                                                                    1196
TGTCCTAGAT GTTTGGAAAC TTCTTAAAAA ATGGATGATG TCTATACATG TGTAAGACTA

                                                                    1256
CTAAGAGACA TGGCCCACGG TGTATGAAAC TCACAGCCCT CTCTCTTGAG CCTGTACAGG

                                                                    1316
TTGTGTATAT GTAAAGTCCA TAGGTGATGT TAGATTCATG GTGATTACAC AACGGTTTTA
```

FIG.1E

【図１Ｆ】

```
                                                                    1376
CAATTTTGTA ATGATTTCCT AGAATTGAAC CAGATTGGGA GAGGTATTCC GATGCTTATG

                                                                    1436
AAAAACTTAC ACGTGAGCTA TGGAAGGGGG TCACAGTCTC TGGGTCTAAC CCCTGGACAT

                                                                    1496
GTGCCACTGA GAACCTTGAA ATTAAGAGGA TGCCATGTCA TTGCAAAGAA ATGATAGTGT

                                                                    1556
GAAGGGTTAA GTTCTTTTGA ATTGTTACAT TGCGCTGGGA CCTGCAAATA AGTTCTTTTT

                                                                    1616
TTCTAATGAG GAGAGAAAAA TATATGTATT TTTATATAAT GTCTAAAGTT ATATTTCAGG

                                                                    1676
TGTAATGTTT TCTGTGCAAA GTTTTGTAAA TTATATTTGT GCTATAGTAT TTGATTCAAA

                                                                    1736
ATATTTAAAA ATGTCTCACT GTTGACATAT TTAATGTTTT AAATGTACAG ATGTATTTAA

                                                                    1796
CTGGTGCACT TTGTAATTCC CCTGAAGGTA CTCGTAGCTA AGGGGGCAGA ATACTGTTTC

                                                                    1856
TGGTGACCAC ATGTAGTTTA TTTCTTTATT CTTTTTAACT TAATAGAGTC TTCAGACTTG
```

FIG.1F

【図１Ｇ】

```
                                                                    1916
TCAAAACTAT GCAAGCAAAA TAAATAAATA AAAATAAAAT GAATACCTTG AATAATAAGT

                                                                    1976
AGGATGTTGG TCACCAGGTG CCTTTCAAAT TTAGAAGCTA ATTGACTTTA GGAGCTGACA

                                                                    2036
TAGCCAAAAA GGATACATAA TAGGCTACTG AAATCTGTCA GGAGTATTTA TGCAATTATT

                                                                    2096
GAACAGGTGT CTTTTTTTAC AAGAGCTACA AATTGTAAAT TTTGTTTCTT TTTTTTCCCA

                                                                    2156
TAGAAAATGT ACTATAGTTT ATCAGCCAAA AAACAATCCA CTTTTTAATT TAGTGAAAGT

                                                                    2216
TATTTTATTA TACTGTACAA TAAAAGCATT GTCTCTGAAT GTTAATTTTT TGGTACAAAA

                                                                    2276
AATAAATTTG TACGAAAACC TGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGGG CGGCCGCTCT

                                                                    2295
AGAGGGCCCT ATTCTATAG
```

FIG.1G

【図２Ａ】

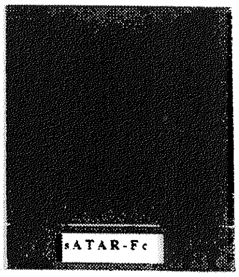
FIG.2A

【図２Ｂ】

FIG.2B

【図２Ｃ】

FIG.2C



【図３】

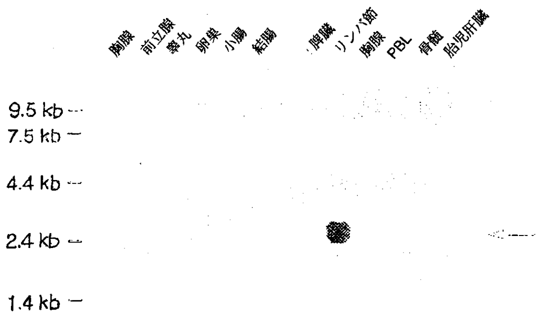


FIG.3

【図４Ａ】

```
10                       30                       50
AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTACTCGACCCACGCGTCCGCGCGCCCCAGGAGCC

70                       90                       110
AAAGCCGGGCTCCAAGTCGGCGCCCCACGTCGAGGCTCCGCCGCAGCCTCCGGAGTTGGC

130                      150                      170
CGCAGACAAGAAGGGGAGGGAGCGGGAGAGGGAGGAGAGCTCCGAAGCGAGAGGGCCGAG

190                      210                      230
CGCCATGCGCCGCGCCAGCAGAGACTACACCAAGTACCTGCGTGGCTCGGAGGAGATGGG
      M  R  R  A  S  R  D  Y  T  K  Y  L  R  G  S  E  E  M  G

250                      270                      290
CGGCGGCCCCGGAGCCCCGCACGAGGGCCCCCTGCACGCCCCGCCGCCGCCTGCGCCGCA
 G  G  P  G  A  P  H  E  G  P  L  H  A  P  P  P  P  A  P  H

310                      330                      350
CCAGCCCCCCGCCGCCTCCCGCTCCATGTTCGTGGCCCTCCTGGGGCTGGGGCTGGGCCA
 Q  P  P  A  A  S  R  S  M  F  V  A  L  L  G  L  G  L  G  Q

370                      390                      410
GGTTGTCTGCAGCGTCGCCCTGTTCTTCTATTTCAGAGCGCAGATGGATCCTAATAGAAT
 V  V  C  S  V  A  L  F  F  Y  F  R  A  Q  M  D  P  N  R  I
```

FIG.4A

【図４Ｂ】

```
430                      450                      470
ATCAGAAGATGGCACTCACTGCATTTATAGAATTTTGAGACTCCATGAAAATGCAGATTT
 S  E  D  G  T  H  C  I  Y  R  I  L  R  L  H  E  N  A  D  F

490                      510                      530
TCAAGACACAACTCTGGAGAGTCAAGATACAAAATTAATACCTGATTCATGTAGGAGAAT
 Q  D  T  T  L  E  S  Q  D  T  K  L  I  P  D  S  C  R  R  I

550                      570                      590
TAAACAGGCCTTTCAAGGAGCTGTGCAAAAGGAATTACAACATATCGTTGGATCACAGCA
 K  Q  A  F  Q  G  A  V  Q  K  E  L  Q  H  I  V  G  S  Q  H

610                      630                      650
CATCAGAGCAGAGAAAGCGATGGTGGATGGCTCATGGTTAGATCTGGCCAAGAGGAGCAA
 I  R  A  E  K  A  M  V  D  G  S  W  L  D  L  A  K  R  S  K

670                      690                      710
GCTTGAAGCTCAGCCTTTTGCTCATCTCACTATTAATGCCACCGACATCCCATCTGGTTC
 L  E  A  Q  P  F  A  H  L  T  I  N  A  T  D  I  P  S  G  S

730                      750                      770
CCATAAAGTGAGTCTGTCCTCTTGGTACCATGATCGGGGTTGGGCCAAGATCTCCAACAT
 H  K  V  S  L  S  S  W  Y  H  D  R  G  W  A  K  I  S  N  M
```

FIG.4B

【図４Ｃ】

```
790                      810                      830
GACTTTTAGCAATGGAAAACTAATAGTTAATCAGGATGGCTTTTATTACCTGTATGCCAA
 T  F  S  N  G  K  L  I  V  N  Q  D  G  F  Y  Y  L  Y  A  N

850                      870                      890
CATTTGCTTTCGACATCATGAAACTTCAGGAGACCTAGCTACAGAGTATCTTCAACTAAT
 I  C  F  R  H  H  E  T  S  G  D  L  A  T  E  Y  L  Q  L  M

910                      930                      950
GGTGTACGTCACTAAAACCAGCATCAAAATCCCAAGTTCTCATACCCTGATGAAAGGAGG
 V  Y  V  T  K  T  S  I  K  I  P  S  S  H  T  L  M  K  G  G

970                      990                      1010
AAGCACCAAGTATTGGTCAGGGAATTCTGAATTCCATTTTTATTCCATAAACGTTGGTGG
 S  T  K  Y  W  S  G  N  S  E  F  H  F  Y  S  I  N  V  G  G

1030                     1050                     1070
ATTTTTTAAGTTACGGTCTGGAGAGGAAATCAGCATCGAGGTCTCCAACCCCTCCTTACT
 F  F  K  L  R  S  G  E  E  I  S  I  E  V  S  N  P  S  L  L

1090                     1110                     1130
GGATCCGGATCAGGATGCAACATACTTTGGGGCTTTTAAAGTTCGAGATATAGATTGAGC
 D  P  D  Q  D  A  T  Y  F  G  A  F  K  V  R  D  I  D
```

FIG.4C

【図４Ｄ】

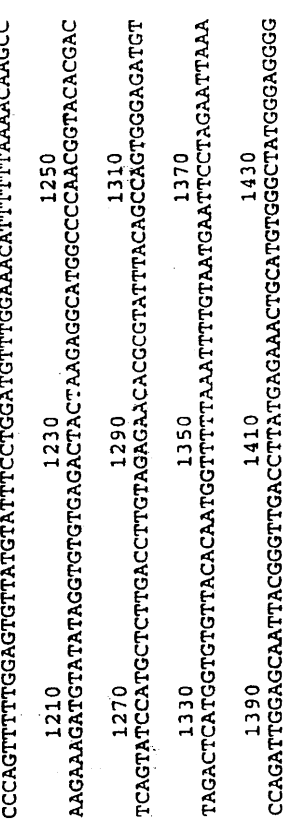


FIG.4D

【図４Ｅ】

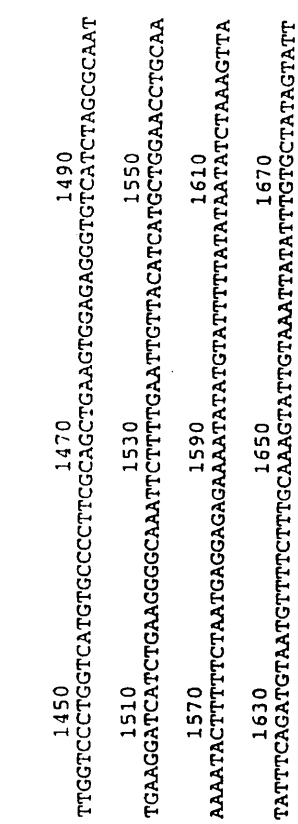


FIG.4E

【図４Ｆ】

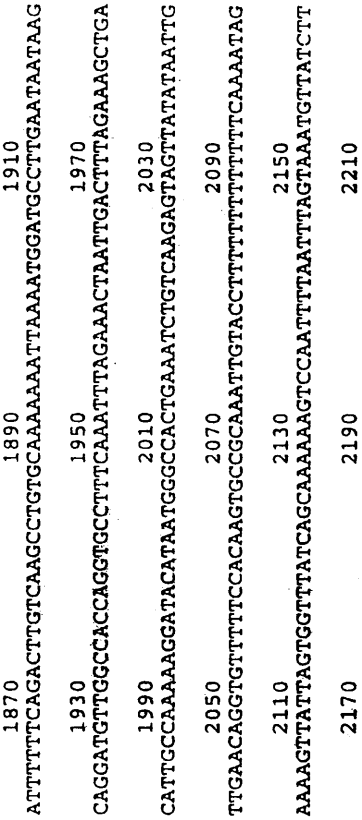


FIG.4F

【図５】

FIG. 5

【図６】

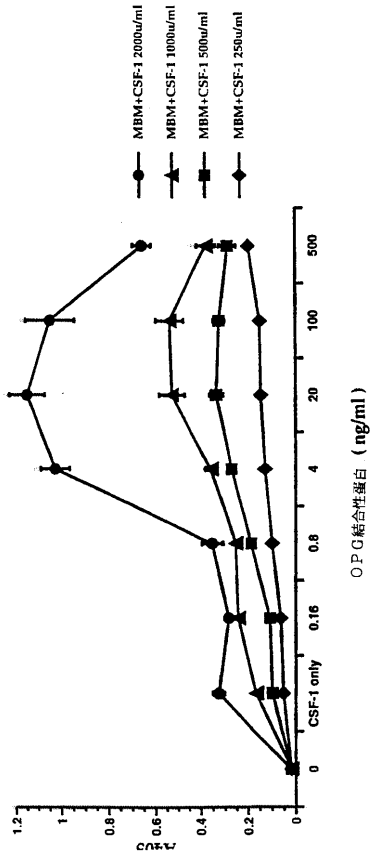
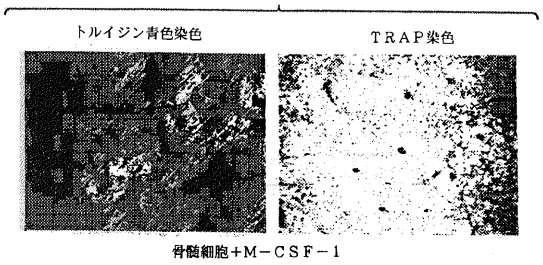


FIG. 6

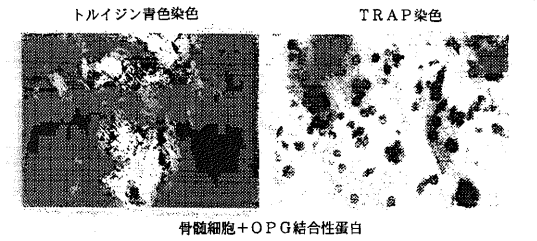
【図７Ａ】

FIG.7A



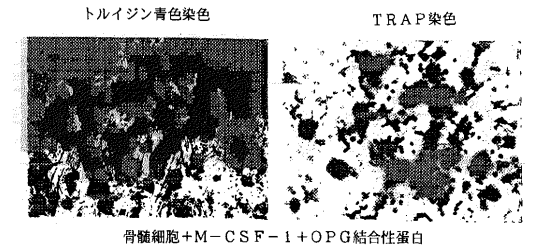
【図７Ｂ】

FIG.7B



【図７Ｃ】

FIG.7C



【図８】

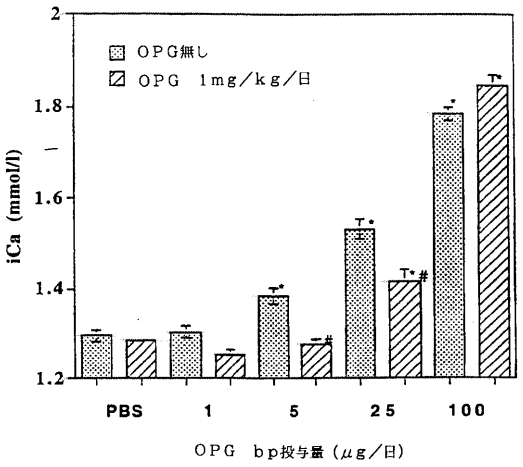


FIG. 8

【図９Ａ】

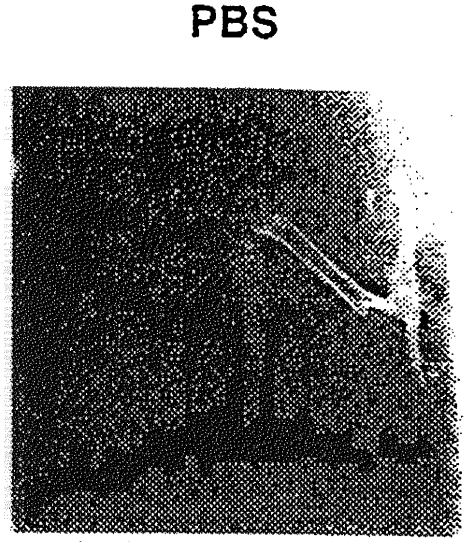


FIG.9A

【図９Ｂ】

FIG.9B

【図９Ｃ】

FIG.9C

【図９Ｄ】

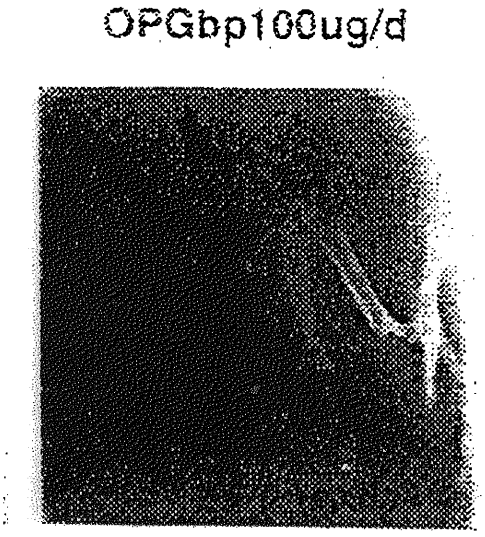


FIG.9D

【図10A】

```
          10                  30                  50
ACTCGACCCACGCGTCCGCCCGCCCGCACCGCGCCATGGACCCGCGCGCCCGGCGGCGCC
                                    M  D  P  R  A  R  R  R  R
          70                  90                 110
GCCAGCTGCCCGCGCCGCTGCTGGCGCTCTGCGTGCTGCTCGTTCCACTGCAGGTGACTC
   Q  L  P  A  P  L  L  A  L  C  V  L  L  V  P  L  Q  V  T  L
         130                 150                 170
TCCAGGTCACTCCTCCATGCACCCAGGAGAGGCATTATGAGCATCTCGGACGGTGTTGCA
   Q  V  T  P  P  C  T  Q  E  R  H  Y  E  H  L  G  R  C  C  S
         190                 210                 230
GCAGATGCGAACCAGGAAAGTACCTGTCCTCTAAGTGCACTCCTACCTCCGACAGTGTGT
   R  C  E  P  G  K  Y  L  S  S  K  C  T  P  T  S  D  S  V  C
         250                 270                 290
GTCTGCCCTGTGGCCCCGATGAGTACTTGGACACCTGGAATGAAGAAGATAAATGCTTGC
   L  P  C  G  P  D  E  Y  L  D  T  W  N  E  E  D  K  C  L  L
         310                 330                 350
TGCATAAAGTCTGTGATGCAGGCAAGGCCCTGGTGGCGGTGGATCCTGGCAACCACACGG
   H  K  V  C  D  A  G  K  A  L  V  A  V  D  P  G  N  H  T  A
```

FIG.10A

【図10B】

```
          370                 390                 410
CCCCGCGTCGCTGTGCTTGCACGGCTGGCTACCACTGGAACTCAGACTGCGAGTGCTGCC
   P  R  R  C  A  C  T  A  G  Y  H  W  N  S  D  C  E  C  C  R
          430                 450                 470
GCAGGAACACGGAGTGTGCACCTGGCTTCGGAGCTCAGCATCCCTTGCAGCTCAACAAGG
   R  N  T  E  C  A  P  G  F  G  A  Q  H  P  L  Q  L  N  K  D
          490                 510                 530
ATACGGTGTGCACACCCTGCCTCCTGGGCTTCTTCTCAGATGTCTTTTCGTCCACAGACA
   T  V  C  T  P  C  L  L  G  F  F  S  D  V  F  S  S  T  D  K
          550                 570                 590
AATGCAAACCTTGGACCAACTGCACCCTCCTTGGAAAGCTAGAAGCACACCAGGGGACAA
   C  K  P  W  T  N  C  T  L  L  G  K  L  E  A  H  Q  G  T  T
          610                 630                 650
CGGAATCAGATGTGGTCTGCAGCTCTTCCATGACACTGAGGAGACCACCCAAGGAGGCCC
   E  S  D  V  V  C  S  S  S  M  T  L  R  R  P  P  K  E  A  Q
```

FIG.10B

【図10C】

```
          670                 690                 710
AGGCTTACCTGCCCAGTCTCATCGTTCTGCTCCTCTTCATCTCTGTGGTAGTAGTGGCTG
   A  Y  L  P  S  L  I  V  L  L  L  F  I  S  V  V  V  V  A  A
          730                 750                 770
CCATCATCTTCGGCGTTTACTACAGGAAGGGAGGGAAAGCGCTGACAGCTAATTTGTGGA
   I  I  F  G  V  Y  Y  R  K  G  G  K  A  L  T  A  N  L  W  N
          790                 810                 830
ATTGGGTCAATGATGCTTGCAGTAGTCTAAGTGGAAATAAGGAGTCCTCAGGGGACCGTT
   W  V  N  D  A  C  S  S  L  S  G  N  K  E  S  S  G  D  R  C
          850                 870                 890
GTGCTGGTTCCCACTCGGCAACCTCCAGTCAGCAAGAAGTGTGTGAAGGTATCTTACTAA
   A  G  S  H  S  A  T  S  S  Q  Q  E  V  C  E  G  I  L  L  M
          910                 930                 950
TGACTCGGGAGGAGAAGATGGTTCCAGAAGACGGTGCTGGAGTCTGTGGGCCTGTGTGTG
   T  R  E  E  K  M  V  P  E  D  G  A  G  V  C  G  P  V  C  A
          970                 990                1010
CGGCAGGTGGGCCCTGGGCAGAAGTCAGAGATTCTAGGACGTTCACACTGGTCAGCGAGG
   A  G  G  P  W  A  E  V  R  D  S  R  T  F  T  L  V  S  E  V
```

FIG.10C

【図10D】

```
         1030                1050                1070
TTGAGACGCAAGGAGACCTCTCGAGGAAGATTCCCACAGAGGATGAGTACACGGACCGGC
   E  T  Q  G  D  L  S  R  K  I  P  T  E  D  E  Y  T  D  R  P
         1090                1110                1130
CCTCGCAGCCTTCGACTGGTTCACTGCTCCTAATCCAGCAGGGAAGCAAATCTATACCCC
   S  Q  P  S  T  G  S  L  L  L  I  Q  Q  G  S  K  S  I  P  P
         1150                1170                1190
CATTCCAGGAGCCCCTGGAAGTGGGGGAGAACGACAGTTTAAGCCAGTGTTTCACCGGGA
   F  Q  E  P  L  E  V  G  E  N  D  S  L  S  Q  C  F  T  G  T
         1210                1230                1250
CTGAAAGCACGGTGGATTCTGAGGGCTGTGACTTCACTGAGCCTCCGAGCAGAACTGACT
   E  S  T  V  D  S  E  G  C  D  F  T  E  P  P  S  R  T  D  S
         1270                1290                1310
CTATGCCCGTGTCCCCTGAAAAGCACCTGACAAAAGAAATAGAAGGTGACAGTTGCCTCC
   M  P  V  S  P  E  K  H  L  T  K  E  I  E  G  D  S  C  L  P
         1330                1350                1370
CCTGGGTGGTCAGCTCCAACTCAACAGATGGCTACACAGGCAGTGGGAACACTCCTGGGG
   W  V  V  S  S  N  S  T  D  G  Y  T  G  S  G  N  T  P  G  E
```

FIG.10D

【図１０Ｅ】

```
1390        1410        1430
AGGACCATGAACCCTTTCCAGGGTCCCTGAAATGTGGACCATTGCCCCAGTGTGCCTACA
 D  H  E  P  F  P  P  G  G  S  L  K  C  G  P  L  P  Q  C  A  Y  S
      1450        1470        1490
GCATGGGCTTTCCCAGTGAAGCAGCCAGCCATGGCAGAGGCGGGAGTACGGCCCCAGG
 M  G  F  P  S  E  A  A  A  S  M  A  E  A  G  V  R  P  Q  D
      1510        1530        1550
ACAGGGCTGATGAGAGGGGAGCCTCAGGGTCCGGGAGCTCCCCCAGTGACCAGCCACCTG
 R  A  D  E  R  G  A  S  G  G  S  S  P  S  D  Q  P  P  A
      1570        1590        1610
CCTCTGGGAACGTGACTGGAAACAGTAACTCCACGTTCATCTCTAGCGGGCAGGTGATGA
 S  G  N  V  T  G  N  S  N  S  T  F  I  S  S  G  Q  V  M  N
      1630        1650        1670
ACTTCAAGGGTGACATCATCGTGGTGTATGTCAGCCAGACCTCGCAGGAGGCCCGGGTT
 F  K  G  D  I  I  V  V  Y  V  S  Q  T  S  Q  E  G  P  G  S
      1690        1710        1730
CCGCAGAGCCCGAGTCGGAGCCCGTGGGCCGCCCTGTGCAGGAGGAGACGCTGGCACACA
 A  E  P  E  S  E  P  V  G  R  P  V  Q  E  E  T  L  A  H  R
```

FIG.10E

【図１０Ｆ】

```
1750        1770        1790
GAGACTCCTTTGCGGGCACCGCGCCGCGCTTCCCCGACGTCTGTGCCACCGGGGCTGGGC
 D  S  F  A  G  T  A  P  R  F  P  D  V  C  A  T  G  A  G  L
      1810        1830        1850
TGCAGGAGCAGGGGGCACCCCGGCAGAAGGACGGGACATCGCGGCCGGTGCAGGAGCAGG
 Q  E  Q  G  A  P  R  Q  K  D  G  T  S  R  P  V  Q  E  Q  G
      1870        1890        1910
GTGGGGCGCAGACTTCACTCCATACCCAGGGGTCCGGACAATGTGCAGAATGACCTCACC
 G  A  Q  T  S  L  H  T  Q  G  S  G  Q  C  A  E
      1930        1950        1970
TTCTCTGTCTGCCCTGGGTGCAGGGCACCAGTGCCTTTCCAAAAACATGGTGTAGCTAGC
      1990        2010        2030
CACTGTGCACCTCCTCACTGGTGCAGGCTGCTGGCATGGTGATGGAGCCCACCTCTCACT
      2050        2070
TCCTCCAGTGCCCCTCTCCTCTGCCTCCTAC
```

FIG.10F

【図１１Ａ】

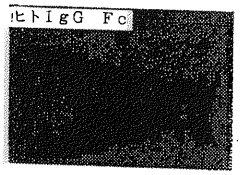


FIG.11A

【図１１Ｂ】

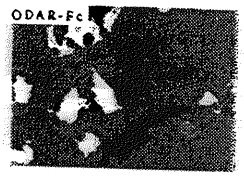


FIG.11B

【図１１Ｃ】

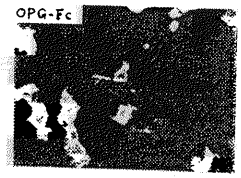


FIG.11C

【図１２Ａ】

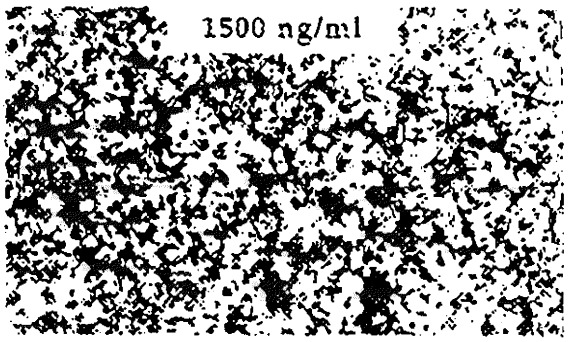


FIG.12A

【図１２Ｂ】

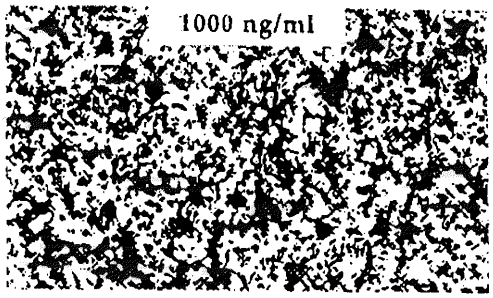


FIG.12B

【図１２Ｃ】

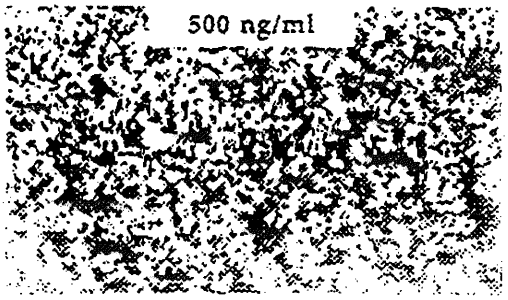


FIG.12C

【図１２Ｄ】

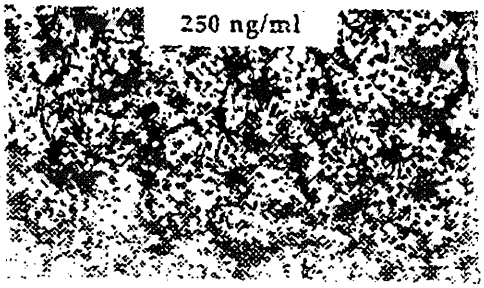


FIG.12D

【図１２Ｅ】

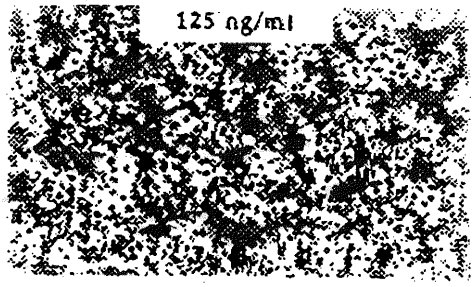


FIG.12E

【図１２Ｆ】

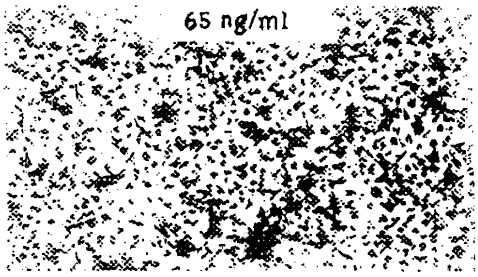
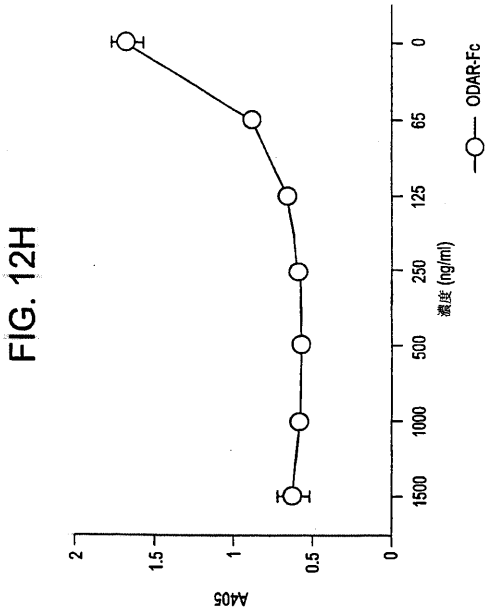


FIG.12F

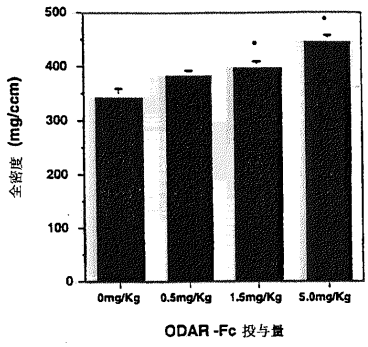
【図１２Ｇ】

FIG.12G

【図１２Ｈ】



【図１３】



＊ ビヒクル処理対照との差ｐ＜０．０５

FIG.13

【配列表】
2013028622000001.app

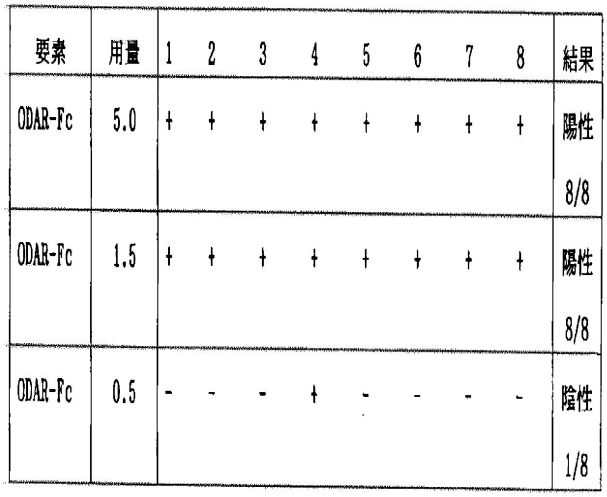
フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ　1/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00　１０１	
		Ａ６１Ｐ	1/02	

专利名称(译)	骨保护素结合蛋白和受体		
公开(公告)号	JP2013028622A	公开(公告)日	2013-02-07
申请号	JP2012201172	申请日	2012-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	每次Amujien酒店股份有限公司的Rete		
[标]发明人	ウイリアムジエイボイル		
发明人	ウイリアム·ジエイ·ボイル		
IPC分类号	A61K39/395 A61P19/08 A61P19/10 A61P3/14 A61P19/02 A61P29/00 A61P1/02 G01N33/53 A61K31/70 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K48/00 A61P19/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/12 C12P21/08 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P1/02 A61P3/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 C07K14/70575 C07K14/70578 C07K2319/30		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N A61K39/395.D A61P19/08 A61P19/10 A61P3/14 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P1/02 A61K39/395.NZN.A		
F-TERM分类号	4C085/AA06 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE03		
优先权	08/842842 1997-04-16 US 08/880855 1997-06-23 US 09/052521 1998-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供包含与破骨细胞分化有关的多肽的药物组合物。 基于破骨细胞成熟与骨保护素的亲和力，鉴定出一种与破骨细胞成熟相关的新型多肽。 还描述了编码多肽，或其片段，类似物或衍生物的核酸序列，用于生产的载体和宿主细胞，制备骨保护素结合蛋白的方法以及结合测定。 还提供了用于治疗骨疾病例如骨质疏松症，由于关节炎或转移引起的骨质流失，高钙血症和佩吉特氏病的组合物和方法。 还描述了骨保护蛋白结合蛋白的受体。 受体，激动剂和拮抗剂可用于治疗骨骼疾病。 [选择图]无



要素	用量	1	2	3	4	5	6	7	8	結果
ODAR-Fc	5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	陽性 8/8
ODAR-Fc	1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	陽性 8/8
ODAR-Fc	0.5	-	-	-	+	-	-	-	-	陰性 1/8