(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5149070号
(P5149070)
(45)発行日　平成25年2月20日(2013.2.20)　(24)登録日　平成24年12月7日(2012.12.7)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 ZNAA
C07K 14/475 (2006.01)　C07K 14/475

請求項の数 19　(全 90 頁)

(21)出願番号	特願2008-132454 (P2008-132454)	(73)特許権者	595148888
(22)出願日	平成20年5月20日 (2008.5.20)		ストライカー　コーポレイション
(62)分割の表示	特願2005-178654 (P2005-178654)の分割		ＳＴＲＹＫＥＲ　ＣＯＲＰＯＲＡＴＩＯＮ アメリカ合衆国ミシガン州４９００２，カラマズー，エアヴュー・ブールヴァード２８２５
原出願日	平成11年10月7日 (1999.10.7)		
(65)公開番号	特開2008-237223 (P2008-237223A)	(74)代理人	100078282
(43)公開日	平成20年10月9日 (2008.10.9)		弁理士　山本　秀策
審査請求日	平成20年5月20日 (2008.5.20)	(74)代理人	100062409
審判番号	不服2009-9146 (P2009-9146/J1)		弁理士　安村　高明
審判請求日	平成21年4月27日 (2009.4.27)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	60/103,418		弁理士　森下　夏樹
(32)優先日	平成10年10月7日 (1998.10.7)		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(31)優先権主張番号	09/374,958		
(32)優先日	平成11年8月16日 (1999.8.16)		
(33)優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＴＧＦ－βスーパーファミリー間のキメラタンパク質

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つ以上のアミノ酸残基置換を含み、そして非置換ＢＭＰ－５と比較して改善されたリフォールディング特性を有する、ＢＭＰ－５変異体であって、該アミノ酸置換の各々は、以下：
配列番号５２のアミノ酸残基６８～９８位によって定義されるＢＭＰ－５のフィンガー２サブドメインにおけるアミノ酸残基６８位、７１位、７３位、７４位、９２位、９３位および９７位からなる群より選択されるアミノ酸残基位置における、アルギニン、グルタミン酸またはアスパラギン酸への置換から独立して選択され；そして
該ＢＭＰ－５変異体は該非置換ＢＭＰ－５の生物学的活性を維持する、
ＢＭＰ－５変異体。
【請求項２】
前記アミノ酸置換が、アスパラギン酸またはグルタミン酸へのものである、請求項１に記載のＢＭＰ－５変異体。
【請求項３】
前記アミノ酸置換がアルギニンへのものである、請求項１に記載のＢＭＰ－５変異体。
【請求項４】
前記改善されたリフォールディング特性が、約６．０～９．０の範囲のｐＨにおける改善されたインビトロリフォールディング特性である、請求項１に記載のＢＭＰ－５変異体。
【請求項５】

前記非置換ＢＭＰ－５の約１％未満が、約６．０～９．０の範囲のｐＨでの適切なリフォールディング条件下で、インビトロでダイマーとしてリフォールディングされる、請求項１に記載のＢＭＰ－５変異体。

【請求項６】

請求項１～５のいずれか１項に記載のＢＭＰ－５変異体をコードするＤＮＡ配列を含む、単離された核酸。

【請求項７】

ＢＭＰ－５タンパク質のリフォールディング能力を改善するための方法であって、該方法は、

ＢＭＰ－５のフィンガー２サブドメインにおいて１つ以上のアミノ酸置換を導入する工程を包含し、ここで、

該アミノ酸置換の各々は、配列番号５２のアミノ酸残基６８～９８位によって定義されるＢＭＰ－５のフィンガー２サブドメインにおけるアミノ酸残基６８位、７１位、７３位、７４位、９２位、９３位および９７位からなる群より選択されるアミノ酸残基位置における、アルギニン、グルタミン酸またはアスパラギン酸への置換から独立して選択される、方法。

【請求項８】

生物学的に活性なダイマー種を生成する適切なリフォールディング条件下で、ＢＭＰ－５をインビトロで折り畳む方法であって、該ＢＭＰ－５は、適切なリフォールディング条件下で約１％未満のリフォールディングされたダイマー種を生成することが特徴付けられ、該方法は、以下の工程：

（ａ）１つ以上のアミノ酸置換を含むＢＭＰ－５を生成する工程であって、該アミノ酸置換の各々は、以下：

配列番号５２のアミノ酸残基６８～９８位によって定義されるＢＭＰ－５のフィンガー２サブドメインにおけるアミノ酸残基６８位、７１位、７３位、７４位、９２位、９３位および９７位からなる群より選択されるアミノ酸残基位置における、アルギニン、グルタミン酸またはアスパラギン酸への置換から独立して選択される、工程、および

（ｂ）工程（ａ）の該ＢＭＰ－５変異体を、約ｐＨ６～９の範囲のｐＨでフォールディングさせて、生物学的に活性なダイマー種を生成する工程

を包含する、

方法。

【請求項９】

工程（ｂ）の前に、界面活性剤の存在下で前記変異体を可溶化するさらなる工程を包含する、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

改善されたリフォールディング特性を有するＢＭＰ－５を生成する方法であって、該方法は、以下：

（ａ）１つ以上のアミノ酸置換を含むＢＭＰ－５変異体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を、宿主細胞に提供する工程であって、該アミノ酸置換の各々は、以下：

（ｉ）配列番号５２のアミノ酸残基６８～９８位によって定義されるＢＭＰ－５のフィンガー２サブドメインにおけるアミノ酸残基６８位、７１位、７３位、７４位、９２位、９３位および９７位からなる群より選択されるアミノ酸残基位置における、アルギニン、グルタミン酸またはアスパラギン酸への置換から独立して選択される、工程；

（ｂ）該変異体の発現を可能にする条件下で、工程（ａ）の該核酸でトランスフェクトした該細胞を培養する工程；

（ｃ）該変異体を他の細胞成分および培養培地成分から単離する工程；および

（ｄ）適切なリフォールディング条件下で、該変異体をインビトロでリフォールディングさせる工程

を包含する、

方法。

【請求項１１】
前記アミノ酸置換が、グルタミン酸またはアスパラギン酸へのものである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記アミノ酸置換が、アルギニンへのものである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
請求項１～５のいずれか１項に記載のＢＭＰ－５変異体の形態学的に有効な量を含む、組織形態形成を誘導するための組成物。
【請求項１４】
前記組織が、骨、非鉱化骨格組織、歯組織、結合組織、脳、肝臓および神経からなる群より選択される、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記アミノ酸置換がさらに、（ｉ）配列番号５２のアミノ酸残基９８位のアミノ酸残基位置における、アラニンへの置換、または（ｉｉ）配列番号５２のアミノ酸残基１０２位のアミノ酸残基位置における、アルギニンへの置換を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載のＢＭＰ－５変異体。
【請求項１６】
前記アミノ酸置換がさらに、（ｉ）配列番号５２のアミノ酸残基９８位のアミノ酸残基位置における、アラニンへの置換、または（ｉｉ）配列番号５２のアミノ酸残基１０２位のアミノ酸残基位置における、アルギニンへの置換を含む、請求項７～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
請求項１５に記載のＢＭＰ－５変異体をコードするＤＮＡ配列を含む、単離された核酸。
【請求項１８】
請求項１５に記載のＢＭＰ－５変異体の形態学的に有効な量を含む、組織形態形成を誘導するための組成物。
【請求項１９】
前記組織が、骨、非鉱化骨格組織、歯組織、結合組織、脳、肝臓および神経からなる群より選択される、請求項１８に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、本願と同日に提出された、同時係属中の出願番号第Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０９／３７５，３３３号、および同第０９／３７４，９５８号（代理人登録番号第ＳＴＫ－０７５号および同第ＳＴＫ－０７６号）の全体の開示を参照して本明細書中で引用する。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、改変されたタンパク質、および改変されたタンパク質をコードするＤＮＡに関する。これらのＤＮＡは、改変された形態形成タンパク質を含む、構造的に関連するタンパク質のＴＧＦ－βスーパーファミリーに由来する、生合成された構築物、化学合成された構築物。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
ＴＧＦ－βスーパーファミリーは、いくつかを挙げると、５個の異なる形態のＴＧＦ－β（ＳｐｏｒｎおよびＲｏｂｅｒｔｓ（１９９０）、Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ、ＳｐｏｒｎおよびＲｏｂｅｒｔｓ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ：Ｂｅｒｌｉｎ、４１９－４７２頁）、ならびに分化因子Ｖｇ－１（ＷｅｅｋｓおよびＭｅ

ｌｔｏｎ（１９８７）、Ｃｅｌｌ　５１：８６１－８６７）、ＤＰＰ－Ｃポリペプチド（Ｐａｄｇｅｔｔら（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ　３２５：８１－８４）、ホルモンアクチビンおよびインヒビン（Ｉｎｈｉｂｉｎ）（Ｍａｓｏｎら（１９８５）、Ｎａｔｕｒｅ　３１８：６５９－６６３；Ｍａｓｏｎら（１９８７）、Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒｓ　１：７７－８８）、Ｍｕｌｌｅｒｉａｎ阻害物質、ＭＩＳ（Ｃａｔｅら（１９８６）、Ｃｅｌｌ　４５：６８５－６９８）、骨形成タンパク質および形態形成タンパク質ＯＰ－１（ＰＣＴ／ＵＳ９０／０５９０３）、ＯＰ－２（ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７６５４）、ＯＰ－３（ＰＣＴ／ＷＯ９４／１０２０２）、ＢＭＰ（米国特許第４，８７７，８６４号；同第５，１４１，９０５号；同第５，０１３，６４９号；同第５，１１６，７３８号；同第５，１０８，９２２号；同第５，１０６，７４８号；および同第５，１５５，０５８号を参照のこと）、発生的に調節されるタンパク質Ｖｇｒ－１（Ｌｙｏｎｓら（１９８９）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：４５５４－４５５８）、ならびに成長／分化因子ＧＤＦ－１、ＧＤＦ－３、ＧＤＦ－９、およびドルサリン－１（ｄｏｒｓａｌｉｎ－１）（ＭｃＰｈｅｒｒｏｎら（１９９３）、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：３４４４－３４４９；Ｂａｓｌｅｒら（１９９３）、Ｃｅｌｌ　７３：６８７－７０２）を含む。

【０００４】

ＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質は、ジスルフィド結合されたホモ－またはヘテロダイマーである。これらは、疎水性のシグナル配列、長くそしてそれほど保存されていない数１００個のアミノ酸のＮ末端プロ領域配列、切断部位、ファミリーメンバーの間で変化するＮ末端領域を含む成熟ドメイン、および高度に保存されているＣ末端領域を含有する、大きな前駆体ポリペプチド鎖として発現される。全ての既知のファミリーのメンバーのプロセシングされた成熟タンパク質中に存在するこのＣ末端領域は、約１００個のアミノ酸を含み、保存されている６個または７個のシステイン骨格を有する特徴的なシステインモチーフを伴う。成熟領域とプロ領域との間の切断部位の位置は、ファミリーメンバー間で変化するが、全てのタンパク質のＣ末端のシステインパターンは同一の形式であり、配列Ｃｙｓ－Ｘ－Ｃｙｓ－Ｘで終結する（ＳｐｏｒｎおよびＲｏｂｅｒｔｓ（１９９０）、前出）。

【０００５】

ＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質の生物学の統一の特徴は、軟骨内性骨の形態形成を含む、発生プロセスを調節するそれらの能力である。これらの構造的に関連するタンパク質は、種々の発生事象に関与することが同定されている。例えば、ＴＧＦ－βおよびインヒビン／アクチビングループのポリペプチドは、細胞増殖および細胞分化の調節において役割を果たすようである。ＭＩＳは、哺乳動物の雄性の胚の発生においてミュラー管の退行を生じ、そしてＤｒｏｓｏｐｈｉａ　ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ複合体の遺伝子産物であるｄｐｐは、適切な背部－腹部（ｄｏｒｓａｌ－ｖｅｎｔｒａｌ）の特異化に必要である。同様に、Ｖｇ－１は、Ｘｅｎｏｐｕｓにおいては中胚葉の誘導に関連し、そしてＶｇｒ－１は、発生中のマウスの種々の組織において同定されている。骨形成に関しては、ＴＧＦ－βスーパーファミリー中のタンパク質（例えば、ＯＰ－１およびＢＭＰ（骨形態形成タンパク質）として同定されている他のタンパク質のサブセット）が、主要な役割を果たす。ＯＰ－１（ＢＭＰ－７）および他の骨形成タンパク質は、組換え技術を使用して産生されており（米国特許第５，０１１，６９１号およびＰＣＴ出願番号第ＵＳ９０／０５９０３号）、そしてインビボで実際に軟骨内性骨の形成を誘導することが可能であることが示されている。一般的には、骨形成タンパク質は、当該分野では、成長因子のＴＧＦ－βスーパーファミリーのサブグループとして分類されている（Ｈｏｇａｎ（１９９６）、Ｇｅｎｅｓ　＆　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、１０：１５８０－１５９４）。

【０００６】
最近、タンパク質のこの同じファミリーの特定のメンバーが、形態形成性（すなわち、成熟哺乳動物において組織形態形成の発生的カスケードを誘導し得る）であることが認識されている（ＰＣＴ出願番号第ＵＳ９２／０１９６８号を参照のこと）。詳細には、これらモルフォゲンは、関連付けられていない前駆細胞の増殖を誘導し得、そして適切な環境条件下で組織特異的様式でこれらの刺激された前駆細胞の分化を誘導し得る。さらに、モルフォゲンは、これらの分化した細胞の増殖および維持を支持し得る。これらの形態形成性活性は、これらのタンパク質が、適切な形態形成許容的環境において、組織形態形成の発生カスケードを開始および維持することを可能にし、この発生カスケードは、幹細胞の組織特異的様式での増殖および分化を刺激し、そして新しい組織形成が最高点に達する事象の進行を誘導する。これらの形態形成活性はまた、これらのタンパク質が、それ以前にそれらの分化の経路から外れるように刺激された細胞の「再分化」を誘導することを可能にする。適切な環境条件下では、これらのモルフォゲンがまた関連付けられた細胞の「再分化」を刺激し得ることが予想される。
【０００７】
タンパク質のこの形態形成性のクラスのメンバーとして、いくつかを挙げると、哺乳動物骨形成タンパク質－１（ＯＰ－１（ＢＭＰ－７としてもまた公知である）、およびＤｒｏｓｏｐｈｉｌａホモログ６０Ａ）、骨形成タンパク質－２（ＯＰ－２（ＢＭＰ－８としてもまた公知である））、骨形成タンパク質－３（ＯＰ－３）、ＢＭＰ－２（ＢＭＰ－２ＡまたはＣＢＭＰ－２Ａとしてもまた公知である、およびＤｏｒｏｓｐｈｉｌａホモログＤＰＰ）、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－４（ＢＭＰ－２ＢまたはＣＭＢＰ－２Ｂとしてもまた公知である）、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６およびそのマウスホモログＶｇｒ－１、ＢＭＰ－９、ＢＭＰ－１０、ＢＭＰ－１１、ＢＭＰ－１２、ＧＤＦ３（Ｖｇｒ２としてもまた公知である）、ＧＤＦ－８、ＧＤＦ－９、ＧＤＦ－１０、ＧＤＦ－１１、ＧＤＦ－１２、ＢＭＰ－１３、ＢＭＰ－１４、ＢＭＰ－１５、ＧＤＦ－５（ＣＤＭＰ－１またはＭＰ５２としてもまた公知である）、ＧＤＦ－６（ＣＤＭＰ－２またはＢＭＰ－１３としてもまた公知である）、ＧＤＦ－７（ＣＤＭＰ－３またはＢＭＰ－１２としてもまた公知である）、ＸｅｎｏｐｕｓホモログＶｇ１およびＮＯＤＡＬ、ＵＮＩＶＩＮ、ＳＣＲＥＷ、ＡＤＭＰ、およびＮＥＵＲＡＬが挙げられる。
【０００８】
例示的なファミリーメンバーを使用する模式化によって、ＴＧＦ－β２およびＯＰ－１の両方の三次および四次構造が決定されている。ＴＧＦ－β２およびＯＰ－１は、それらのそれぞれのアミノ酸配列においてわずかに約３５％のアミノ酸同一性しか示さないが、両方の分子の三次および四次構造は極めて類似している。ＴＧＦ－β２およびＯＰ－１の両方ともが天然においてダイマーであり、そして７個のＣ末端のシステイン残基のうちの６個に関与する特有のフォールディングパターンを有する。各サブユニットにおいては、４個のシステインが結合して、８個の残基の環を生じ、そして２個のさらなるシステイン残基が、その環を通って通過するジスルフィド結合を形成して、結び目様の構造を形成する。７個の保存システイン残基の最もＮ末端側のシステインに番号１を割り当てて開始する番号付けスキームを用いると、２番目と６番目のシステイン残基は、８個の残基環の一方の側面を閉じるように結合し、一方、３番目と７番目のシステイン残基がもう一方の側面を閉じるように結合する。１番目と５番目の保存システイン残基は、環の中心を通じて結合して、結び目の中心を形成する。４番目のシステインは、他のサブユニット中の対応する残基と鎖間ジスルフィド結合を形成する。
【０００９】
ＴＧＦ－β２およびＯＰ－１のモノマーサブユニットは、３つの主要な構造エ

レメントおよびＮ末端領域を含む。構造エレメントは、以下の型：（１）ループ、（２）α－ヘリックス、および（３）β－シートの５０％を超える二次構造を保有している、連続しているポリペプチド鎖の領域を作製する。さらに、これらの領域においては、Ｎ末端およびＣ末端の鎖は、７Åを超えて離れていない。１番目および２番目の保存システインの間の残基は、逆平行β－シートフィンガー（本明細書中では、フィンガー１領域（Ｆ１）と呼ばれる）によって特徴付けられる構造領域を形成する。同様に、５番目と６番目の保存システインの間の残基もまた、逆平行β－シートフィンガー（本明細書中では、フィンガー２領域（Ｆ２）と呼ばれる）を形成する。β－シートフィンガーは、一本のアミノ酸の鎖であり、これは、入口（ｅｎｔｅｒｉｎｇ）鎖および出口（ｅｘｉｔｉｎｇ）鎖が１つ以上の逆平行β－シート構造を形成するように、β－ターンまたはより大きいループによってそれ自体の上にフォールディング戻るβ鎖を含む。３番目と４番目の保存システインの間の残基を含む、第３の主要な構造領域は、本明細書中ではヒール領域（Ｈ）と呼ばれる３個のターンα－ヘリックスによって特徴付けられる。ＴＧＦ－β２およびＯＰ－１の両方のダイマーの形態においては、サブユニットは、一方のサブユニットのヒール領域が、この分子のコアを形成する、この連結サブユニットの結び目領域で、もう一方のサブユニットのフィンガー領域と接触する。４番目のシステインは、第２鎖上のその対応物とジスルフィド結合を形成し、それによって手のひら（ｐａｌｍ）の中心で鎖を等しく連結する。このように形成されたダイマーは、サブユニット間の対称な２倍軸を上から下に見た場合に、楕円形の（葉巻型）の分子である。

【００１０】

天然に存在するか、または組換えによってもしくは合成によって調製されたかにはかかわらず、ＴＧＦ－βスーパーファミリー内の真のモルフォゲン（例えば、骨形成タンパク質）は、前駆細胞の補充および刺激を誘導し得、それによって、例えば、軟骨細胞および骨芽細胞へのそれらの分化を誘導し、そしてさらに、中間体の軟骨の分化、血管新生、骨の形成、再造形、そして最終的には骨髄の分化を誘導し得る。多数の研究者らが、天然から供給されたマトリックス材料（例えば、コラーゲン）または合成によって調製されたポリマーマトリックス材料のいずれかと混合して、そうでなければ真の置換骨が生じない条件下で、真の骨形成（軟骨内での骨の形成を含む）を誘導した場合には、骨形成タンパク質の能力を実証した。例えば、マトリックス材料と組み合わせた場合には、これらの骨形成タンパク質は、いくつか名前を挙げれば、大きな断片の骨の欠失、頭蓋冠の欠失、脊椎の融合、および骨折における、新しい骨の形成を誘導する。

【００１１】

細菌および他の原核生物の発現系は、ネイティブのタンパク質、および生合成または組換えのタンパク質の両方を生成するための好ましい手段として、当該分野であてにされている。さらに、全体の化学合成は、小さいタンパク質を産生するための新しい可能性である。原核生物（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）の系は、タンパク質の商業的な量を産生するため、および天然に存在するかまたは合成によって調製された、変異体およびアナログの生物学的特性および化学的特性を評価するために、有用である。代表的には、過剰に発現される真核生物のタンパク質は、原核生物の宿主細胞中で不溶性の細胞内沈殿物（「封入体」）へと凝集する。次いで、凝集したタンパク質は封入体から回収され、１つ以上の標準的な変性剤を使用して可溶化され、次いで機能的な状態に再フォールディングされることを可能にされるか、またはそのように誘導される。化学的に合成されたタンパク質もまた、適切な再フォールディングを必要とする。

【００１２】

最適な再フォールディングは、生物学的に活性なタンパク質の構造を形成しそして安定化させるために、任意のジスルフィド結合の適切な形成を必要とする。

しかし、必ずしも全ての天然に存在するタンパク質が、可溶化された際に、容易に再フォールディングされるわけではない。再フォールディングのための化学の注意深い操作にもかかわらず、最適にフォールディングされた、安定な、そして／または生物学的に活性なタンパク質の収量は低いままである。多くの上記のタンパク質（ＢＭＰを含む）は、ほとんど再フォールディングされないタンパク質のカテゴリーに入る。例えば、ＢＭＰタンパク質ファミリーのいくつかのメンバーはインビトロで、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉまたは他の原核生物宿主中で産生された場合に比較的効率良くフォールディングされ得るが、他の多く（ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、およびＢＭＰ－７を含む）はそうされない。例えば、第ＥＰ０４３３２２５号、米国特許第５，３９９，６７７号、同第５，７５６，３０８号、および同第５，８０４，４１６号を参照のこと。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

形態形成タンパク質を含む、タンパク質のＴＧＦ－βスーパーファミリーの、組換え、化学合成、および／または生合成によるメンバーを設計し、そして首尾よく産生するための改善された手段の必要性がなお、残されている。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

（項目１）　アミノ酸残基置換を含み、そして非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質と比較して変更された特性を有する、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体であって、該アミノ酸置換は、以下：

アルギニン、イソロイシン、ロイシン、セリンおよびアラニンのいずれか１つから選択されるＣ末端アミノ酸残基；または

該タンパク質のフィンガー２サブドメインの塩基性領域における非酸性アミノ酸残基または非ヒドロキシル基保有アミノ酸残基をそれぞれ置換する、酸性アミノ酸残基またはヒドロキシル基保有アミノ酸残基

である、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目２）　前記アミノ酸置換が、ＯＰ－１（配列番号３９）における残基４２７に対応する残基で生じる、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目３）　前記アミノ酸置換が、前記フィンガー２サブドメインの塩基性領域における親水性の、非酸性残基を置換する酸性残基である、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目４）　前記フィンガー２の塩基性領域における前記置換アミノ酸残基が、アスパラギン酸またはグルタミン酸である、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目５）　前記親水性の、非酸性残基が、塩基性残基またはアミド基保有残基である、項目３に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目６）　前記アミノ酸置換が、親水性残基を置換するヒドロキシル基保有残基である、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目７）　前記フィンガー２の塩基性領域における前記置換アミノ酸残基が、セリンまたはトレオニンである、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目８）　前記親水性残基が、アミド基保有残基または塩基性残基である、項目５に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目９）　前記フィンガー２の塩基性領域における前記置換残基が、正に荷電した親水性残基またはアミド基保有親水性残基を置換する、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目１０）　前記フィンガー２サブドメインが、配列番号３９の残基３９７～４２７によって規定される配列に対応する、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目１１）　前記フィンガー２の塩基性領域が、配列番号３９の残基３９７～４０６および残基４１８～４２７によって規定される、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１２）　前記置換残基が、配列番号３９の残基３９７～４１０または残基４２０～４２７に対応する領域において生じる、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１３）　前記フィンガー２の塩基性領域における前記アミノ酸置換が、配列番号３９の残基４００、４０２、４０５、４２１、４２２および４２６のいずれか１つで生じる、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１４）　前記非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４およびＴＧＦ－β５、ＭＩＳ、ＧＤＮＦ、インヒビンα、インヒビンβＡ、インヒビンβＢおよびＢＭＰ－１１（それらの種改変体およびキメラを含む）のいずれか１つから選択される、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１５）　前記非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＧＤＦ－３、ＳＣＲＥＷ、ＮＯＤＡＬ（それらの種改変体およびキメラを含む）のいずれか１つから選択される、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１６）　前記非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２、ＯＰ－３、６０－Ａならびにそれらの種改変体およびキメラのいずれか１つから選択される、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１７）　前記非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＯＰ－１である、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目１８）　配列番号３９の残基４００、４０２、４０５、４２１、４２２および４２６に対応する残基の少なくとも１つが、酸性残基で置換されているアミノ酸配列を含む、単離されたＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体であって、ここで、該変異体が、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－１、ＯＰ－２、ＯＰ－３および６０－Ａからなる群より選択される、変異体。
（項目１９）　配列番号３９の残基４００、４０２、４０５、４２１、４２２および４２６に対応する残基の少なくとも１つが、ヒドロキシル基保有残基で置換されているアミノ酸配列を含む、単離されたＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体であって、ここで、該変異体が、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２、ＯＰ－３および６０－Ａからなる群より選択される、変異体。
（項目２０）　配列番号３９の残基４００、４０２、４０５、４２１、４２２および４２６の少なくとも１つが、酸性残基で置換されていることを除き、配列番号３９の残基３３０～４３１によって規定される配列を含む、単離されたＯＰ－１変異体。
（項目２１）　配列番号３９の残基４００、４０２、４０５、４２１、４２２および４２６の少なくとも１つが、ヒドロキシル基保有残基で置換されていることを除き、配列番号３９の残基３３０～４３１によって規定される配列を含む、単離されたＯＰ－１変異体。
（項目２２）　前記酸性残基が、アスパラギン酸またはグルタミン酸である、項目１８または２０に記載の単離された変異体。
（項目２３）　前記ヒドロキシル基保有残基が、セリンまたはトレオニンである、項目１９または２１に記載の単離された変異体。
（項目２４）　非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質と比較して、約６．０～９．０の範囲のｐＨにおける改善されたインビトロリフォールディング特性を有する、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目２５）　前記非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーの約１％未満が、約６．０～９．０の範囲のｐＨでの適切なリフォールディング条件下で、インビトロでダイマーとしてリフォールディングされる、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。

（項目２６）　非置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質と比較して、増大した水溶液中での可溶性、改善された安定性、改善されたリフォールディング、または改善された活性を有することがさらに特徴付けられる、項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体。
（項目２７）　項目１に記載のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体をコードするＤＮＡ配列を含む、単離された核酸。
（項目２８）　ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質の水溶液中での可溶性、リフォールディング能力、または活性を改善するための方法であって、該方法は、Ｃ末端フィンガー２サブドメインにおいて負に荷電した残基数を増加させる工程を包含する、方法。
（項目２９）　前記負に荷電した残基数が、少なくとも３つ増加される、項目２８に記載の方法。
（項目３０）　前記負に荷電した残基数が、少なくとも４つ増加される、項目２８に記載の方法。
（項目３１）　前記負に荷電した残基の少なくとも１つが、前記タンパク質のＣ末端フィンガー２サブドメインの塩基性領域に対応する領域で置換される、項目２８に記載の方法。
（項目３２）　前記領域が、配列番号３９の残基３９７～４０６および残基４１８～４２７に対応する、項目３１に記載の方法。
（項目３３）　前記負に荷電した残基の少なくとも１つが、非保存的位置で置換される、項目２８に記載の方法。
（項目３４）　ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質の水溶液中での可溶性、リフォールディング能力、または活性を改善するための方法であって、該方法は、該タンパク質のＣ末端フィンガー２サブドメインにおいて負に荷電した残基数を減少させる工程を包含する、方法。
（項目３５）　ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質の水溶液中での可溶性を改善するための方法であって、該方法は、フィンガー２のネックにおける正に荷電した残基またはアミド基保有親水性残基を、ヒドロキシル基保有残基と置換する工程を包含する、方法。
（項目３６）　前記ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＯＰ－１である、項目３４または３５に記載の方法。
（項目３７）　前記ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２、ＯＰ－３および６０－Ａのいずれか１つである、項目３４または３５に記載の方法。
（項目３８）　前記ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、適切なリフォールディング条件下で約１％未満のリフォールディングされたダイマー種を生成することが特徴付けられる、項目３４または３５に記載の方法。
（項目３９）　生物学的に活性なダイマー種を生成する適切なリフォールディング条件下で、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質をインビトロで折り畳む方法であって、該ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質は、適切なリフォールディング条件下で約１％未満のリフォールディングされたダイマー種を生成することが特徴付けられ、該方法は、以下の工程：
（ａ）酸性残基置換を含むＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質を生成する工程であって、該置換は、以下：
アルギニン、イソロイシン、ロイシン、セリンおよびアラニンのいずれか１つから選択されるＣ末端アミノ酸残基；または
該ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーフィンガー２サブドメインの塩基性領域における非酸性残基または親水性残基をそれぞれ置換する、酸性残基またはヒドロキシル基保有アミノ酸残基
である、工程、および

（ｂ）工程（ａ）の該ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体を、約ｐＨ６～９の範囲のｐＨでフォールディングさせて、生物学的に活性なダイマー種を生成する工程を包含する、方法。

（項目４０）　工程（ｂ）の前に、界面活性剤の存在下で前記変異体を可溶化するさらなる工程を包含する、項目３９に記載の方法。

（項目４１）　改善された特性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質を生成する方法であって、該方法は、以下：

（ａ）アミノ酸置換を含むＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を、宿主細胞に提供する工程であって、該置換は、以下：

アルギニン、イソロイシン、ロイシン、セリンおよびアラニンのいずれか１つから選択されるＣ末端アミノ酸残基；または

該タンパク質のフィンガー２サブドメインの塩基性領域における非極性残基または非酸性残基をそれぞれ置換する、極性残基または酸性残基

である、工程；

（ｂ）該変異体の発現を可能にする条件下で、工程（ａ）の該核酸でトランスフェクトした該細胞を培養する工程；

（ｃ）該変異体を他の細胞成分および培養培地成分から単離する工程；および

（ｄ）適切なリフォールディング条件下で、該変異体をインビトロでリフォールディングさせる工程

を包含する、方法。

（項目４２）　前記改善される特性が、リフォールディング、活性、可溶性または安定性である、項目４１に記載の方法。

（項目４３）　前記アミノ酸置換が、前記フィンガー２ドメインの塩基性領域における、非酸性の、親水性残基の酸性残基での置換である、項目４１に記載の方法。

（項目４４）　前記アミノ酸置換が、前記フィンガー２の塩基性領域における、ヒドロキシル基を有さない親水性残基のヒドロキシル基保有残基での置換である、項目４１に記載の方法。

（項目４５）　前記非酸性の、親水性残基が、塩基性残基である、項目４３に記載の方法。

（項目４６）　前記酸性残基が、グルタミン酸またはアスパラギン酸である、項目４１に記載の方法。

（項目４７）　前記ヒドロキシル基保有残基が、セリンまたはトレオニンである、項目４４に記載の方法。

（項目４８）　前記ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＯＰ－１である、項目４１に記載の方法。

（項目４９）　前記ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質が、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２およびＯＰ－３（それらの種改変体およびキメラを含む）のいずれか１つである、項目４１に記載の方法。

（項目５０）　前記ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーが、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４、ＴＧＦ－β５、ＭＩＳ、ＧＤＮＦ、インヒビンα、インヒビンβＡ、インヒビンβＢおよびＢＭＰ－１１（それらの種改変体およびキメラを含む）のいずれか１つである、項目４１に記載の方法。

（項目５１）　配列番号６８または配列番号６９のアミノ酸配列からなる、タンパク質変異体。

（項目５２）　組織形態形成を誘導する方法であって、該方法は、項目１、１８、１９、２０、２１または５１に記載の変異体タンパク質の形態形成有効量を投与する工程を包含する、方法。

（項目５３）　前記組織が、骨、非鉱化骨格組織、歯組織、結合組織、脳、肝臓および神経からなる群より選択される、項目５２に記載の方法。

【００１５】

（発明の要旨）
本発明は、形態形成タンパク質を含むＴＧＦ－βスーパーファミリーの改変タンパク質、およびその改変タンパク質をコードするＤＮＡを提供する。本明細書中で使用される場合、用語「改変ＴＧＦ－βスーパーファミリー」、「変異体ＴＧＦ－βスーパーファミリー」、「変異体タンパク質」、「変異体構築物」、および「変異体」とは、任意のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーの合成構築物をいう。これらの中では、特定のアミノ酸が、他のアミノ酸によって置換されているか、あるいは、１つのＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのフィンガー２サブドメインのいずれかまたはすべてが、別のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのフィンガー２サブドメインのいずれかまたはすべてによって置換されている。また、変異体タンパク質は、組換えおよび／または生合成および／または化学合成タンパク質を含むことが、本明細書中で意図される。さらに、本発明の変異体タンパク質は、天然に存在するタンパク質と比較して、変化した再フォールディングの属性を有する。本発明の変異体タンパク質は、変化した安定性、特異的活性、可溶性、生体活性、および／または生体特異性の属性を有し得、そして組織特異的標的化に有用である。

【００１６】
１つの実施態様においては、本発明は、天然の「ほとんど再フォールディングしない」タンパク質の再フォールディング特性を改善する、合成変異体タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、「ほとんど再フォールディングしない」タンパク質は、典型的な適切な再フォールディング条件下で再フォールディングするように誘導した場合に、約１％未満の最適に再フォールディングされた材料を生じる任意のタンパク質を意味する（以下を参照のこと）。詳細には、ほとんど再フォールディングしないものは、そのほとんど再フォールディングしないもののＣ末端のフィンガー２サブドメイン内の特定のアミノ酸配列変化によって、良好に再フォールディングするものへと変換される。このほとんど再フォールディングしないタンパク質のフォールディング能力はまた、このタンパク質のフィンガー２サブドメイン中の親水性残基（特に酸性（負に荷電した）残基）の数を増加することによって、増大される。

【００１７】
このフィンガー２サブドメインの塩基領域中の酸性残基の数を増加することは、未置換の親配列の再フォールディング特性と比較した場合に、この置換された配列の再フォールディング特性を改良する。このほとんど再フォールディングしないタンパク質のフォールディング能力はまた、このタンパク質のフィンガー２サブドメイン中（特に、このフィンガー２サブドメインの塩基領域中）の極性残基を保有する水酸基の数を増加することによって、増大される。さらに、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバータンパク質のＣ末端活性領域の個々のサブドメインが、所望の生物学的または生化学的特性を獲得するように交換され得ることが、発見されている。

【００１８】
好ましい実施態様において、ほとんど再フォールディングしないもののフィンガー２塩基領域の一部またはすべてが、良好に再フォールディングするもののフィンガー２塩基領域に交換されて、親タンパク質のフォールディング特性が改良され、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質の生物学的特異性に実質的に影響しない。所定のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質のレセプター結合特異性が、１つのＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質のフィンガー２チップ領域を異なるＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質のものと交換することによって変化され、親タンパク質のフォールディング特性に実質的に影響しないことが、認識される。

【００１９】

これらの発見の結果として、所望されるように、変化した属性（変化したフォールディング能力、変化した可溶性、変化した安定性、変化した等電点、変化した表面またはキャリア結合特性、および／または変化した生物学的活性および特異性を含む）を有する、新規なＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体を予測および設計するための手段は、現在利用可能である。本発明はまた、キメラ構築物の生物学的および生化学的属性を容易かつ迅速に評価するための手段（エピトープをマッピングすることを含む）を提供する。特に、候補を、このフィンガー２サブドメイン中の特定の特異的アミノ酸配列を用いて構築し、それによって、原核生物宿主（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）におけるこの候補配列の発現、それに続くインビトロでの再フォールディングを可能にする。

【００２０】

本明細書中で使用される場合、「ほとんど再フォールディングされない」タンパク質とは、代表的に適切な再フォールディング条件下で再フォールディングを誘導した場合に、標準的なプロトコールを使用して測定した場合に、約１％未満の適切にフォールディングされた材料を生じる、任意のタンパク質を意味する。本明細書中で意図される場合は、「代表的に適切な再フォールディング条件」とは、その下でタンパク質が機能性を付与するために必要とされる程度に再フォールディングされ得る条件である。当業者は、少なくともＩ．Ｂ．１．（ｃ）節および実施例３が、このような再フォールディング条件の非限定的な例を開示することを認識する。本発明の組成物および方法に関する構造的なパラメーターは、そのダイマータンパク質の構造を通じて適切に分布している１つ以上のジスルフィド架橋特性を含む。そしてこれは、フォールディングされた構造を生じるために、「還元－酸化」（「酸化還元」）反応工程を必要とする。酸化還元反応は、代表的には、中性のｐＨで生じる。従って、本明細書中で使用される場合は、「適切な再フォールディング条件」は、実質的に中性のｐＨ（すなわち、約ｐＨ５．０から１０．０の範囲、代表的には、約ｐＨ６．０－９．０の範囲内）であり、そして好ましくは生理学的に適合性である条件下での、酸化還元反応工程を含む。当業者は、成功のための最適な条件を理解しておりそしてそれを認識している。

【００２１】

１つの好ましい実施態様においては、本発明は、中性の、またはそうでなければ生理学的に適合性である条件下で変化した再フォールディング特性を有する、組換え、化学合成、または生合成のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質を提供する。例示のみの目的で、本発明の組換え、化学合成、または生合成タンパク質は、約５．０－１０．０の範囲内、好ましくは、約６．０－９．０の範囲内、より好ましくは、約７．０－８．５（これは、約ｐＨ７．５－８．５の範囲を含む）の範囲内のｐＨで、変化した再フォールディング特性を有する。

【００２２】

別の実施態様においては、本発明は、中性の、またはそうでなければ生理学的に適合性である条件下で変化した可溶性特性を有する、組換え、化学合成、または生合成のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質を提供する。１つの実施態様においては、本発明のタンパク質は、約５．０－１０．０の範囲内、好ましくは、約６．０－９．０の範囲内、より好ましくは、約６．０－８．５（これは、約ｐＨ７．０－７．５の範囲を含む）の範囲内のｐＨで、変化した可溶性を有する。別の実施態様においては、タンパク質の安定性は、本明細書中で開示される改変および操作によって変更される。「変化した」とは、ネイティブのタンパク質の特性（単数または複数）とは異なることを意味するように意図され、そしてより安定であるかもしくはより不安定であり得るが、そして／またはより可溶性であり得るかもしくはより不溶性であり得る、などであり得る実施

態様を含む。

【００２３】

なお別の実施態様においては、本発明は、生理学的に適合性である条件下で再フォールディングする能力を有し、そしてネイティブのタンパク質と比較して変化した等電点を有する、組換え、化学合成または生合成の、ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質を提供する。別の実施態様においては、本発明は、ネイティブのタンパク質と比較して変化した再フォールディング特性を有する、組換え、化学合成または生合成の、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質を提供する。そしてここで、この変異体タンパク質はまた、例えば、変化したレセプター結合特異性、変化した安定性、変化した可溶性、および／または生物学的活性を有する。

【００２４】

別の局面においては、本発明は、親のタンパク質と比較した場合に、改良された再フォールディング特性を有する、組換え、化学合成または生合成の、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質を提供する。そして特定の好ましい実施態様において、少なくとも１つの残基、好ましくは２つ、より好ましくは３つ以上の残基が、ほとんど再フォールディングしないタンパク質のフィンガー２サブドメインのネックまたは塩基領域において、酸性残基によって置換される。特定の他の実施態様において、５つより多くの残基が置換される。１つの実施態様において、この置換する酸性残基はＧｌｕまたはＡｓｐである。別の好ましい実施態様において、この酸性残基は、この塩基領域中の塩基性残基またはアミド保有親水性残基を置換する。なお別の好ましい実施態様において、親タンパク質は、ＯＰ－１、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２、ＯＰ－３または６０－Ａのうちのいずれか１つであり、そのキメラ、ヘテロダイマーおよびアミノ酸改変体を含む。そして酸性残基による置換は、少なくとも以下の位置のうちの１つでなされる：４（Ｑ）、６（Ｎ）、２５（Ｒ）、２６（Ｎ）、３０（Ｒ）、そして可能なことにはまた、２２（Ｋ）、２３（Ｋ）および３１（Ａ）。ＯＰ－１のＣ末端ドメインのシステインダブレットの後の最初の残基からカウントする。（例えば、図１を参照のこと）。別の実施態様において、親タンパク質は、ＮＯＤＡＬ、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４およびＴＧＦ－β５のうちのいずれか１つであり、そしてこの置換は、以下の位置のうちの１つ以上でなされる：４（Ｋ、Ｄ、Ｔ、Ａ、Ｖ）、６（Ｋ、Ｅ、Ｄ）、２４（Ｋ、Ｓ）、２５（Ｄ、Ｎ）、２９（Ｅ、Ｋ、Ｒ）そして可能なことには３０（Ｅ、Ｓ、Ａ）。

【００２５】

別の局面において、本発明は、親のタンパク質と比較した場合に、改良された再フォールディング特性を有する、組換え、化学合成または生合成の、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質を提供する。そして特定の好ましい実施態様において、少なくとも１つの残基、好ましくは２つ、より好ましくは３つ以上の残基が、ほとんど再フォールディングしないタンパク質のフィンガー２サブドメインのネックまたは塩基領域において、水酸基保有極性残基によって置換される。特定の他の実施態様において、５つより多くの残基が置換される。１つの実施態様において、この置換する極性残基は、ＳｅｒまたはＴｈｒである。別の好ましい実施態様において、この置換する残基は、この塩基領域中の塩基性残基またはアミド保有親水性残基を置換する。なお別の好ましい実施態様において、親タンパク質は、ＯＰ－１、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２、ＯＰ－３または６０－Ａのうちのいずれか１つであり、そのキメラ、ヘテロダイマーおよびアミノ酸改変体を含む。そして酸性残基による置換は、少なくとも以下の位置のうちの１つでなされる：Ｃ末端ドメインのシステインダブレットの後の最初の残基から４、６、２５、２６、３０、そして可能なことには２２、２３および

３１。（例えば、図１を参照のこと）。別の実施態様において、親タンパク質は、ＮＯＤＡＬ、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４およびＴＧＦ－β５のうちのいずれか１つであり、そしてこの置換は、以下の位置のうちの１つ以上でなされる：４、６、２４、２５、２９そして可能なことには３０。

【００２６】

別の実施態様において、酸性残基および／またはヒドロキシル基保有極性残基を有する残基の置換は、ＯＰ－１（配列番号３９）中の以下の位置の少なくとも１つで生じる：Ｃ末端活性ドメイン中に保存された２つの並んでいるシステインに続く最初の残基から数える場合は、４００、４０２、４０５、４２１、４２２、４２６（それぞれ、残基４、６、９、２５、２６および３０に対応する）（図１を参照のこと）。

【００２７】

別の局面において、本発明は、組換え、化学合成、または生合成ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質を提供し、これは、ヘテロダイマーおよびキメラを含む。ここで、このＣ末端残基は、以下のアミノ酸残基のいずれか１つで置換されている：アルギニン、セリン、イソロイシン、ロイシンまたはアラニン。そしてこれは、置換されていない親ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質配列と比較して改善されたリフォールディング特性を有する。１つの好ましい実施態様において、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーは、ＯＰ－１である。別の実施態様において、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーは、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、６０－ＡまたはＯＰ－２のいずれか１つである。なお別の実施態様において、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーは、ＧＤＦ－３、ＳＣＲＥＷまたはＮＯＤＡＬのいずれかである。１つの好ましい実施態様において、置換する残基は、アルギニンである。別の好ましい実施態様において、置換される親配列中のＣ末端残基は、ヒスチジンである。別の好ましい実施態様において、この親タンパク質は、以下のいずれか１つの列挙中に含まれる任意のリフォールディングの乏しいタンパク質である：ＯＰ－１、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－２、ＯＰ－３、６０－Ａ、ＮＯＤＡＬ、ＧＤＦ－３またはＳＣＲＥＷ、それらのキメラおよび／またはアミノ鎖改変体。その置換するＣ末端残基は、アルギニンである。別の実施態様において、この親タンパク質は、以下の列挙中に含まれる任意のリフォールディングの乏しいタンパク質である：ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４およびＴＧＦ－β５（それらのキメラおよび／またはアミノ酸改変体を含む）。その置換するＣ末端残基は、アルギニンである。１つの実施態様において、これらのＣ末端で置換されたタンパク質は、フィンガー２サブドメイン中に１つ以上のアミノ酸残基の置換をさらに含み、この領域中の酸性（負に荷電した）残基の数を、少なくとも３、好ましくは４、より好ましくは５まで増加させる。好ましい実施態様において、この酸性残基置換は、フィンガー２サブドメインのネック（ｎｅｃｋ）領域またはベース（ｂａｓｅ）領域中でなされる。１つの実施態様において、この置換する酸性残基は、ＡｓｐまたはＧｌｕである。なお別の実施態様において、この酸性残基は、親水性残基、特に、この領域中のアミド基保有残基および／または正に荷電した残基を置換する。なお別の実施態様において、これらの置換された残基は、以下を含む：Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、ＡｒｇおよびＬｙｓ。別の実施態様において、このＣ末端で置換されるタンパク質は、フィンガー２サブドメイン中に１つ以上のアミノ酸残基の置換をさらに含み、この領域中のアミド基保有残基および／または正に荷電した残基の数を減少させる。１つの実施態様において、置換されたフィンガー２サブドメインは、フィンガー２のベース領域中に、５つ未満の正に荷電した残基、好ましくは４つ以下の正に荷電した残基、より好ましくは３つ以下の正に荷電した残基を有する。なお別の実施態様において、このＣ末端で置

換されたタンパク質は、フィンガー２サブドメイン中の１つ以上のアミノ酸残基置換をさらに含み、この領域中のヒドロキシル基保有残基の数を増加させる。１つの実施態様において、この置換する極性残基は、ＳｅｒまたはＴｈｒである。別の実施態様において、この置換する残基は、塩基基保有残基またはアミド基保有残基を置換する。

【００２８】

本発明の改変されたタンパク質は、生体適合性マトリクス（例えば、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、セラミックスもしくはカルボキシメチルセルロース、または他の適切なマトリクス材料）と合わせて使用され得る。このような組合せは、再生骨、軟骨および／または他の鉱化されていない骨格領域もしくは連結組織（例えば、少数だが列挙すると、靱帯、腱、筋肉、人工軟骨、線維軟骨、関節包、半月板、椎間円板（ｉｎｔｅｒｖｅｒｔａｂｒａｌ　ｄｉｓｃ）、滑膜組織、および筋膜（ｆａｓｉｃａ）（しかし、これらに限定されない））についての方法において特に有用である。例えば、米国特許第５，４９６，５５２号、同第５，６７４，２９２号、同第５，８４０，３２５号、および米国特許出願第０８／２５３，３９８号（米国特許第＿号としてもうすぐ発行される）、これらの開示は、本明細書中に参考として援用され；また、同時係属中の米国特許出願第０８／４５９，１２９号および同第０８／４５８，８１１号（各々、１９９５年６月２日出願）は、本明細書中に参考として援用される。本願は、マトリクス材料のような結合特性および／または接着特性が、本明細書中に開示される特定の変異および技術を使用して変更され得ることを意図する。

【００２９】

別の実施態様において、本発明は、リフォールディングの乏しい、ネイティブＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質（例えば、ＢＭＰホモダイマーおよびヘテロダイマー）をフォールディングするための方法、ならびに生理学的に適合可能および／または中性のｐＨ条件下で本発明の変異体タンパク質をフォールディングするための方法を提供する。１つの好ましい実施態様において、この方法は、所望されるように、本発明の１つ以上の可溶化された置換ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体を提供する工程、この可溶化された変異体を適切なリフォールディング緩衝液中で酸化還元反応に曝露する工程、およびこのタンパク質サブユニットをホモダイマーおよび／またはヘテロダイマーへリフォールディングさせる工程を包含する。別の実施態様において、この酸化還元反応系は、グルタチオン、ＤＴＴ，β－メルカプトエタノール、β－メルカプトメタノール、シスチンおよびシスタミンの酸化形態および還元形態を利用し得る。別の実施態様において、この酸化還元反応系は、空気酸化（好ましくはメタル触媒（例えば、銅）存在下で）に依存する。なお実施態様において、約１：１０～約１０：１、好ましくは約１：２～約２：１の範囲の還元剤対酸化剤の比が、使用され得る。別の好ましい実施態様において、変異体タンパク質は、界面活性剤（非イオン性界面活性剤（例えば、ジギトニン）、Ｎ－オクチルグルコシドまたは両性イオン性界面活性剤（例えば、３－［（３－コラミドプロピル（ｃｈｏｌａｍｉｄｏｐｒｏｐｌｙ））ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルフェート（ＣＨＡＰＳ））を含む）の存在下で可溶化される。なお別の実施態様において、リフォールディング反応は、約５．０～１０．０のｐＨ範囲、好ましくは、約６．０～９．０の範囲、より好ましくは約７．０～８．５の範囲で生じる。なお別の実施態様において、リフォールディング反応は、約０～３２℃の範囲内の温度、好ましくは約４～２５℃の範囲で生じる。ヘテロダイマーが作製される場合、２つの異なるサブユニットを付加するために最適な比は、容易に、経験的にそして過度の実験を伴わずに決定され得る。

【００３０】

ヘテロダイマーの精製は、２つのモノマー配列を調整することによって容易に

され得、その結果、これらは、精製のために有用な特性（例えば、正味の電荷）において異なる。

【００３１】

本発明の特定の組成物は、好ましくは、ヌクレオチドのアセンブリによるか、および／またはＤＮＡ制限フラグメントを連結することによって、本明細書に開示される原理に従って製造されて、合成ＤＮＡを生成する。このＤＮＡは、適切なタンパク質発現ビヒクル中にトランスフェクトされ、コードされたタンパク質が発現され、フォールディングされ、そして精製される。特定の構築物は、インビトロにおいてアゴニスト活性について試験され得る。候補構築物の三次構造は、反復的に精製され得、そして本明細書中に開示される原理、コンピュータに基づくタンパク質構造モデル化、および近年開発された合理的分子設計技術によって援助される、部位特異的またはヌクレオチド配列特異的変異誘発によって調節されて、目的の分子の特定の特性を改善または調節され得る。公知のファージディスプレイまたは他の発現系は、多数の候補構築物を同時に生成するために開発され得る。続いて、候補構築物のプールは、例えば、表面固定化レセプター、高い結合候補物を選択するためおよびそれを濃縮するための塩勾配溶出を含むクロマトグラフィーカラム、ならびに特定の単離された候補物がテンプレートスーパーファミリーメンバーの活性をアゴナイズするか否かを決定するためのインビトロアッセイを使用して、変更および／または改善された結合特異性についてスクリーニングされ得る。有用な構築物の同定の後、研究室の使用のため、究極的には治療的に有用な分子を生成するための、商業的に有用な量の構築物を発現する細胞株を生成する。一旦、本明細書中に記載されるタンパク質およびＤＮＡ方法論によって同定され、そして特徴付けられると、好ましい構築物は、標準的な化学的合成方法論によって生成され得ることもまた、意図される。

【００３２】

別の局面において、本発明は、宿主細胞（細菌宿主、または任意の他の宿主細胞を含む）においてＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質を生成するための方法を提供し、ここで、過剰発現されるタンパク質は、インビトロにおいて可溶化および／またはリフォールディングすることを必要とする形態で凝集する。この方法は、本発明の１つ以上の組換えタンパク質または生合成タンパク質をコードする核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞を提供する工程、組換えタンパク質を発現するために適切な条件下で宿主細胞を培養する工程、凝集したタンパク質を回収する工程、ならびに上記に述べた工程を使用してこのタンパク質を可溶化およびリフォールディングする工程を包含する。別の実施態様において、この方法は、本発明の組換えタンパク質または生合成タンパク質をコードする核酸を用いて宿主細胞をトランスフェクトする、さらなる工程を包含する。

【００３３】

別の局面において、本発明は、親配列と比較して哺乳動物における免疫学的効果をほとんど有さないかまたは実質的に増加しない、組換え、化学合成または生合成ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質を提供する。この分子の免疫学的効果は、分子またはその一部を動物（例えば、試験マウス）へ注射すること、およびこの注射に応答して動物によって生成され、そしてこの分子に特異的な抗体についてアッセイすることによって容易に検出され得る。有用なアッセイとしては、血清において抗体を検出するための任意の標準的プロトコル（例えば、標準的なウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡイムノアッセイまたはラジオイムノアッセイ）が挙げられる。

【００３４】

なお別の実施態様において、本発明は、変更された生物学的特性（キメラ構築物を含む）を有する組換え、化学合成または生合成ＴＧＦ－βスーパーファミリ

ーメンバータンパク質を作製するための新規な方法を提供する。１つの実施態様において、Ｃ末端活性領域の個々のサブドメインは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー間で交換されて、所望の特性を有するキメラ構築物を作製し得る。例えば、リフォールディングの乏しいフィンガー２サブドメインは、良好なリフォールディングのフィンガー２サブドメインに交換されて、親タンパク質のフォールディング特性を改善し得る。好ましくは、ネック領域またはベース領域のフィンガー２に対応する非保存的残基のみが交換され、そして親配列のループ配列またはチップ配列は、この親配列の生物学的活性を維持するように維持される。あるいは、親のリフォールディングの乏しいタンパク質の生物学的活性およびフォールディング特性は、フィンガー２のネック／ベース領域およびチップ／ループ領域の両方において非保存的残基を変化させることによって変更され得る。逆に、良好なリフォールディングの生物学的活性は、親タンパク質のフィンガー１サブドメインおよび／またはヒールサブドメインを所望の活性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質のものと置換することによってこのタンパク質のリフォールディング特性に実質的に影響することなく、変更され得、それによって、変異体タンパク質を生成する。あるいは、フィンガー２のチップ中の非保存的残基のみが、変更され得る。

【００３５】

本発明の上述および他の目的、特徴および利点は、以下の本発明の好ましい実施態様の詳細な説明からより明らかにされる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３６】

（好ましい実施態様の詳細な説明）

本発明の現在好ましい実施態様の詳細な記載さらに続けるまえに、特定の用語および句の説明を提供する。従って、以下に示す用語または句のそれぞれが本明細書中で少なくとも以下のように定義されることが理解される。

【００３７】

本明細書中で使用される場合は、「酸性」または「負に荷電した残基」は、生理学的に適合性である条件を含むがこれに限定されない天然のｐＨの下でそのＲ基上に負電荷を保有している、天然に存在するかまたは合成の任意のアミノ酸残基を含むと理解される。例として限定的ではないが、アスパラギン酸（「Ａｓｐ」）、およびグルタミン酸（「Ｇｌｕ」）が挙げられる。同様に、塩基性または正に荷電した残基としては、天然に存在するかまたは合成によって作製された、生理学的条件下でそのＲ基上に正電荷を保有している、任意のアミノ酸残基が挙げられる。例として、限定的ではないが、アルギニン（「Ａｒｇ」）、リジン（「Ｌｙｓ」）、およびヒスチジン（「Ｈｉｓ」）が挙げられる。本明細書中で使用される場合には、「親水性」残基としては、酸性および塩基性の両方のアミノ酸残基、ならびにそれらのＲ基上にアミド基を保有している荷電していない残基（これらには、限定的ではないが、グルタミン（「Ｇｌｎ」およびアスパラギン（「Ａｓｎ」）が挙げられる）、ならびに、そのＲ基上にヒドロキシル基を保有している極性残基（これらには、限定的ではないが、セリン（「Ｓｅｒ」）およびスレオニン（「Ｔｈｒ」）が挙げられる）が挙げられる。

【００３８】

本明細書中で使用される場合には、「生合成」または「生合成の」は、天然に由来するかまたは合成によって誘導されるフラグメントの連結の結果として生じるか、またはそれに起源することを意味する。例えば、限定的ではないが、本明細書中で開示されている、１つ以上のサブドメイン（またはそのフラグメント）に対応する部位特異的変異誘発、およびペプチドフラグメントまたは核酸フラグメントの連結を意味する。「化学合成」または「化学合成の」は、化学的な生成手段の結果として生じるかまたはそれに起源することを意味する。例えば、限定

的ではないが、市販の供給業者からの標準的な自動合成装置を使用するペプチド配列または核酸配列の合成を意味する。天然のアミノ酸および天然ではないアミノ酸の両方が、本明細書中で教示されているような所望される特性を得るように使用され得ることが意図される。「組換え」産生または技術は、遺伝子操作された産生手段の結果として生じるか、またはそれに起源することを意味する。例えば、限定的ではないが、本発明のキメラタンパク質（またはそのフラグメント）をコードする、遺伝子操作されたＤＭＡ配列または遺伝子の発現を意味する。少なくともＩ．Ｂ．１．（ａ）および（ｂ）節；ＩＩ節、ならびに少なくとも実施例１、２、および９（ＩＩＩ節）において以下に示される教示もまた、上記の意味に含まれる。「合成の」は、非天然に存在すること、または非天然に起源すること、すなわち、天然には存在しないことを意味する。

【００３９】

本明細書中で使用される場合は、「対応する残基位置」は、２つの配列が整列される場合に、参照アミノ酸配列中の所定の位置に対応するタンパク質配列中の残基位置をいう。当業者に理解され、そして図１に示すように、ＢＭＰファミリーのメンバーの配列は、Ｃ末端の活性ドメインにおいて、そして特にフィンガー２サブドメインにおいて高度に保存されている。アミノ酸配列の整列の方法およびプログラムは、当該分野で十分に開発されている。例えば、Ａｌｉｇｎプログラム（ＤＮＡｓｔａｒ，Ｉｎｃ．）のようなコンピュータープログラムによって都合よく実行される、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら（１９７０）、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３の方法を参照のこと。第２の配列中の内部ギャップおよびアミノ酸の挿入は、アラインメントを計算する目的については無視される。それぞれ記述しやすくするために、代表的なＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーとして、ｈＯＰ－１（ヒトＯＰ－１、当該分野において「ＢＭＰ－７」ともいわれる）が以下に提供される。しかし、ＯＰ－１は、単に、組織の形態形成を誘導する能力のある真の組織のモルフォゲンのＴＧＦ－βのサブクラスの代表的なものにすぎないことが明らかである。

【００４０】

「骨形成性タンパク質」または「骨形態形成タンパク質」は、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質を意味する。これらは、軟骨、靭帯、腱および軟骨内での骨の形成を含むがこれらに限定されない、最後には骨格組織の形成がに達する形態形成事象の全カスケードを誘導し得る。本明細書中で有用な骨形成性タンパク質としては、任意の既知の天然に存在するネイティブのタンパク質が挙げられる。これらは、天然に存在するかまたは生合成によって産生されたかにはかかわらず、その対立遺伝子、系統発生的対応物、および他の改変体（例えば、「ムテイン」または「変異タンパク質」を含む）、ならびにタンパク質の一般的な形態形成性のファミリーの新規の骨形成的に活性なメンバーを含む。本明細書中で記載されている場合は、このクラスのタンパク質は、一般的には、ヒトの骨形成性タンパク質１（ｈＯＰ－１）によって象徴される。本発明の実施において有用な他の骨形成性タンパク質としては、骨形成的に活性な形態のタンパク質が挙げられる。これらは、以下のリストに含まれる：ＯＰ－１、ＯＰ－２、ＯＰ－３、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－９、ｄｐｐ、Ｖｇ－１、Ｖｇｒ、６０Ａタンパク質、ＣＤＭＰ－１、ＣＤＭＰ－２、ＣＤＭＰ－３、ＧＤＦ－１、ＧＤＦ－３、ＧＤＦ－５、ＧＤＦ－６、ＧＤＦ－７、ＭＰ－５２、ＢＭＰ－１０、ＢＭＰ－１１、ＢＭＰ－１２、ＢＭＰ－１３、ＢＭＰ－１５、ＵＮＩＶＩＮ、ＮＯＤＡＬ、ＳＣＲＥＷ、ＡＤＭＰ、またはＮＥＵＲＡＬ。これらは、それらのアミノ酸配列改変体、および／またはそのヘテロダイマーを含む。１つの現在好ましい実施態様においては、本発明の実施において有用な骨形成性タンパク質として、以下のいずれかのものが含まれる：ＯＰ－１、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－

１２、ＢＭＰ－１３、ＧＤＦ－５，ＧＤＦ－６，ＧＤＦ－７、ＣＤＭＰ－１、ＣＤＭＰ－２、ＣＤＭＰ－３、ＭＰ－５２、ならびにそれらのアミノ酸配列改変体およびホモログ。これらは、それらの種ホモログを含む。なお別の好ましい実施態様においては、有用な骨形成的に活性なタンパク質は、参照の骨形成性配列（例えば、ＯＰ－１、ＯＰ－２、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、６０Ａ、ＧＤＦ－５、ＧＤＦ－６、ＧＤＦ－７などの保存されている７個のシステインのドメインを規定するＣ末端配列）をコードするＤＮＡまたはＲＮＡに対して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる配列を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド鎖を有する。本明細書中で使用される場合は、中程度のストリンジェントのハイブリダイゼーション条件は、公知技術に従って、４０％のホルムアミド、５×ＳＳＰＥ、５×デンハルト溶液、および０．１％のＳＤＳ中で、３７℃にて一晩のハイブリダイゼーション、そして０．１×ＳＳＰＥ，０．１％のＳＤＳ中で５０℃での洗浄として規定される。標準的なストリンジェンシーの条件は、市販の標準的な分子クローニングのテキストにおいて十分に特徴付けられている。例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第２版、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ、およびＭａｎｉａｔｉｓ編（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：１９８９）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ、第１巻および第ＩＩ巻（Ｄ．Ｎ．Ｇｌｏｖｅｒ編、１９８５）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編、１９８４）：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ．Ｄ．ＨａｍｅｓおよびＳ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編、１９８４）；ならびにＢ．Ｐｅｒｂａｌ、Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）を参照のこと。上記の開示は、本明細書中で参考として援用される。米国特許第５，７５０，６５１号、および同第５，８６３，７５８号もまた参照のこと。これらの開示は本明細書中で参考として援用される。

【００４１】

本発明の実施において有用性を有する関連するタンパク質のＴＧＦ－βスーパーファミリーの他のメンバーとしては、以下のリストの中で、ネイティブではほとんどリフォールディングされないタンパク質が挙げられる：いくつかを挙げると、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４、およびＴＧＦ－β５、種々のインヒビン、アクチビン、ＢＭＰ－１１、ならびにＭＩＳ。図１は、ＴＧＦ－βスーパーファミリーの種々の既知のメンバーの、隣接しているシステインを伴うフィンガー２サブドメインを規定するＣ末端の残基を列挙する。ほとんどリフォールディングされないリスト上の任意の１つのタンパク質は、本発明の方法によって改善され得、他の既知または発見され得るファミリーのメンバーも同様であり得る。本明細書中でさらに記載されているように、本発明での使用に適切な生物学的に活性な骨形成性タンパク質は、当該分野で認識されているような、ＲｅｄｄｉおよびＳａｍｐａｔｈによって記載されている生体アッセイを使用する慣用的な実験法によって、同定され得る。有用なタンパク質の詳細な記載が以下に続く。等価物は、慣用的な実験法および通常の技能のみを使用して、当業者によって同定され得る。

【００４２】

「モルフォゲン」または「形態形成性タンパク質」は、本明細書中で意図される場合は、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーを含む。これらは、形態形成性であること、すなわち、成熟した哺乳動物において組織の形態形成の発生的なカスケードを誘導し得ることが認識されている（ＰＣＴ出願番号第ＵＳ９２／０１９６８号を参照のこと）。詳細には、これらのモルフォゲンは、方向付けられていない前駆細胞の増殖を誘導し得、そして適切な環境条件下で組織特異的様

式でこれらの刺激された前駆細胞の分化を誘導し得る。さらに、モルフォゲンは、これらの分化した細胞の増殖および維持を支持し得る。これらの形態形成性の活性は、タンパク質が、適切な形態形成を許容する環境において組織の形態形成の発生的なカスケードを開始しそして維持することを可能にし、幹細胞が組織特異的様式で増殖および分化するように刺激し、そして最後には新しい組織の形成に達する事象の進行を誘導させる。これらの形態形成活性はまた、タンパク質が、それらの分化の経路から免れるように予め刺激された細胞の「再分化」を誘導することを可能にする。適切な環境条件下では、これらのモルフォゲンもまた方向付けられた細胞の「再分化」を刺激し得ることが予想される。当業者を導くために、種々の組織中の形態形成タンパク質を試験するため、および形態形成タンパク質に典型的な種々の特性について試験するための多数の手段が、本明細書中に記載される。これらの教示が、本発明のネイティブのタンパク質、およびキメラタンパク質の形態形成性の特性を評価するために使用され得ることが、理解される。例えば、いくつかを挙げると、脳、肝臓の形態形成に関する教示については、ＩＩＩ節実施例１１Ａ－１１Ｇを参照のこと。

【００４３】

本発明の有用なネイティブのタンパク質または親のタンパク質はまた、ヒトのＯＰ－１のＣ末端の７個のシステインのドメイン内で少なくとも７０％のアミノ酸配列相同性を共有するものを含む。保存されている７個のシステインのドメインに対する候補のアミノ酸配列のパーセント相同性を決定するために、候補の配列と７個のシステインのドメインとを整列させる。整列を実行するための最初の工程は、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）（その教示は本明細書中で参考として援用される）に記載されている動的なプログラミングアルゴリズム、およびＡｌｉｇｎ　Ｐｒｏｇｒａｍ（ＤＮＡｓｔａｒ、Ｉｎｃ．によって生産されている市販のソフトウェアパッケージ）のような、アラインメントツールを使用することである。最初のアラインメントを作成した後、次いでこれは、関連するタンパク質のファミリーの複数の配列のアラインメントに対する比較によって改善される。一旦、候補の配列と７個のシステインのドメインとの間でのアラインメントが行われそして改善されると、パーセント相同性のスコアが計算される。各配列の個々のアミノ酸は、互いに対するそれらの類似性に従って連続して比較される。類似性の因子としては、同様の大きさ、形状、および電荷が挙げられる。アミノ酸の類似性を決定する１つの特に好ましい方法は、Ｄａｙｈｏｆｆら、５　Ａｔｌａｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　３４５－３５２（１９７８および補遺）（本明細書中で参考として援用される）に記載されているＰＡＭ２５０マトリックスである。類似性スコアは、整列された対となった（ｐａｉｒｗｉｓｅ）アミノ酸の類似性スコアの合計として最初に計算される。挿入および欠失は、パーセント相同性および同一性の目的については無視される。従って、ギャップペナルティーは、この計算においては使用されない。次いで、生のスコアが、候補の化合物および７個のシステインのドメインのスコアの相乗平均でそれを除算することによって正規化される。相乗平均は、これらのスコアの積の平方根である。正規化された生のスコアが、パーセント相同性である。

【００４４】

本明細書中で使用される場合は、「保存的置換」は、対応する参照残基に物理的または機能的に類似である残基である。例えば、これは、同様の大きさ、形状、電荷、化学的特性（共有結合または水素結合を形成する能力を含む）などを有する。特に好ましい保存的置換は、Ｄａｙｈｏｆｆら（１９７８）、５　Ａｔｌａｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、補遺３、第２２章（３５４－３５２頁）、Ｎａｔｌ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｆｏｕｎｄ．，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．２０００７（本明細書中で参考

として援用される）において、容認された点変異について規定された基準を満たすものである。保存的置換の例としては、類似の特徴を有する１つのアミノ酸の別のアミノ酸での置換が挙げられる。例えば、以下の群内での置換は周知である：（ａ）グリシン、アラニン；（ｂ）バリン、イソロイシン、ロイシン；（ｃ）アスパラギン酸、グルタミン酸；（ｄ）アスパラギン、グルタミン；（ｅ）セリン、スレオニン；（ｆ）リジン、アルギニン、ヒスチジン；および（ｇ）フェニルアラニン、チロシン。用語「保存的改変体」または「保存的なバリエーション」もまた、結果として生じる置換されたポリペプチド鎖に対して結合特異性を有する抗体がまた、置換されていないかまたは親のポリペプチド鎖についての結合特異性（すなわち、それと「交差反応する」かまたはそれと「免疫反応性である」）を有するという条件下で、所定のポリペプチド鎖中の置換されていない親のアミノ酸の代わりに、置換されたアミノ酸を使用することを含む。

【００４５】

本明細書中で使用される場合は、「保存されている残基の位置」は、少なくとも１つの他のメンバーの配列中で、同じアミノ酸またはその保存的な改変体によって占有されている参照アミノ酸配列中の位置をいう。例えば、図１においては、参照配列としてのＯＰ－１と、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、およびＢＭＰ－６とを比較すると、位置２（Ｐ）、３（Ｔ）、５（Ｌ）、７（Ａ）、８（Ｉ）、および９（Ｓ）のような位置などは保存されている位置であり、そして４（Ｋ，Ｅ）および６（Ｎ，Ｓ）のような位置などは保存されていない位置である。

【００４６】

本明細書中で使用される場合は、フィンガー２サブドメインの「ベース」または「ネック」領域は、ＯＰ－１によって例示され、そしてＣ末端の活性ドメイン中の２つ並んでいるシステインに続く最初の残基から数える場合は、残基１～１０および２２－３１によって定義される（図１を参照のこと）。他のＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質のメンバーのＯＰ－１との配列アラインメントから容易に明らかであるように、より長いタンパク質（例えば、ＢＭＰ－９またはＤｏｒｓａｌｉｎ）についての対応するベースまたはネック領域は、残基１～１０および２３～３２によって定義される：より短いタンパク質（例えば、ＮＯＤＡＬ）については、対応する領域は、残基１～１０および２２～３０によって定義される（図１を参照のこと）。配列番号３９（ヒトのＯＰ－１）においては、フィンガー２サブドメインのベースまたはネック領域に対応する残基は、残基３９７～４０６（図１の残基１～１０に対応する）および残基４１８～４２７（図１の残基２２～３１に対応する）である。

【００４７】

本明細書中で使用される場合は、「アミノ酸配列の相同性」は、アミノ酸配列の同一性および類似性の両方を含む。相同配列は、同一および／または類似のアミノ酸残基を共有する。ここで、類似の残基は、整列された参照配列中の対応するアミノ酸残基の保存的置換、またはその「許容される点変異」である。

【００４８】

本明細書中で使用される場合は、用語「キメラタンパク質」、「キメラ」、「キメラポリペプチド鎖」、「キメラ構築物」、および「キメラ変異体」は、任意のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーの合成の構築物をいう。ここでは、少なくとも１つの定義された領域、ドメイン、またはサブドメイン（例えば、第１のフィンガー１、フィンガー２、またはヒールサブドメイン）のアミノ酸配列は、全体または一部（例えば、少なくとも約３、５、１０、または１５個の連続しているアミノ酸残基）において、少なくとも１つの他の異なるＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質に由来する第２のアミノ酸配列と置き換えられている。その結果、得られる構築物は、天然には存在しないものとして認

識され得、かつ異なるタンパク質供給源に由来するアミノ酸配列を有する。特定の好ましいキメラは、第３の異なるＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質に由来するサブドメインを含むか、または第２のタンパク質に由来する２つの異なるサブドメインを含む。好ましい実施態様の特徴は、保存されているＴＧＦ－βスーパーファミリーのジスルフィド結合が維持されているリフォールディングされた構造であることが、理解される；保存されている１番目、２番目、３番目、５番目、６番目、および７番目のシステイン残基　対　半保存されている４番目の残基の考察については、以下のＩ．Ａ．節を参照のこと。

【００４９】

本明細書中で使用される場合は、有用な発現宿主細胞としては、原核生物および真核生物が挙げられる。これには、封入体を作製し得る任意の宿主細胞が挙げられる。特に有用な宿主細胞としては、限定的ではないが、Ｅ．ｃｏｌｉならびにＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓのような細菌宿主が挙げられる。他の有用な宿主としては、下等な真核生物（例えば、酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））および高等真核生物（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａのような昆虫細胞、哺乳動物細胞（例えば、ＣＨＯ）などを含む）が挙げられる。産生の代替的な手段は、変異体構築物の化学合成、続いての適切なリフォールディング（ｒｅｆｏｌｄｉｎｇ）である。

【００５０】

本発明は、天然に存在する形態と比較して、変化したリフォールディングの特性、および変化した活性プロフィールを有する、組換え、化学合成または生合成のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのタンパク質を提供する。本発明の変異体構築物は、天然に存在するＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー中でのアミノ置換を含む。以下に提供される詳細な説明は、改善されたモルフォゲンおよび薬学的特性を生じる置換のアレイを記載する。変異体構築物を産生する方法もまた、教示される。

【００５１】

本発明に従って、タンパク質のＴＧＦ－βスーパーファミリーのネイティブのＢＭＰまたは他のメンバー（そのヘテロダイマーおよびホモダイマーを含む）の特性は、Ｃ末端フィンガー２サブドメイン中の１以上の規定されたアミノ酸残基と、別のアミノ酸残基とを置換することによって変化される。この発見の結果として、以下のようなＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質を設計することが可能である：（１）原核生物細胞もしくは真核生物細胞中で組換え的に発現されるか、またはポリペプチドまたはヌクレオチド合成装置を使用して合成されたＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質；（２）変化したフォールディング特性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質；（３）生理学的に適合性の条件を含むがこれに限定されない、中性のｐＨの下で変化した溶解度を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質；（４）変化した等電点を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質；（５）変化した安定性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質；（６）変化した組織特異性またはレセプター特異性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質；（７）再設計された、変化した生物学的活性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質、（８）限定的ではないが、生体適合性マトリックスまたは金属のような固体表面に対する、変化した結合特性または接着特性を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質、および／または（９）処方を容易にする能力を有するＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質。本明細書中に開示される発見を利用して、変異体タンパク質は、ここで、Ｅ．ｃｏｌｉ中での発現およびインビトロでの最適なリフォールディングを可能にするように設計され得、これはそうでなければ、Ｅ．ｃｏｌｉのような原核生物宿主中で最適に発現され得ない。

【００５２】
従って、本発明は、好ましいキメラタンパク質を含有する、迅速に放出される処方物、ゆっくりと放出される処方物、および／または定められた時間に放出される処方物を設計するための機構を提供し得る。他の利点および特徴が、以下の教示から明らかである。さらに、本明細書中で開示される発見を利用して、変化した表面結合／表面接着特性を有する改変タンパク質が設計され得、そして選択され得る。特に重要な表面としては、骨のような天然に存在し得る固体表面、またはコラーゲンもしくは他の生体適合性のマトリックスのような多孔性粒子の表面；または金属を含むプロテーゼインプラントの製作された表面が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で意図される場合は、実質的には、任意の表面が、構築物の差示的な結合についてアッセイされ得る。従って、本発明は、それらの表面結合／表面接着特性において変化を有し、それによってこのような構築物を、変化したインビボでの適用（ゆっくりと放出される処方物、、迅速に放出される処方物、および／または定められた時間に放出される処方物を含む）について有用にする、多様な機能的な分子を包含する。

【００５３】
当業者は、任意の１つ以上の上記の特性を混合および適合させることによって、カスタマイズされた変異タンパク質（および、それをコードするＤＮＡ）の使用を操作するための特定の機会を提供することを理解する。例えば、変化した安定性の特性は、インビボで変異タンパク質の代謝回転を操作するために使用され得る。さらに、変化したリフォールディングおよび／または機能のような特性を有する変異タンパク質の場合においてもまた、フォールディング、機能、および安定性との間に相関関係が存在するようである。例えば、Ｌｉｐｓｃｏｍｂら、７　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．７６５－７３（１９９８）；およびＮｉｋｏｌｏｖａら、９５　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１４６７５－８０（１９９８）を参照のこと。本発明の目的については、安定性の変化は、円偏光二色性、変性剤の濃度または温度の関数としての安定性の他の指標の周知の技術を使用して慣用的にモニターされ得る。当業者はまた、慣用的な走査熱量分析を使用し得る。同様に、任意の上記の特性と可溶性の特性との間に相関関係が存在するようである。可溶性の場合においては、この特性を操作することが可能であり、その結果、キメラタンパク質は、生理学的適合性の下で幾分可溶性でありそしてその結果としてインビボで投与された場合には容易に分散するか、または各々局在化されたままであるかのいずれかである。

【００５４】
適切な組換え、化学合成、または生合成タンパク質およびＤＮＡ、ならびに本発明の実施において有用な方法、およびタンパク質構築物を使用および試験するための方法の詳細な記載が、以下に詳細に提供される；また、多数の、限定的ではない例が以下に提供される。この例は、１）本明細書中に記載されている、組換え、化学合成、または生合成のタンパク質、ＤＮＡ、および方法の有用性を説明する；ならびに、２）これらのタンパク質およびＤＮＡ構築物を試験および使用するアッセイを提供する。

【００５５】
（Ｉ．タンパク質の考察）
（Ａ．ＴＧＦ－βスーパーファミリーの例示的なメンバーの、生化学的、構造的、および機能的特性）
ＴＧＦ－β２またはＯＰ－１のいずれかにおけるそれぞれのサブユニットは、特徴的なフォールディングパターンを有する。これは、７個のＣ末端のシステイン残基のうちの６個が関与する。簡潔には、各サブユニット中の４個のシステイン残基が２つのジスルフィド結合を形成し、これらは互いに８残基の環を作製する。一方、２つのさらなるシステイン残基はジスルフィド結合を形成し、これは

結び目様の構造を形成するように環を通過する。番号１を割り当てられた７個の保存されているシステイン残基のうちの最もＮ末端のシステインで開始する番号付けスキームを用いると、２番目および６番目のシステイン残基が８残基の環の１つの側面を閉じるようにジスルフィド結合し、一方、３番目および７番目のシステイン残基は、環の他の側面を閉じるようにジスルフィド結合する。１番目および５番目の保存されているシステイン残基は、結び目の中心を形成するように、環の中心を通ってジスルフィド結合する。アミノ酸配列のアラインメントのパターンは、この構造モチーフがＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーの間で保存されていることを示唆する。４番目のシステインは半保存されており、そして存在する場合には、代表的に、他のサブユニット中の対応するシステイン残基と鎖間ジスルフィド結合（ＩＣＤＢ）を形成する。

【００５６】

ＴＧＦ－β２およびＯＰ－１中の各サブユニットの構造は、これらの主要な三次構造のエレメントおよびＮ末端領域を含む。構造エレメントは、以下の型の５０％を超える二次構造を保有している連続しているポリペプチド鎖の領域から構成される：（１）ループ、（２）α－ヘリックス、および（３）β－シート。各構造領域についての別の定義の基準は、入口（Ｎ末端）および出口（Ｃ末端）のペプチド鎖が、約７Åが離れて互いにかなり近づいていることである。

【００５７】

１番目の保存システインと２番目の保存システインとの間のアミノ酸配列は、本明細書中でフィンガー１領域と呼ばれる、逆平行β－シートフィンガーによって特徴付けられる構造領域を形成する。同様に、５番目の保存システインと６番目の保存システインとの間の残基もまた、フィンガー２領域と本明細書中で呼ばれる、逆平行β－シートフィンガーを形成する。β－シートフィンガーは、一本のアミノ酸鎖であり、β－ターンまたはいくらか長いループによってそれ自体の上に折り畳み戻されるβ－鎖を含む。その結果、この領域に入って、かつこの領域から出るポリペプチド鎖は、１つ以上の逆平行β－シート構造を形成する。３番目の保存されているシステインと５番目の保存されているシステインとの間の残基を含む第３の主要な構造領域は、本明細書中でヒール領域と呼ばれる３個のターンα－ヘリックスによって特徴付けられる。モノマーの構造の構成は、左手の構成と類似であり、ここで、結び目領域が手のひらに相当する位置に配置され、フィンガー１領域が人差し指および中指に相当し、α－ヘリックスまたはヒール領域が手の付け根に相当し、そしてフィンガー２領域が薬指および小指に相当する。その配列がＴＧＦ－βスーパーファミリーを通じて保存されていないＮ末端領域は、親指とほぼ相当する位置に配置されると推定される。

【００５８】

立体構造的に活性なＴＧＦ－β２のダイマーの複合体においては、ダイマーの複合体中の２つのモノマーサブユニットは、２重の回転の対称性で配向され、その結果１つのサブユニットのヒール領域が、分子のコアを形成する連結されたサブユニットの結び目領域と、他のサブユニットのフィンガー領域を接触させる。４番目のシステインは、第２の鎖上のその対応物と鎖間ジスルフィド結合を形成し、それによって手のひらの中心で鎖を等しく連結する。従って、形成されるダイマーは、サブユニット間の対称性の２重軸を上から下に見た場合には、楕円形の（葉巻型の）分子である。横からみた場合には、分子は、曲がった「葉巻」に似ている。なぜなら、２つのサブユニットは、互いにわずかな角度で配向されているからである。

【００５９】

一方のサブユニットに由来するヒール領域、ならびに他方のサブユニットに由来するフィンガー１領域およびフィンガー２領域のそれぞれは互いに相互作用する。これらの３つのエレメントは、同族のレセプターの相互作用する表面に結合

するリガンドと相互作用し、そしてそれらに相補性である構造を規定するために、互いに協力する。

【００６０】

（フィンガー領域およびヒール領域の選択）

フィンガー領域およびヒール領域を規定するアミノ酸配列が、ＴＧＦ－βスーパーファミリーの任意の既知のメンバーのそれぞれのフィンガーおよびヒール領域の配列に対応し得ることが、意図される。さらに、本発明の構築物の大きさが、鋳型のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーの天然のフィンガー領域およびヒール領域を短縮することによって優位に減少させられ得ることもまた、意図される。

【００６１】

上記のように、フィンガー領域およびヒール領域を規定するアミノ酸配列は、本明細書中で同定されている、任意の既知のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのそれぞれのフィンガー領域およびヒール領域の配列に由来し得るか、または、本明細書中で以後に発見された新規のスーパーファミリーのメンバーのアミノ酸配列に由来するものが、本発明において使用され得る。

【００６２】

図６は、フィンガー１領域（図６Ａ）、ヒール領域（図６Ｂ）、およびフィンガー２（図６Ｃ）領域において並べられた、現在同定されているＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのアミノ酸配列を要約する。これらの配列は、コンピューターアルゴリズムによって整列され、ここで、これらの配列を最適に配列するために、保存されているアミノ酸配列または二次構造を有することが既知のアミノ酸配列の領域よりもむしろループ構造を規定することが既知のアミノ酸配列の領域中にギャップが挿入された。例えば、可能である場合には、ギャップは、βシートによって規定されるフィンガー１領域およびフィンガー２領域、またはαヘリックスによって規定されるヒール領域のアミノ酸配列中には導入されない。ダッシュ（－）は、隣接するアミノ酸間でのペプチド結合を示す。各サブグループについてのコンセンサス配列のパターンは、各サブグループの最下段に示される。

【００６３】

それぞれのＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのアミノ酸配列が整列された後、この整列された配列を使用して、得られた構築物の全体的な三次構造を変更することなく別のアミノ酸またはアミノ酸の群で置換され得るアミノ酸残基を同定する、アミノ酸配列のアラインメントパターンを作製する。フィンガー領域およびヒール領域中の特定の位置で有用であり得るアミノ酸またはアミノ酸の群は、図８に示されるアミノ酸の階層のパターン構造を履行するコンピューターアルゴリズムによって同定される。

【００６４】

簡潔には、このアルゴリズムは、４つのレベルの分析を行う。レベルＩにおいては、このアルゴリズムは、特定のアミノ酸残基が、アミノ酸配列中の特定な位置で７５％を超える頻度で生じるかどうかを決定する。例えば、アミノ酸配列中の特定の位置でグリシン残基が１０回のうち８回生じる場合には、グリシンがその位置で指定される。試験される位置が全てギャップからなる場合には、次いで、ギャップ文字（－）がその位置に割り当てられる。そうでなければ、少なくとも１つのギャップが存在する場合には、次いで、「ｚ」（任意の残基またはギャップについての表記）がその位置に割り当てられる。アミノ酸が、特定の位置で候補配列の７５％で生じない場合には、アルゴリズムはレベルＩＩの分析を実行する。

【００６５】

レベルＩＩは、パターンのセットａ、ｂ、ｄ、ｌ、ｋ、ｏ、ｎ、ｉ、およびｈ

を規定する。ここでは、ｌ、ｋ、およびｏは、共通のアミノ酸残基を共有する。次いで、このアルゴリズムは、アミノ酸配列中の特定の位置で７５％以上のアミノ酸残基が上記のパターンの１つを満たすかどうかを決定する。もしそうであれば、次いで、このパターンがその位置に割り当てられる。しかし、パターンｌおよびｋの両方が同時に満たされ得ることも可能である。なぜなら、これらは同じアミノ酸（詳細には、アスパラギン酸）を共有するからである。ｌおよびｋの同時の割り当てが生じる場合には、次いで、パターンｍ（レベルＩＩＩ）が、その位置に割り当てられる。同様に、パターンｋおよびｏの両方が同時に割り当てられ得ることが可能である。なぜなら、これらが、同じアミノ酸（詳細には、グルタミン酸）を共有するからである。ｋおよびｏの割り当てが同時に起こる場合には、次いで、パターンｑ（レベルＩＩＩ）がその位置に割り当てられる。レベルＩＩのパターンおよびレベルＩＩＩのパターン（ｍおよびｑ）のいずれもがアミノ酸配列中の特定の位置を満たさない場合には、アルゴリズムはレベルＩＩＩを実行する。

【００６６】

レベルＩＩＩは、パターンのセットｃ、ｅ、ｍ、ｑ、ｐ、およびｊを規定する。ここで、ｍ、ｑ、およびｐは、共通のアミノ酸残基を共有する。しかし、パターンｑは、レベルＩＩＩの分析においては試験されない。パターンｍおよびｐの両方が同時に満たされ得ることが可能である。なぜなら、これらが同じアミノ酸（詳細には、グルタミン酸）を共有するからである。ｍおよびｐの同時の割り当てが生じる場合には、次いで、パターンｒ（レベルＩＶ）がその位置に割り当てられる。配列されたアミノ酸配列中の予め選択された位置で７５％のアミノ酸がレベルＩＩＩのパターンを満たす場合には、次いで、レベルＩＩＩのパターンがその位置に割り当てられる。レベルＩＩＩのパターンがその位置に割り当てられない場合には、次いで、アルゴリズムはレベルＩＶの分析を履行する。

【００６７】

レベルＩＶは、２つの非重複パターンｆおよびｒを含む。アミノ酸配列中の特定の位置で７５％のアミノ酸がレベルＩＶのパターンを満たす場合には、次いで、そのパターンがその位置に割り当てられる。レベルＩＶのパターンが割り当てられない場合には、アルゴリズムは、その位置に任意のアミノ酸を示すＸ（レベルＶ）を割り当てる。

【００６８】

図８においては、レベルＩは、２０個の天然に存在するアミノ酸を１文字のアミノ酸コードで大文字で列挙する。レベルＩＩ－Ｖは、Ｓｍｉｔｈら（前出）において示されているアミノ酸の階層に基づいて、アミノ酸の群を小文字で規定する。図６に示されているアミノ酸配列は、上記のコンピューターアルゴリズムを使用して整列された。

【００６９】

当業者がＴＧＦ－βスーパーファミリーの現在同定されているメンバーに基づいて構築物を産生することを望む場合には、次いで、当業者は、図６に示されているアミノ酸配列を使用して、本発明の変異体の産生において有用な、フィンガー１領域、フィンガー２領域、およびヒール領域を提供し得る。本明細書以降に発見されたＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーの場合、新規のメンバーのアミノ酸配列は、本発明の実施に有用なヒールおよびフィンガー領域を規定するために、手動でまたはコンピューターアルゴリズムの手段のいずれかによって、図６に示されている配列とともに整列され得る。

【００７０】

以下の表１は、図６－８に示される配列アラインメントパターンを生成するために使用された、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのそれぞれのアミノ酸配列を記載する刊行物をまとめる。

【００７１】
【表１】

表 1

TGF-β スーパーファミリーメンバー	配列番号	出版
TGF-β1	40	Derynck 5 (1987) Nucl. Acids. Res. 15:3187
TGF-β2	41	Burt 5 (1991) DNA Cell Biol. 10:723-734
TGF-β3	42	Ten Dijke 5 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4715-4719; Derynck 5 (1988) EMBO J. 7:3737-3743.
TGF-β4	43	Burt 5 (1992) Mol. Endcrinol. 6:989-922.
TGF-β5	44	Kondaiah 5 (1990) J. Biol. Chem 265:1089-1093
dpp	45	Padgett 5 (1987) Nature 325:81-84; Paganiban et al. (1990) Mol. Cell Biol. 10:2669-2677.
vg-1	46	Weeks 5 (1987) Cell 51:861-867
vgr-1	47	Lyons 5 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:4554-4558
60A	48	Wharton 5 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9214-9218; Doctor 5 (1992) Dev. Biol. 151:491-505
BMP-2A	49	Wozney 5 (1988) Science 242: 1528-1534
BMP-3	50	Wozney 5 (1988) Science 242: 1528-1534
BMP-4	51	Wozney 5 (1988) Science 242: 1528-1534
BMP-5	52	Celeste 5 (1990) Proc. Natl. Acad Sci. USA 87: 9843-9847

【００７２】

BMP-6	53	Celeste 5 (1990) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 87: 9843-9847
Dorsalin	54	Basler 5 (1993) Cell 73:687-702
OP-1	55	Ozkaynak 5 (1990) Embo J. 9:2085-2093; Celeste 5 (1990) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 87: 9843-9847
OP-2	56	Ozkaynak 5 (1992) J. Biol. Chem.267: 25220-25227
OP-3	57	Ozkaynak 5 PCT/WO94/10203 SEQ ID NO: 1
GDF-1	58	Lee (1990) Mol. Endocrinol. 4: 1034-1040
GDF-3	59	McPherron 5 (1993) J. Biol. Chem. 268:3444-3449
GDF-9	60	McPherron 5 (1993) J. Biol. Chem. 268:3444-3449
インヒビンα	61	Mayo 5 (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5849-5853; Stewart 5 (1986) FEBS Lett 206:329-334; Mason 5 (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 135: 957-964
インヒビンβA	62	Forage 5 (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3091-3095; Chertov 5 (1990) Biomed. Sci. 1:499-506
インヒビンβB	63	Mason 5 (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:957-964

【００７３】

詳細には、本発明の実施において有用なフィンガー１領域を規定するアミノ酸配列が、本明細書中で同定された任意のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーについてのフィンガー１領域を規定するアミノ酸配列に対応することが、意図される。フィンガー１サブドメインは、ネイティブのタンパク質の特徴である、少なくとも生物学的および／または機能的特性（単数または複数）を付与し得る。有用なインタクトなフィンガー１領域として、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

ＴＧＦ－β１	配列番号４０、残基２から２９、
ＴＧＦ－β２	配列番号４１、残基２から２９、
ＴＧＦ－β３	配列番号４２、残基２から２９、
ＴＧＦ－β４	配列番号４３、残基２から２９、
ＴＧＦ－β５	配列番号４４、残基２から２９、
ｄｐｐ	配列番号４５、残基２から２９、
Ｖｇ－１	配列番号４６、残基２から２９、

Ｖｇｒ－１	配列番号４７、残基２から２９、
６０Ａ	配列番号４８、残基２から２９、
ＢＭＰ－２Ａ	配列番号４９、残基２から２９、
ＢＭＰ－３	配列番号５０、残基２から２９、
ＢＭＰ－４	配列番号５１、残基２から２９、
ＢＭＰ－５	配列番号５２、残基２から２９、
ＢＭＰ－６	配列番号５３、残基２から２９、
Ｄｏｒｓａｌｉｎ	配列番号５４、残基２から２９、
ＯＰ－１	配列番号５５、残基２から２９、
ＯＰ－２	配列番号５６、残基２から２９、
ＯＰ－３	配列番号５７、残基２から２９、
ＧＤＦ－１	配列番号５８、残基２から２９、
ＧＤＦ－３	配列番号５９、残基２から２９、
ＧＤＦ－９	配列番号６０、残基２から２９、
インヒビンα	配列番号６１、残基２から２９、
インヒビンβＡ	配列番号６２、残基２から２９、
インヒビンβＢ	配列番号６３、残基２から２９、
ＣＤＭＰ－１／ＧＤＦ－５	配列番号８３、残基２から２９、
ＣＤＭＰ－２／ＧＤＦ－６	配列番号８４、残基２から２９、
ＧＤＦ－６（マウス）	配列番号８５、残基２から２９、
ＣＤＭＰ－２（ウシ）	配列番号８６、残基２から２９、および
ＧＤＦ－７（マウス）	配列番号８７、残基２から２９。

【００７４】

本発明はさらに、周知のタンパク質ＢＭＰ－１２およびＢＭＰ－１３（その全体の開示が本明細書中で参考として援用されている、米国特許第５，６５８，８８２号において開示されている）に由来する対応するフィンガー１サブドメイン配列の使用を意図する。

【００７５】

本発明の実施において有用なヒール領域を規定するアミノ酸配列が、本明細書中で同定された任意のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーのインタクトなヒール領域を規定するアミノ酸に対応することもまた、意図される。ヒール領域は、機能的特性および／またはフォールディング特性を含む、ネイティブのタンパク質の特性に少なくとも影響を与え得る。有用なインタクトなヒール領域として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

ＴＧＦ－β１	配列番号４０、残基３５から６２、
ＴＧＦ－β２	配列番号４１、残基３５から６２、
ＴＧＦ－β３	配列番号４２、残基３５から６２、
ＴＧＦ－β４	配列番号４３、残基３５から６２、
ＴＧＦ－β５	配列番号４４、残基３５から６２、
ｄｐｐ	配列番号４５、残基３５から６５、
Ｖｇ－１	配列番号４６、残基３５から６５、
Ｖｇｒ－１	配列番号４７、残基３５から６５、
６０Ａ	配列番号４８、残基３５から６５、
ＢＭＰ－２Ａ	配列番号４９、残基３５から６４、
ＢＭＰ－３	配列番号５０、残基３５から６６、
ＢＭＰ－４	配列番号５１、残基３５から６４、
ＢＭＰ－５	配列番号５２、残基３５から６５、
ＢＭＰ－６	配列番号５３、残基３５から６５、
Ｄｏｒｓａｌｉｎ	配列番号５４、残基３５から６５、
ＯＰ－１	配列番号５５、残基３５から６５、

ＯＰ－２　配列番号５６、残基３５から６５、
ＯＰ－３　配列番号５７、残基３５から６５、
ＧＤＦ－１　配列番号５８、残基３５から７０、
ＧＤＦ－３　配列番号５９、残基３５から６４、
ＧＤＦ－９　配列番号６０、残基３５から６５、
インヒビンα　配列番号６１、残基３５から６５、
インヒビンβＡ　配列番号６２、残基３５から６９、
インヒビンβＢ　配列番号６３、残基３５から６８、
ＣＤＭＰ－１／ＧＤＦ－５　配列番号８３、残基３５から６５、
ＣＤＭＰ－２／ＧＤＦ－６　配列番号８４、残基３５から６５、
ＧＤＦ－６（マウス）　配列番号８５、残基３５から６５、
ＣＤＭＰ－２（ウシ）　配列番号８６、残基３５から６５、および
ＧＤＦ－７（マウス）　配列番号８７、残基３５から６５。

【００７６】

本発明はさらに、周知のタンパク質ＢＭＰ－１２およびＢＭＰ－１３（その全体の開示が本明細書中で参考として援用されている、米国特許第５，６５８，８８２号において開示されている）に由来する対応するヒール領域配列の使用を意図する。

【００７７】

本発明の実施において有用なフィンガー２領域を規定するアミノ酸配列が、本明細書中で同定された任意のＴＧＦ－βスーパーファミリーのメンバーについてのインタクトなフィンガー２領域を規定するアミノ酸配列に対応することもまた、意図される。フィンガー２サブドメインは、ネイティブのタンパク質の特徴である、少なくともフォールディング特性（単数または複数）を付与し得る。有用なインタクトなフィンガー２領域として、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

ＴＧＦ－β１　配列番号４０、残基６５から９４、
ＴＧＦ－β２　配列番号４１、残基６５から９４、
ＴＧＦ－β３　配列番号４２、残基６５から９４、
ＴＧＦ－β４　配列番号４３、残基６５から９４、
ＴＧＦ－β５　配列番号４４、残基６５から９４、
ｄｐｐ　配列番号４５、残基６８から９８、
Ｖｇ－１　配列番号４６、残基６８から９８、
Ｖｇｒ－１　配列番号４７、残基６８から９８、
６０Ａ　配列番号４８、残基６８から９８、
ＢＭＰ－２Ａ　配列番号４９、残基６７から９７、
ＢＭＰ－３　配列番号５０、残基６９から９９、
ＢＭＰ－４　配列番号５１、残基６７から９７、
ＢＭＰ－５　配列番号５２、残基６８から９８、
ＢＭＰ－６　配列番号５３、残基６８から９８、
Ｄｏｒｓａｌｉｎ　配列番号５４、残基６８から９９、
ＯＰ－１　配列番号５５、残基６８から９８、
ＯＰ－２　配列番号５６、残基６８から９８、
ＯＰ－３　配列番号５７、残基６８から９８、
ＧＤＦ－１　配列番号５８、残基７３から１０３、
ＧＤＦ－３　配列番号５９、残基６７から９７、
ＧＤＦ－９　配列番号６０、残基６８から９８、
インヒビンα　配列番号６１、残基６８から１０１、
インヒビンβＡ　配列番号６２、残基７２から１０２、
インヒビンβＢ　配列番号６３、残基７１から１０１、

ＣＤＭＰ－１／ＧＤＦ－５　　配列番号８３、残基６８から９８、
ＣＤＭＰ－２／ＧＤＦ－６　　配列番号８４、残基６８から９８、
ＧＤＦ－６（マウス）　　配列番号８５、残基６８から９８、
ＣＤＭＰ－２（ウシ）　　配列番号８６、残基６８から９８、および
ＧＤＦ－７（マウス）　　配列番号８７、残基６８から９８。

【００７８】

本発明はさらに、周知のタンパク質ＢＭＰ－１２およびＢＭＰ－１３（その全体の開示が本明細書中で参考として援用されている、米国特許第５，６５８，８８２号において開示されている）に由来する対応するフィンガー２サブドメイン配列の使用を意図する。

【００７９】

さらに、代表的なフィンガー領域およびヒール領域のアミノ酸配列が、アミノ酸置換によって（例えば、本明細書中に開示されているような置換残基を活用することによって）変更され得るか、またはＳｍｉｔｈら（１９９０）、前出において開示されている原理に従って選択され得ることが、意図される。簡潔には、Ｓｍｉｔｈらは、図８にまとめられているアミノ酸のクラスの階層に類似するアミノ酸のクラスの階層を開示する。これらは、タンパク質機能を含み得る型の全体的な立体構造的なひずみを最少にしながら、１つのアミノ酸を別のアミノ酸で合理的に置換するために使用され得る。任意の事象において、天然の領域とわずか７０％の相同性、好ましくは８０％の、そして最も好ましくは少なくとも９０％の相同性を有する、多くの合成の第１のフィンガー領域、第２のフィンガー領域、およびヒール領域の配列が、本発明の構築物を産生するために使用され得ることが意図される。

【００８０】

Ｓｍｉｔｈら（１９９０）前出に記載されている原理に従って推定される、フィンガー領域およびヒール領域の各位置で好ましいアミノ酸を示すアミノ酸配列のパターンもまた、図６－７に示され、そしてＴＧＦ－β；Ｖｇ／ｄｐｐ；ＧＤＦ；およびインヒビンサブグループのパターンと呼ばれる。各サブグループのフィンガー１、ヒール、およびフィンガー２の配列パターンを規定するアミノ酸配列は、それぞれ、図６Ａ、６Ｂ、および６Ｃに示される。さらに、全体的なＴＧＦ－β、Ｖｇ／ｄｐｐ、ＧＤＦ、およびインヒビンサブグループのパターンを規定するアミノ酸配列は、配列番号６４、６５、６６、および６７として、それぞれ配列表に示される。

【００８１】

図６Ａ、６Ｂ、および６Ｃに開示され、そして図７にまとめられている、各サブグループについての好ましいアミノ酸配列のパターンは、当業者が、フィンガー１、ヒール、およびフィンガー２のエレメント中の特定の位置で組み込まれ得る代替的アミノ酸を同定することを可能にする。一文字のアミノ酸コードで大文字で示されているアミノ酸は保存されているアミノ酸を示し、これらは共に、フィンガー領域およびヒール領域の構造的および機能的エレメントを規定すると考えられる。図６および７中の大文字の「Ｘ」は、任意の天然に存在するアミノ酸がその位置で受容可能であることを示す。図６および７中の小文字の「ｚ」は、ギャップまたは任意の天然に存在するアミノ酸のいずれかがその位置で受容可能であることを示す。小文字は、図８に示されているパターン規定の表に従って示されるアミノ酸を表記し、そしてその位置で有用であるアミノ酸の群を同定する。

【００８２】

図６～７に示されているアミノ酸配列のサブグループに従って、例えば、当業者が、どの適用可能な１つのアミノ酸が、生じるタンパク質構築物中に破壊的な立体化学的変化を誘導することなく別のアミノ酸で置換され得るかを推測し得る

ことが意図される。例えば、図６Ａにおいては、残基番号２および３でＶｇ／ｄｐｐサブグループのパターンにおいては、リジン残基（Ｋ）またはアルギニン残基（Ｒ）のいずれかが、生じる構築物の構造に影響を与えることなくこの位置に存在し得ることが意図される。従って、位置２および３での配列パターンは、「ｎ」を含み、これは、図８に従って、リジンまたはアルギニンからなる群から選択されるアミノ酸残基を規定する。従って、天然領域と７０％の相同性、好ましくは８０％の、そして最も好ましくは少なくとも９０％の相同性を有する、多くの合成のフィンガー１領域、フィンガー２領域、およびヒール領域のアミノ酸配列が、本発明の立体構造的に活性な構築物を産生するために使用され得ることが意図される。

【００８３】

これらの原理に従って、当業者が、図６および７に示される、ＴＧＦ－β、Ｖｇ／ｄｐｐ、ＧＤＦ、またはインヒビンのサブグループのパターンに属するアミノ酸配列のパターンを用いて開始することによって合成構築物を設計し得ることが意図される。従って、従来の組換えまたは合成方法論を使用することによって、予め選択されたアミノ酸が、本明細書中の原理によって指示されるように別のアミノ酸で置換され得、そして生じるタンパク質構築物は以下に提供されるように試験される。

【００８４】

ＴＧＦ－βサブグループのパターンである、配列番号６４は、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４、およびＴＧＦ－β５を含む、今日までに同定されているＴＧＦ－βのサブグループのメンバーの中で共有されている相同性に適応する。以下に示される一般的な配列は、保存アミノ酸（標準的な３文字コード）ならびに配列内の種々の位置に存在し、そして図８に示される規則によって規定される代替的アミノ酸（Ｘａａ）の両方を含む。

【００８５】

【化１】

TGF-β サブグループのパターン

Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Xaa Asp Leu Gly Trp
1 5 10 15

Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Xaa Ala Asn Phe Cys Xaa Gly
20 25 30

Xaa Cys Pro Tyr Xaa Trp Ser Xaa Asp Thr Gln Xaa Ser Xaa Val Leu
35 40 45

Xaa Leu Tyr Asn Xaa Xaa Asn Pro Xaa Ala Ser Ala Xaa Pro Cys Cys
50 55 60

Val Pro Gln Xaa Leu Glu Pro Leu Xaa Ile Xaa Tyr Tyr Val Gly Arg
65 70 75 80

Xaa Xaa Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Xaa Val Xaa Ser Cys Lys
85 90 95

Cys Ser.

【００８６】

各Ｘａａは、以下に規定される１つ以上の特定アミノ酸の群から独立的に選択され得、ここで

【００８７】

【化２】

Xaa12は Argまたは Lys; Xaa26は Ala, Arg,
Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyrまたは
Val; Xaa31は Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile,Leu, Lys, Met, Phe,
Pro, Ser, Thr, Trp, Tyrまたは Val; Xaa33は Ala, Gly, Pro, Ser,または Thr; Xaa37は Ile, Leu,
Metまたは Val; Xaa40は Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met,
Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyrまたは Val; Xaa44は His, Phe, Trpまたは Tyr; Xaa46は Argまたは
Lys; Xaa49は Ala, Gly, Pro, Ser,または Thr; Xaa53は Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys,
Serまたは Thr; Xaa54は Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met,
Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyrまたは Val; Xaa57は Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly,
His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyrまたは Val; Xaa61は Ala, Gly, Pro,
Ser,または Thr; Xaa68は Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met,
Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyrまたは Val; Xaa73は Ala, Gly, Pro, Ser,または Thr; Xaa75は Ile,
Leu, Metまたは Val; Xaa81は Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Serまたは Thr; Xaa82は
Ala, Gly, Pro, Ser,または Thr; Xaa91は Ileまたは Val; Xaa93は Argまたは Lys.

【００８８】

である。

【００８９】

Ｖｇ／ｄｐｐサブグループのパターンである、配列番号６５は、ｄｐｐ、ｖｇ－１、ｖｇｒ－１、６０Ａ、ＢＭＰ－２Ａ（ＢＭＰ－２）、Ｄｏｒｓａｌｉｎ、ＢＭＰ－２Ｂ（ＢＭＰ－４）、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－１（ＢＭＰ－７）、ＯＰ－２およびＯＰ－３を含む、今日までに同定されているＶｇ／ｄｐｐサブグループのメンバーの中で共有されている相同性に適応する。以下に示される一般的な配列は、保存アミノ酸（標準的な３文字コード）ならびに配列内の種々の位置に存在し、そして図８に示される規則によって規定される代替的アミノ酸（Ｘａａ）の両方を含む。

【００９０】

【化３】

Vg/dppサブグループパターン

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Asp Xaa Gly Trp Xaa
1               5                  10                  15
Asp Trp Ile Ile Alo Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly
            20                  25                  30
Xaa Cys Xaa Phe Pro Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Thr Asn His Ala
        35                  40                  45
Ile Xaa Gln Thr Leu Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro
    50                  55                  60
Lys Xaa Cys Cys Xaa Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala Xaa Ser Xaa Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Met
                85                  90                  95
Xaa Val Xaa Xaa Cys Gly Cys Xaa.
            100
```

【００９１】

各Ｘａａは、独立して、以下のように規定される１つ以上の特定のアミノ酸の群から選択され得る。ここで；Ｘａａ２は、ＡｒｇまたはＬｙｓ；Ｘａａ３は、ＡｒｇまたはＬｙｓ；Ｘａａ４は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ５は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ９は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ１１は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ１３は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ１６は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ２３は、Ａｒｇ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，またはＬｙｓ；Ｘａａ２６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ２８は、Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ３１は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ３３は、ＡｓｐまたはＧｌｕ；Ｘａａ３５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ３９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４０は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４２は、ＬｅｕまたはＭｅｔ；Ｘａａ４４は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ５０は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ５５は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ５６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５７は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ５８は、Ａｒｇ

, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ５９は、Ａｌａ, Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｃｙｓ, Ｇｌｕ, Ｇｌｎ, Ｇｌｙ, Ｈｉｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｌｙｓ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, Ｔｈｒ, Ｔｒｐ, Ｔｙｒ, Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６０は、Ａｌａ, Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｃｙｓ, Ｇｌｕ, Ｇｌｎ, Ｇｌｙ, Ｈｉｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｌｙｓ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, Ｔｈｒ, Ｔｒｐ, Ｔｙｒ, Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６１は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ６２は、Ａｌａ, Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｃｙｓ, Ｇｌｕ, Ｇｌｎ, Ｇｌｙ, Ｈｉｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｌｙｓ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, Ｔｈｒ, Ｔｒｐ, ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６３は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ６６は、Ａｌａ, Ｇｌｙ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, またはＴｈｒ；Ｘａａ６９は、Ａｌａ, Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｃｙｓ, Ｇｌｕ, Ｇｌｎ, Ｇｌｙ, Ｈｉｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｌｙｓ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, Ｔｈｒ, Ｔｒｐ, ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ７２は、Ａｒｇ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, またはＬｙｓ；Ｘａａ７４は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ７６は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ７８は、Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ８１は、Ｃｙｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｔｒｐ, ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８３は、Ａｓｎ, ＡｓｐまたはＧｌｕ；Ｘａａ８４は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８５は、Ａｌａ, Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｃｙｓ, Ｇｌｕ, Ｇｌｎ, Ｇｌｙ, Ｈｉｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｌｙｓ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, Ｔｈｒ, Ｔｒｐ, Ｔｙｒ, Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ８６は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８７は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８９は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ９１は、ＡｒｇまたはＬｙｓ；Ｘａａ９２は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ９４は、Ａｒｇ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, またはＬｙｓ；Ｘａａ９５は、ＡｓｎまたはＡｓｐ；Ｘａａ９７は、Ａｌａ, Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｃｙｓ, Ｇｌｕ, Ｇｌｎ, Ｇｌｙ, Ｈｉｓ, Ｉｌｅ, Ｌｅｕ, Ｌｙｓ, Ｍｅｔ, Ｐｈｅ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, Ｔｈｒ, Ｔｒｐ, ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９９は、Ａｒｇ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, またはＬｙｓ；ＸａａｌＯＯは、Ａｌａ, Ｇｌｙ, Ｐｒｏ, Ｓｅｒ, またはＴｈｒ；Ｘａａ１０４は、Ａｒｇ, Ａｓｎ, Ａｓｐ, Ｇｌｎ, Ｇｌｕ, Ｈｉｓ, Ｌｙｓ, ＳｅｒまたはＴｈｒである。

【００９２】

ＧＤＦサブグループパターンである配列番号６６は、現在までにＧＤＦ－１、ＧＤＦ－３およびＧＤＦ－９を含むと同定されたＧＤＦサブグループのメンバー間で共有される相同性を供給する。以下の一般的な配列は、この配列内の可変性位置に存在し、そして図８に示される規則によって規定される、保存されたアミノ酸（標準的な３文字コード）ならびに代替のアミノ酸（Ｘａａ）の両方を含む。

【００９３】

【化４】

GDF サブグループパターン
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa
1 5 10 15
Xaa Trp Xaa Xaa Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly
20 25 30
Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60
Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Val Pro Xaa Xaa Xaa Ser Pro Xaa
65 70 75 80
Ser Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xao Xaa Xaa Xaa Tyr
85 90 95
Glu Asp Met Xaa Xaa Xao Xaa Cys Xaa Cys Xaa.
100 105

【００９４】

各Ｘａａは、独立して、以下のように規定される１つ以上の特定のアミノ酸の群から選択され得る。ここで；Ｘａａ２は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ５は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ６は、Ｃｙｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ９は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａｌ１は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａｌ２は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａｌ３は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａｌ４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａｌ６は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａｌ７は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａｌ９は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ２０は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ２３は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ２４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ２５は、Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ２６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ２７は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ２８は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ

２９は、Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ３１は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ３３は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ３５は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ３６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ３７は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ３８は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ３９は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ４０は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ４４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ４５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ４６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ４７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４８は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ４９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５０は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５１は、Ｈｉｓ，Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ５２は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ５３は、Ｃｙｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５４は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ５５は、Ａｒｇ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，またはＬｙｓ；Ｘａａ５６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５７は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ５８は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ５９は、Ｈｉｓ，Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ６０は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅ

t，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６８は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ６９は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ７０は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ７１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ７５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ７６は、ＡｒｇまたはＬｙｓ；Ｘａａ７７は、Ｃｙｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８０は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ８２は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ８４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８６は、ＡｓｐまたはＧｌｕ；Ｘａａ８７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８８は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９０は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ９１は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ９２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９３は、Ｃｙｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９４は、ＡｒｇまたはＬｙｓ；Ｘａａ９５は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；ＸａａｌＯＯは、ＩｌｅまたはＶａｌ；ＸａａｌＯｌは、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ１０２は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ１０３は、Ａｒｇ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，またはＬｙｓ；Ｘａａｌ０５は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａｌ０７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，

Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌである。

【００９５】

インヒビンサブグループパターンである配列番号６７は、現在までにインヒビンα、インヒビンβＡおよびインヒビンβＢを含むと同定された。インヒビンサブグループのメンバー間で共有される相同性を供給する。以下の一般的な配列は、この配列内の可変性位置に存在し、そして図８に示される規則によって規定される、保存されたアミノ酸（標準的な３文字コード）ならびに代替のアミノ酸（Ｘａａ）の両方を含む。

【００９６】

【化５】

Inhibin サブグループパターン

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa
1               5                  10                  15
Xaa Trp Ile Xao Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Cys Xaa Gly
            20                  25                  30
Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xoo Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                85                  90                  95
Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa.
            100                 105
```

【００９７】

各Ｘａａは、独立して、以下のように規定される１つ以上の特定のアミノ酸の群から選択され得る。ここで；Ｘａａ２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ３は、ＡｒｇまたはＬｙｓ；Ｘａａ４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６は、Ｃｙｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ９は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａｌ１は、Ａｒｇ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，またはＬｙｓ；Ｘａａｌ２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａｌ３は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａｌ６は、Ａｓｎ，ＡｓｐまたはＧｌｕ；Ｘａａｌ７は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ２０は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ２１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，

Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ２３は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ２４は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ２５は、Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ２６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ２７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ２８は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ３１は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ３３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ３５は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ３６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ３７は、Ｈｉｓ，Ｐｈｅ，ＴｒｐまたはＴｙｒ；Ｘａａ３８は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ３９は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ４０は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ４１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４３は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ４４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４５は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ４６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４７は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ４８は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ４９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５０は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ５１は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ５２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５５は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ５６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，

Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５８は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ５９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６０は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ６４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６５は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ６６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６７は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ６８は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ６９は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ７２は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ７３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ７４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ７６は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ７７は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ７８は、ＬｅｕまたはＭｅｔ；Ｘａａ７９は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８０は、Ａｌａ，Ｇｌｙ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，またはＴｈｒ；Ｘａａ８１は、ＬｅｕまたはＭｅｔ；Ｘａａ８２は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８３は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ８４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８６は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇ

ｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ８７は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ８９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９０は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，Ｔｙｒ，Ｖａｌまたはペプチドボンド；Ｘａａ９１は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９２は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ９３は、Ｃｙｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９４は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９５は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ９６は、Ａｒｇ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，またはＬｙｓ；Ｘａａ９７は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ９８は、ＩｌｅまたはＶａｌ；Ｘａａ９９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；ＸａａＬｅｕは、ＬｅｕまたはＭｅｔ；Ｘａａ１０２は、Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，ＭｅｔまたはＶａｌ；Ｘａａ１０３は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌ；Ｘａａ１０４は、ＧｌｎまたはＧｌｕ；Ｘａａ１０５は、Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｇｌｎ，Ｇｌｕ，Ｈｉｓ，Ｌｙｓ，ＳｅｒまたはＴｈｒ；Ｘａａ１０７は、ＡｌａまたはＧｌｙ；Ｘａａ１０９は、Ａｌａ，Ａｒｇ，Ａｓｎ，Ａｓｐ，Ｃｙｓ，Ｇｌｕ，Ｇｌｎ，Ｇｌｙ，Ｈｉｓ，Ｉｌｅ，Ｌｅｕ，Ｌｙｓ，Ｍｅｔ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｓｅｒ，Ｔｈｒ，Ｔｒｐ，ＴｙｒまたはＶａｌである。

【００９８】

（Ｂ．組換え体産生の考察）

（１．本発明のタンパク質およびＤＮＡ構築物の設計および産生）

上で述べたように、本発明の構築物は、当該分野において周知でありそして徹底的に実証された従来の組換えＤＮＡ方法論の使用によって、ならびに慣用的なペプチド化学またはヌクレオチド化学および自動化したペプチド合成機またはヌクレオチド合成機を用いた周知の生合成の方法論および化学合成の方法論の使用によって、製造され得る。このような慣用的方法論は、例えば以下の出版物に記載され、その教示は本明細書中で参考として援用される：Ｈｉｌｖｅｒｔ，１Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２０１－３（１９９４）；Ｍｕｉｒら，９５　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　６７０５－１０（１９９８）；Ｗａｌｌａｃｅ，６　Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４０３－１０（１９９５）；Ｍｉｒａｎｄａら，９６　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１１８１－８６（１９９９）；Ｌｉｕら，９１　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　６５８４－８８（１９９４）。本発明中の使用に適したものは、天然に存在するアミノ酸およびヌクレオチド；天然には存在しないアミノ酸およびヌクレオチド；修飾されたアミノ酸および異常なアミノ酸；修飾された塩基；翻訳後に修飾されたアミノ酸および／または修飾された連結、架橋およびエ

ンドキャップ、非ペプチジルボンド、などを含むアミノ酸配列であり、そして、付録２中の表１～６を含むＷｏｒｌｄ Ｉｎｔｅｌｌｅｃｔｕａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｙ Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ（ＷＩＰＯ） Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｎ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｄｏｃｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ，Ｓｔａｎｄａｒｄ Ｓｔ．２５（１９９８）に開示された部分がさらに挙げられるが、これらに限定されない（これらは本明細書中で参考として援用される）。これらの等価物は、当該分野の知識と共に慣用的実験法のみに依存して、当業者によって評価され得る。

【００９９】

例えば、企図されるＤＮＡ構築物は、合成ヌクレオチド配列のアセンブリおよび／またはＤＮＡ制限酵素フラグメントを連結して合成ＤＮＡ分子を産生することによって製造され得る。次いでこのＤＮＡ分子は、発現ビヒクル（例えば発現プラスミド）へ連結され、そして適切な宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）へ形質転換される。次いでこのＤＮＡ分子によってコードされる企図されたタンパク質構築物が、発現され、精製され、リフォールディングされ、特定の特性（例えば、鋳型スーパーファミリーメンバーに対する結合親和性を有するレセプターとの結合活性）に関してインビトロにおいて試験され、そしてこの生合成構築物が、鋳型ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーの他の適切な特性を模倣するかどうかを評価するために引き続いて試験された。

【０１００】

あるいは、合成ＤＮＡ構築物のライブラリーが、例えば、前もって選んだ領域内のヌクレオチド組成と異なる合成ヌクレオチド配列のアセンブリによって同時に調製され得る。例えば、特異的ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーに基づく構築物の産生中に、当業者が、このようなスーパーファミリーメンバーにとって適切なフィンガーおよびヒールの領域を選び得ることは予期される（例えば、図６～７より）。一旦、適切なフィンガーおよびヒールの領域が選ばれると、当業者は、次いでこれらの領域をコードする合成ＤＮＡを産生し得る。例えば、異なるリンカー配列をコードする複数のＤＮＡ分子が、フィンガーおよびヒールの配列をコードするＤＮＡ分子を含む連結反応に含まれるならば、適切な制限酵素部位および反応条件の思慮深い選択によって、当業者は、各々のＤＮＡ構築物がフィンガーおよびヒールの領域をコードするが異なるリンカー配列によって結合されたＤＮＡ構築物のライブラリーを産生し得る。その結果生じるＤＮＡは、次いで適切な発現ビヒクル（すなわち、ファージディスプレイライブラリーの調製に有用なプラスミド）へ連結され、宿主細胞へ形質転換され、そして合成ＤＮＡによってコードされるポリペプチドは、候補タンパク質のプールを産生するために発現させた。候補タンパク質のプールは、前もって選んだレセプターに対する所望の結合親和性および／または選択性を有する特異的なタンパク質を同定するために引き続いてスクリーニングされ得る。

【０１０１】

スクリーニングは、候補タンパク質を含む溶液をレセプターが固定化された表面を備えるクロマトグラフィーカラムを通じて通過させることによって実施され得る。次いで、所望の結合特異性を伴うタンパク質が、例えば、塩勾配および／または鋳型ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーの濃度勾配によって溶出される。このようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、引き続き単離され得そして特徴付けられ得る。一旦、適切なヌクレオチド配列が同定されると、このリードタンパク質は、従来の組換えＤＮＡ方法論またはペプチド合成方法論のいずれかによって、特定の構築物が鋳型ＴＧＦβ－スーパーファミリーメンバーの活性を模倣するか否かを試験するために十分な量が引き続き産生され得る。

【０１０２】

どちらのアプローチが本発明の構築物をコードするＤＮＡ分子を産生するため

に採用されても、好ましいタンパク質の三次元構造が、例えば、本明細書中に記載の原理によって援助されるヌクレオチド変異誘発方法論およびファージディスプレイ方法論の組合せによって、結合活性および／または生物学的活性を最適化するために引き続き調節され得ることが企図される。従って、当業者は、多くのこのようなタンパク質を産生し得、そして同時に試験し得る。

【０１０３】

（ａ）遺伝子およびタンパク質合成

目的のアミノ酸配列をコードするＤＮＡを製造し、増幅し、そして組換えるためのプロセスは、該して当該分野において周知であり、それゆえ、本明細書中に詳細には記載しない。ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーをコードする遺伝子を同定しそして単離する方法はまた、よく理解されており、そして本特許および他の文献に記載される。

【０１０４】

手短には、本明細書中に開示された生合成構築物をコードするＤＮＡの構築は、配列特異的にＤＮＡを切断し平滑末端または突出末端を産生する種々の制限酵素、ＤＮＡリガーゼ、突出末端を平滑末端化されたＤＮＡへの酵素的付加を可能にする技術、短いまたは中間の長さのオリゴヌクレオチドのアセンブリによる合成ＤＮＡの構築、ｃＤＮＡ合成技術、ライブラリーから適切な核酸配列を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術、ならびにＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーおよびそららの同族のレセプターの遺伝子を単離するための合成プローブの使用を含む周知の技術を用いて実施される。発現の達成に用いられる（少しの例を挙げれば）細菌、哺乳動物、または昆虫由来の種々のプロモーター配列および他の調節ＤＮＡ配列ならびに種々の型の宿主細胞はまた、公知でありそして入手可能である。従来のトランスフェクションの技術、およびＤＮＡをクローニングおよびサブクローニングするための同等に従来の技術は、本発明の実施に有用であり、そして当業者に周知である。種々の型のベクター（例えばプラスミドならびに動物ウイルスおよびバクテリオファージを含むウイルス）が用いられ得る。このベクターは、首尾よくトランスフェクトされた細胞に検出可能な表現型特性（ベクターに組換えＤＮＡを首尾よく組み込まれたクローンのファミリーのものを同定するために用い得る特性）を与える種々のマーカー遺伝子を利用し得る。

【０１０５】

本明細書中に開示された生合成構築物をコードするＤＮＡを得るための方法の一つは、従来の、自動化オリゴヌクレオチド合成機において産生される合成オリゴヌクレオチドのアセンブリに引き続いて適切なリガーゼを伴う連結によるものである。例えば、重複した、相補的なＤＮＡフラグメントは、ホスホルアミダイド化学を用いて合成され得る末端セグメントは、連結中に重合を防ぐためにリン酸化されないままである。合成ＤＮＡの一端は、特定の制限エンドヌクレアーゼの作用の部位に相当する末端を伴ったままにし、そして合成ＤＮＡの他端は、他の制限エンドヌクレアーゼの作用の部位に相当する末端を伴ったままにする。この相補的ＤＮＡフラグメントは、共に連結されて、合成ＤＮＡ構築物を産生する。

【０１０６】

あるいはフィンガー１領域、フィンガー２領域およびヒール領域をコードする核酸鎖が、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編（１９８９）「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ」、Ｃｏｌｄｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹに記載のようなコロニーハイブリダイゼーション手順によって、および／またはＩｎｎｉｓら（１９９０）「ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ａ ｇｕｉｄｅ ｔｏ ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓに開示のようなＰＣＲ増幅方法論によっ

て、核酸のライブラリーから単離され得る。このフィンガー領域およびヒール領域をコードする核酸は、次いで共に連結され、目的の生合成一本鎖形態単位構築物をコードする合成ＤＮＡを産生する。

【０１０７】

しかし、その複数をコードするＤＮＡ構築物のライブラリーは、上述したもののような、標準的な組換えＤＮＡ方法論によって同時に産生され得る。例えば、カセット変異誘発またはオリゴヌクレオチド特異的変異誘発の使用によって、当業者は、例えば、あらかじめ定義された部位の範囲内（例えば、リンカー配列をコードするＤＮＡカセットの範囲内）に異なるＤＮＡ配列を各々が含む一連のＤＮＡ構築物を産生し得る。その結果生じるＤＮＡ構築物のライブラリーは、例えば、ファージディスプレイライブラリーもしくはウイルスディスプレイライブラリーまたは真核細胞株（たとえば、ＣＨＯ細胞株）において引き続き発現され得る；そして特異的レセプターに結合する任意のタンパク質構築物は、アフィニティ精製（例えば、レセプターが固定化された表面を備えるクロマトグラフィーカラムの使用）によって単離され得る。一旦前もって選択されたレセプターに結合する分子が単離されると、それらの結合特性およびアゴニストの特性は、経験的な精製技術を用いて調節され得る。

【０１０８】

タンパク質および核酸の変異誘発の方法は、周知であり、当該分野に十分に記載されている。Ｓａｍｂｒｏｏｋら、（１９９０） Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．、２ｄ ｅｄ．（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）を参照のこと。有用な方法は、ＰＣＲ（重複伸長、ＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒ（ＤｉｅｆｆｅｎｂａｃｈおよびＤｖｅｋｓｌｅｒ編、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９９５、ｐｐ．６０３～６１１）を参照のこと）；クンケル法の後のカセット変異誘発および一本鎖変異誘発を含む。これは、任意の適切な変異誘発方法が利用され得、そしてこの変異誘発法が本発明の重要な局面とみなされないことは当業者によって認識される。アルギニン（Ａｒｇ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）およびアスパラギン酸（Ａｓｐ）を含むアミノ酸をコードするのに的確な核酸コドンはまた、周知でありそして当該分野において記載される。例えば、Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎ．Ｙ．、Ｎ．Ｙ．）を参照のこと。アルギニン、グルタミン酸およびアスパラギン酸をコードする標準的なコドンは、Ａｒｇ：ＣＧＵ、ＣＧＣ、ＣＧＡ、ＣＧＧ，ＡＧＡ，ＡＧＧ；Ｇｌｕ：ＧＡＡ、ＧＡＧ；およびＡｓｐ：ＧＡＵ、ＧＡＣである。本発明の変異体の構築物は、切り替えられる核酸配列またはドメインを整列化すること、ならびに適合性のスプライス部位を同定することおよび／またはＰＣＲ重複伸長を用いた適切な乗り換え配列を構築することによって容易に構築され得る。

【０１０９】

（ｂ）タンパク質発現

本発明の利点の一つは、タンパク質発現およびタンパク質産生、特にタンパク質の商業的に重要な量に関連する。本明細書中に開示するように、変異体タンパク質は、増強された／改良されたリフォールディング特性のような特定の好ましい特性を与えられ得る。さらに、哺乳動物細胞において正しく発現され得なかった増強された／改良されたリフォールディング特性を伴う変異体タンパク質が、細菌細胞において発現されるために設計され得る。このような増強されたリフォールディングは、活性化型ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質の回収および商業的な産生を改良し得ることが予期される。哺乳動物細胞がミスフォールドタンパク質を同定し得、かつこのようなタンパク質が再利用されそして正しくリ

フォールドされることを可能にする細胞内プロセスを有することもまた予期される。しかし、このようなタンパク質は、究極的にそれらが正しくリフォールドし損なうならば、処分され得る。従って、細胞は、乏しいリフォールドタンパク質の再利用に費やす時間が少ないほど、使用可能なリフォールドタンパク質の産生により多くの時間を費やし得る。例えば、Ｔｒｏｍｂｅｔｔａら、８　Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５８７～９２（１９９８）を参照のこと。

【０１１０】

目的の単一ＤＮＡ構築物が合成されたならば、それは、発現ベクターへ組み込まれ得、そしてタンパク質発現に適切な宿主細胞へトランスフェクトされ得る。有用な原核生物宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ、およびＢ．Ｓｕｂｔｉｌｉｓを含むが、それに限定されない。有用な真核生物宿主細胞としては、酵母細胞、昆虫細胞、ミエローマ細胞、繊維芽細胞３Ｔ３細胞、サル腎臓細胞またはＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ミンク肺上皮細胞、ヒト包皮繊維芽細胞、ヒトグリア芽細胞腫細胞、およびテラトカルシノーマ細胞が挙げられるが、それに限定されない。あるいは、合成遺伝子は、ウサギ網状赤血球溶解物系のような無細胞系において発現され得る。

【０１１１】

さらにベクターは、転写プロモーターおよび終止配列、エンハンサー配列、適切なリボソーム結合部位配列、適切なｍＲＮＡ誘導配列、適切なタンパク質プロセッシング配列、タンパク質の分泌に適切なシグナル配列、などを含む組換え体タンパク質の正しい発現を促進する種々の配列を含み得る。目的の遺伝子をコードするＤＮＡ配列はまた、潜在的な阻害配列を除去するようにまたは不要な二次構造形成を最小化するように操作され得る。本発明の修飾されたタンパク質はまた、融合タンパク質として発現され得る。トランスフェクトされた後、タンパク質は細胞自身から精製され得、または培養培地から回収され得、次いで所望されたならば特異的なプロテアーゼ部位で切断され得る。

【０１１２】

例えば、遺伝子をＥ．ｃｏｌｉに発現させるならば、遺伝子は適切な発現ベクターにクローン化される。これは、ＴｒｐまたはＴａｃのようなプロモーター配列の下流に操作された遺伝子、および／またはプロテインＡのフラグメントＢ（ＦＢ）のようなリーダーペプチドをコードする遺伝子を配置することによって達成され得る。発現中に、その結果生じた融合タンパク質は、細胞の細胞質内の屈折体（ｒｅｆｌａｃｔｉｌｅ　ｂｏｄｙ）に蓄積し、そしてフレンチプレスまたは超音波処理による細胞の崩壊の後に収集され得る。単離された屈折体は、次いで可溶化され、そして発現したタンパク質は、本明細書中に教示されたようにリフォールドされる。

【０１１３】

もし所望されるならば、真核生物細胞での操作された遺伝子の発現が達成され得る。このことは、細胞および細胞株を必要とし、そしてこれらの細胞および細胞株はトランスフェクトするのに容易であり、再配列されない配列を伴う外来ＤＮＡを安定に維持することが可能であり、これらの細胞および細胞株は、効率的な転写、翻訳、翻訳後修飾、およびタンパク質の分泌に必要な細胞内構成成分を有する。さらに、目的の遺伝子を運ぶ適切なベクターもまた、必要である。哺乳動物細胞へのトランスフェクションのためのＤＮＡベクターの設計は、本明細書中に記載されるような目的の遺伝子の発現を促進するために適切な配列（適切な転写開始配列、終止配列、およびエンハンサー配列ならびに、コザックコンセンサス配列のような翻訳効率を増強する配列を含む）を含むべきである。適切なＤＮＡベクターはまた、マーカー遺伝子および目的の遺伝子のコピー数を増幅するための手段を含む。哺乳動物細胞での外来タンパク質の産生の技術水準（有用な

細胞、タンパク質発現促進配列、マーカー遺伝子、および遺伝子増幅法を含む）の詳細な総説は、Ｂｅｎｄｉｇ（１９９８） Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７：９１～１２７に開示される。

【０１１４】

特定の哺乳動物細胞において外来遺伝子を発現するために有用な最も特徴付けられた転写プロモーターは、ＳＶ４０初期プロモーター、アデノウイルスプロモーター（ＡｄＭＬＰ）、マウスメタロチオネインＩプロモーター（ｍＭＴ－Ｉ）、ラウスサルコーマウイルス（ＲＳＶ）長末端反復（ＬＴＲ），マウス乳腺腫ウイルス長末端反復（ＭＭＴＶ－ＬＴＲ）、およびヒトサイトメガロウイルス主要中間初期（ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ－ｅａｒｌｙ）プロモーター（ｈＣＭＶ）である。これらのプロモーターのすべてに関するＤＮＡ配列は、当該分野において公知であり、そして商業的に利用可能である。

【０１１５】

ｄｈｆｒ-細胞株の選択可能なＤＨＦＲ遺伝子の使用は、哺乳動物細胞系における遺伝子の増幅に有用な、十分に特徴付けられた方法である。簡単に、このＤＨＦＲ遺伝子は、目的の遺伝子を運ぶベクター上に提供され、そしてＤＨＦＲによって代謝される細胞傷害性の薬剤メトトレキセートの漸増濃度の付加は、目的の関連遺伝子増幅と同様にＤＨＦＲ遺伝子コピー数の増幅を導く。トランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣細胞株（ＣＨＯ細胞）において選択可能で、増幅可能なマーカー遺伝子としてのＤＨＦＲは、当該分野において特に十分に特徴付けられている。他の有用な増幅可能なマーカー遺伝子は、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）遺伝子およびグルタミンシンターゼ（ＧＳ）遺伝子を含む。

【０１１６】

細胞／細胞株の選択はまた、重要であり、そして実験者の要求に依存する。ＣＯＳ細胞は、本発明の生合成構築物を急速にスクリーニングするために有用な量を提供する、高いレベルの一過性の遺伝子発現を提供する。ＣＯＳ細胞は、代表的には目的の遺伝子を運ぶシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）ベクターと共にトランスフェクトされる。トランスフェクトされたＣＯＳ細胞は、最終的に死滅し、それ故に所望のタンパク質産生物の長期間の産生が妨げられる。しかし、一過性の発現は、安定な細胞株の開発のために必要とされる時間のかかる過程を必要とせず、従って結合活性について予備構築物を試験するために有用な技術を提供する。

【０１１７】

本発明の方法および生合成組換え体または化学合成タンパク質の個々の利点は、それらが、過剰発現の結果、封入体（そこからタンパク質が再可溶化されるべきで、そしてインビトロでリフォールディングされるべきである）の形成が生じるＥ．ｃｏｌｉの系および他の系のような、酵母細胞系および細菌細胞系における使用に十分適するということである。ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質変異体が哺乳動物細胞内で作られ得るとしても、いくつかの設計されたタンパク質構築物および変異体は、哺乳動物細胞において不安定であるようであり、そして細菌細胞を用いかつインビトロで変異体をリフォールディングすることによって、当該分野の現在の技術水準において、唯一作られ得る。本発明の実施において有用なタンパク質の詳細な記載は、それらをどのように作り、用い、そして骨形成活性について試験するかを含み、米国特許番号５，２６６，６８３および５，０１１，６９１を含む多数の刊行物（それらの開示は本明細書中に参考として援用される）ならびに本明細書中に列挙される任意の刊行物（その開示は本明細書中に参考として援用される）において、開示される。

【０１１８】

手短には、本発明の変異体型は、標準的な、周知の方法を用いて細菌および酵

母において発現されそして産生され得る。全長の成熟した型またはＣ末端の７つのシステインのドメインのみを規定する短い配列は、宿主細胞に提供され得る。Ｎ末端配列を修飾して細菌での発現を最適化することは、好ましくあり得る。例えば、未変性のＯＰ－１の細菌での発現に対して適切な型は、成熟した、活性配列をコードする配列（配列番号３９の残基２９３～４３１）またはそのＣ末端の７つのシステインのドメインをコードするフラグメント（配列番号３９の残基３３０～４３１）である。本来のセリン残基と置き換わって、メチオニンが、２９３位に導入され得、またはメチオニンは、このセリン残基の前方にあり得る。あるいは、メチオニンは、天然の配列の最初の３６残基（残基２９３～３２９）の中の任意の場所に導入され得る。ＤＮＡ配列は、精製を改善するために（例えば、ＩＭＡＣカラム上での精製を補助するために「６Ｈｉｓ」テールを付加することによって、またはＩｇＧ／カラム上での精製を容易にするＦＢリーダー配列を用いることによって）Ｎ末端でさらに修飾され得る。これらおよび他の方法は、当該分野において十分に記載されかつ周知である。他の細菌種および／またはタンパク質は、それらから得た変異ＢＭＰの収率を最適化するために類似の修飾から要求されるかまたは利益を得る。このような修飾は、十分に当業者のレベル内であり、そして本発明の実質的な局面とみなさない。

【０１１９】

合成核酸は、好ましくは選択した宿主細胞に過剰発現させるために適切なベクター内へ挿入される。選択した宿主細胞においてＢＭＰのような異種のタンパク質の発現を方向付け得る限りは、任意の発現ベクターが用いられ得る。有用なベクターとしては、少し例を挙げれば、プラスミド、ファージミド、ミニクロモソームおよびＹＡＣが挙げられる。他のベクター系は、周知であり、そして当該分野において特徴付けられている。このベクターは、代表的にはレプリコン、一つ以上の選択可能なマーカー遺伝子配列、および宿主細胞に高いコピー数のベクターを維持するための手段を含む。周知の選択可能なマーカー遺伝子は、アンピシリン、テトラサイクリンなどのような抗生物質および重金属耐性を含む。酵母細胞での使用するために有用な選択可能なマーカー遺伝子は、栄養要求性の酵母変異宿主とともに使用のためのＵＲＡ３遺伝子、ＬＥＵ２遺伝子、ＨＩＳ３遺伝子またはＴＲＰ１遺伝子を含む。加えて、ベクターもまた、目的の遺伝子を発現するための適切なプロモーター配列（これは誘導性であっても、誘導性でなくてもよい）、および所望であれば、有用な転写開始部位および翻訳開始部位、ターミネーター、ならびに目的の遺伝子の転写および翻訳を最大化し得る他の配列を含む。細菌細胞において特に有用な、十分特徴付けられたプロモーターとしては、少し例を挙げれば、ｌａｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、およびｔｐｐプロモーターが挙げられる。酵母で有用なプロモーターとしては、例えば、ＡＤＨＩ、ＡＤＨＩＩ，またはＰＨＯ５プロモーターが挙げられる。

【０１２０】

（ｃ）リフォールディングの考慮事項

例えばＥ．ｃｏｌｉによって産生されたタンパク質は、第一に封入体より単離され、次いでグアニジン塩酸または尿素のような変性剤またはカオトロピック剤によって、好ましくは約４～９Ｍの範囲でそして高い温度（例えば２５～３７℃）および／または塩基性ｐＨ（８～１０）で可溶化される。あるいは、タンパク質は、酸性化によって（例えば、酢酸またはトリフルオロ酢酸を用いて）、一般に１～４の範囲のｐＨで可溶化される。好ましくは、β－メルカプトエタノールまたはジチオトレイトール（ＤＴＴ）のような還元剤が、可溶化剤と組合せて用いられる。この可溶化された異種のタンパク質は、透析によっておよび／または公知のカラムクロマトグラフィーの方法によって（例えば、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、または逆相高性能液体クロマトグ

ラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）などによって）、可溶化したカオトロープからさらに精製され得る。

【０１２１】

本発明に従って、可溶化された変異体は、以下のようにリフォールディングされ得る。溶解したタンパク質は、リフォールディング媒体（代表的には、約ｐＨ５．０～１０．０の範囲のｐＨ、好ましくは約ｐＨ６～９の範囲、ならびに界面活性剤および／またはカオトロピック剤を含むｐＨトリス緩衝化媒体）中に希釈される。有用な市販の入手可能な界面活性剤は、例えば、ＮＰ４０（Ｎｏｎｉｄｅｔ４０）、ＣＨＡＰＳ（３－［（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパネスルフェートのような）、ジギトニン、デオキシコレート、またはＮ－オクチルグルコシドのような、イオン性、非イオン性、または双性イオン性であり得る。有用なカオトロピック剤としては、グアニジン、尿素、またはアルギニンが挙げられる。好ましくはカオトロピック剤は、約０．１～１０Ｍの範囲、好ましくは０．５～４Ｍの範囲の濃度で存在する。ＣＨＡＰＳが界面活性剤の場合、好ましくは溶液の約０．５～５％、さらに好ましくは溶液の約１～３％含まれる。好ましくは溶液はまた、少し例を挙げると酸化型および還元型のグルタチオン、ＤＴＴ，β－メルカプトエタノール、β－メルカプトメタノール、システインまたはシスタミンのような適切な酸化還元系を含む。好ましくは、酸化還元系は、還元剤対酸化剤の比が約１：１から約５：１の範囲で存在する。グルタチオン酸化還元系が用いられる場合、還元型グルタチオン対酸化型グルタチオンの比は、還元型対酸化型が好ましくは約０．５対５；さらに好ましくは１対１；そして最も好ましくは２対１の範囲である。好ましくは緩衝液はまた、約０．２５～２．５Ｍの範囲、好ましくは約０．５～１．５Ｍの範囲、最も好ましくは約１Ｍの範囲の塩（代表的にはＮａＣｌ）を含む。当業者は、上記の条件および媒体が、慣用的実験法のみを用いて最適化され得ることを認識する。このような変動および改変は、本発明の範囲内である。

【０１２２】

好ましくは、特定のリフォールディング反応のためのタンパク質濃度は、約０．００１～１．０ｍｇ／ｍｌの範囲であり、さらに好ましくはこれは約０．０５～０．２５ｍｇ／ｍｌの範囲であり、最も好ましくは０．０７５～０．１２５ｍｇ／ｍｌの範囲である。当業者によって認識されるように、より高濃度が、凝集をより多く産生する傾向がある。ヘテロダイマーが産生される場合（例えばＯＰ－１／ＢＭＰ－２またはＢＭＰ－２／ＢＭＰ－６ヘテロダイマー）、好ましくは個々のタンパク質は、等量のリフォールディング緩衝液に提供される。

【０１２３】

代表的にリフォールディング反応は、約４℃～約２５℃の範囲の温度にて生じる。より好ましくは、リフォールディング反応は、４℃にて実行され、完了まで行われる。代表的に、リフォールディングは約１日～７日において完了し、一般的に、１６～７２時間または２４～４８時間以内であり、これは、このタンパク質に依存する。当業者に理解されるように、リフォールディング率はタンパク質により変動し得、そしてより長いリフォールディング時間およびより短いリフォールディング時間が意図され、そして本発明の範囲内である。本明細書中で使用される場合、リフォールディング反応における総タンパク質と比較する場合、本明細書中に記載される任意のリフォールディングアッセイにより測定されるように、そしてさらなる精製を必要としない、フォールディング反応後、「良いリフォルダー（ｇｏｏｄ　ｒｅｆｏｌｄｅｒ）」タンパク質は、少なくとも、およそ１０％のタンパク質、より好ましくは、少なくともおよそ２０％のタンパク質およびさらにより好ましくは少なくともおよそ２５％タンパク質、ならびに最も好ましくは、２５％よりも多くのタンパク質が、リフォールディングされる。例えば、当該分野におて「良いリフォルダー」タンパク質と考えられているネイティ

ブのＢＭＰには、ＢＭＰ－２、ＣＤＭＰ－１、ＣＤＭＰ－２およびＣＤＭＰ－３が挙げられる。ＢＭＰ－３はまた、合理的に良くリフォールディングされる。対照的に、「乏しいリフォルダー（ｐｏｏｒ　ｒｅｆｏｌｄｅｒ）」タンパク質は、１％未満の最適にフォールドされたタンパク質を産生する。条件が、本明細書中に開示されるように最適に、混合かつ一致された場合、特定の実施態様が、最適にリフォールドされた状態においておよそ２５％以上のタンパク質を産生し得る。

【０１２４】

（２．スクリーニング、結合および生物学的活性の試験のためのアッセイの要旨）

どのタンパク質発現方法論、収集方法論、およびフォールディング方法論が使用されるかとは関係なく、特定の変異体タンパク質が、予め選択されたレセプターに優先的に結合し得、そして現在、標準的な方法論（すなわち、周知であり、そして徹底的に当該分野において実証されたリガンド／レセプター結合アッセイ）を使用して同定され得る。例えば、：Ｌｅｇｅｒｓｋｉら、（１９９２）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１８３：６７２～６７９；Ｆｒａｋａｒら、（１９７８）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ　８０：８４９～８５７；Ｃｈｉｏら、（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ　３４３：２６６～２６９；Ｄａｈｌｍａｎら、（１９８８）Ｂｉｏｃｈｅｍ　２７：１８１３～１８１７；Ｓｔｒａｄｅｒら（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．２６４：１３５７２～１３５７８；およびＤ’Ｄｏｗｄら、（１９８８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３；１５９８５～１５９９２を参照のこと。

【０１２５】

代表的に、リガンド／レセプター結合アッセイにおいて、予め選択されたレセプターに対する公知の定量可能な親和性を有する目的のネイティブのまたは親のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーを、検出可能な部分（例えば、放射標識、色素生産性標識、または蛍光発生標識）を用いて標識する。精製されたレセプター、レセプター結合ドメインフラグメントまたはその表面に目的のレセプターを発現する細胞のアリコートを、種々の濃度の非標識変異体タンパク質の存在下において、標識されたＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーとともにインキュベートする。候補変異体の相対結合親和性を、標識されたＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーとそのレセプターとの結合を阻害する変異体の能力を定量化することにより測定し得る。このアッセイを実施する際に、濃度の固定されたレセプターおよびＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーを、非標識キメラの存在および非存在下においてインキュベートする。感度は、標識されたテンプレートＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーを添加する前に、変異体と共にそのレセプターをプレインキュベートすることにより増加され得る。標識された競合物（コンペティター：ｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ）を添加した後、十分な時間により適切なコンペティター結合を可能にし、次いで、遊離した標識スーパーファミリーメンバーと結合した標識スーパーファミリーメンバーを、互いに分離し、そして一方または他方を測定する。

【０１２６】

スクリーニング手順の実施において有用な標識には、放射能標識（すなわち^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎまたは^{77}Ｂｒ）、色素生産性標識、分光学標識（例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲにより、Ｈａｕｇｈｌａｎｄ（１９９４）「Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　ａｎｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ第５版」において開示される標識）または高代謝回転率を有する複合化酵素（すなわち、化学発光基質または蛍光発生基質と組み合わせて使用される、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはβ－ガラクトシダーゼ）が挙げられる。

【０１２７】
生物学的活性、すなわち、生じた変異体構築物のアゴニスト特性またはアンタゴニスト特性を、任意のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーの生物学的活性を測定するために発展してきた通常のインビボおよびインビトロアッセイを使用して続いて特徴付けし得る。しかし、使用されるこの型のアッセイは、この変異体が基づくＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーに依存する。例えば、天然のＯＰ－１タンパク質に基づく変異体構築物を、ＯＰ－１活性を測定するために現在まで発展してきた任意の生物学的アッセイを使用してアッセイし得る（例えば、下記に示される例証のアッセイを参照のこと）。

【０１２８】
最適にリフォールディングされたダイマータンパク質は、任意の周知かつ良く特徴付けられた多くのアッセイを使用して、容易に評価され得る。特に、３つのアッセイの任意の１つ以上（周知かつ当該分野においてよく記載される）およびさらに下記に記述されるアッセイが、利益を得るためにために使用され得る。

【０１２９】
有用なリフォールディングアッセイは、以下の１つ以上を含む。第１に、ダイマーの存在を、ＤＴＴのような還元剤の非存在下における標準的なＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＨＰＬＣ（例えば、Ｃ１８逆相ＨＰＬＣ）のいずれかによって、視覚的に検出し得る。本発明のダイマータンパク質は、約２８～３６ｋＤａの範囲内の見かけの分子量を有し、モノマーサブユニットと比較される場合、これは約１４～１８ｋＤａの見かけの分子量を有する。ダイマータンパク質は、市販の分子量標準と比較することにより電気泳動ゲル上で容易に視覚化され得る。このダイマータンパク質はまた、Ｃ１８ＲＰ　ＨＰＬＣ（４５～５０％アセトニトリル：０．１％ＴＦＡ）から約１９分で溶出する（哺乳動物により産生されるｈＯＰ－１は約１８．９５分で溶出する）。第２のアッセイは、ヒドロキシアパタイトに結合するその能力によって、ダイマーの存在を評価する。最適にフォールドされたダイマーは、ｐＨ７、１０ｍＭリン酸、６Ｍ尿素、および０．１～０．２Ｍ　ＮａＣｌ（ダイマーは０．２５Ｍ　ＮａＣｌで溶出する）において、ヒドロキシパタイトカラムとよく結合し、モノマーと比較される場合、これは実質的にそれらの濃度において結合しない（モノマーは０．１Ｍ　ＮａＣｌで溶出する）。第３のアッセイは、このタンパク質のトリプシン消化またはペプシン消化に対する耐性により、ダイマーの存在を評価する。フォールドされたダイマー種は、実質的に両方の酵素（特にトリプシン）に対して耐性であり、これは成熟タンパク質のＮ末端の小さな部分のみを切断し、未処理のダイマーよりもサイズにおいてわずかに小さい生物学的に活性なダイマー種のみを残す（トリプシン切断後、各モノマーは２２アミノ酸だけ小さい）。対照的に、モノマーおよびミスフォールドされたダイマーは、実質的に分解される。このアッセイにおいて、このタンパク質は、標準的な条件（例えば、標準的な緩衝液（４Ｍ尿素、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．３％Ｔｗｅｅｎ－８０および２０ｍＭメチルアミンを含む５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８、のような）における消化）を使用して、酵素消化に共される。消化を、およそ１６時間、３７℃で起こさせ、そしてその産物は、任意の適切な手段（好ましくは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって視覚化される。

【０１３０】
リフォールドされたキメラタンパク質（例えば、ＢＭＰ）の生物学的活性は、下記のような多くの方法のいずれかによって容易に評価され得る。例えば、このタンパク質の軟骨内性骨形成を誘導する能力は、よく特徴付けされたラット皮下骨アッセイを使用して評価され得、以下に詳細に記載される。このアッセイにおいて、骨形成は、組織学ならびにアルカリホスファターゼおよび／またはオステオカルシン産生によって測定される。さらに、高い特異性の骨形成活性を有する骨形成タンパク質（例えば、ＯＰ－１、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５お

よびＢＭＰ－６）はまた、インビトロのラット骨芽細胞または骨肉腫細胞に基づくアッセイにおいてアルカリホスファターゼ活性を誘導する。このようなアッセイは、当該分野において十分に記載されており、本明細書中において以下に詳細に記載される。例えば、Ｓａｂｏｋｄａｒら、（１９９４）Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｍｉｎｅｒａｌ２７：５７～６７；Ｋｎｕｔｓｅｎら、（１９９３）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１９４：１３５２～１３５８；およびＭａｌｉａｋａｌら、（１９９４）Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ １：２２７～２３４）を参照のこと。対照的に、低い特異性の骨形成活性を有する骨形成タンパク質（例えば、ＣＤＭＰ－１およびＣＤＭＰ－２）は、例えば、細胞に基づく骨芽細胞アッセイにおけるアルカリホスファターゼ活性を誘導しない。従って、このアッセイは、ＢＭＰ変異体の生物学的活性を評価するための準備された方法を提供する。例えば、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６またはＯＰ－１よりも低い特異性の活性を有するが、ＣＤＭＰ－１、ＣＤＭＰ－２およびＣＤＭＰ－３はすべて骨形成を誘導するための成分である。逆に、ＣＤＭＰ－１、ＣＤＭＰ－２またはＣＤＭＰ－３よりも低い特異性の活性を有するが、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６およびＯＰ－１はすべて関節軟骨形成を誘導し得る。従って、ＣＤＭＰ変異体（細胞に基づくアッセイにおいてアルカリホスファターゼ活性を誘導することに対してコンピテントな変異体であることが本明細書中に設計かつ記載される）は、ラット動物バイオアッセイにおいてより高い特異性の骨形成活性を実証することが予期される。同様に、ＣＤＭＰ－１、ＣＤＭＰ－２またはＣＤＭＰ－３タンパク質の対応する位置に存在する置換を含むことを本明細書中で設計かつ記載されるＯＰ－１変異体は、ラットアッセイにおいて骨を誘導し得るが、細胞に基づくアッセイにおけるアルカリホスファターゼ活性を誘導せず、したがって、インビボ関節軟骨アッセイにおいて、活性を誘導する高度に特異的な間接軟骨を有することが予期される。本明細書中以下に記載されるように、ＣＤＭＰ活性についての適切なインビトロアッセイは、マウス胚の前骨芽細胞またはマウス癌細胞（例えば、ＡＴＤＣ５細胞）を利用する。下記実施例６を参照のこと。

【０１３１】

ＴＧＦ－β活性は、このタンパク質の上皮細胞増殖を阻害する能力によって容易に評価され得る。有用な十分に特徴付けられたインビトロアッセイは、ミンク肺細胞または黒色種細胞を利用する。実施例７を参照のこと。ＴＧＦ－βスーパーファミリーの他のメンバーについての他のアッセイは、文献において十分に記載されており、そして、過度の実験を伴わずに実施され得る。

【０１３２】

（３．処方および生物活性）

生じた変異タンパク質は、インビボの事象を増強、阻害または他の調節をするための治療の一部として個体に提供され得、その事象には、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーと１つ以上のその同族レセプターとの間の結合相互作用がげられるが、限定されない。以下のように、この構築物は薬学的組成物において処方され得、そして任意の適切な手段（好ましくは、直接または体系的に、例えば、非経口的または経口的に）によって、形態形成的に有効な量において投与され得る。好ましい変異タンパク質をコードする、生じたＤＮＡ構築物はまた、遺伝子治療の目的のために、レシピエントに直接投与され得、このようなＤＮＡが、キャリア成分を伴うか、もしくは伴わずに、またはマトリックス成分を伴うか、もしくは伴わずに投与され得る。あるいは、このようなＤＮＡ構築物を移入された細胞は、レシピエントにおいて移植され得る。このような物質および方法は、当該分野において周知である。

【０１３３】

本明細書中に開示されるこの任意の構築物が直接（例えば、注射により局所的

に、所望される組織部位に）または非経口的に（例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、眼窩内投与、眼投与、脳室内投与、頭蓋内投与、関節内投与、脊髄内投与、槽内投与、腹腔内投与、頬投与、直腸投与、膣投与、鼻腔内投与によって、またはエアロゾル投与によって）提供される場合、この治療的組成物は、好ましくは水溶液の部分を含む。この溶液は好ましくは生理学的に受容可能であり、故に、患者への所望の構築物の送達に加えて、この溶液は、患者の電解質バランスおよび体積バランスに別の不利な影響を及ぼさない。従って、この治療分子のための水性媒体は、例えば、通常の生理的食塩水（０．９％ＮａＣｌ、０．１５Ｍ）、ｐＨ７～７．４または他の薬学的に受容可能なその塩の水性媒体を含み得る。

【０１３４】

経口または非経口的投与のための有用な溶液は、薬学的分野において周知の任意の方法によって調製され得る（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，（Ｇｅｎｎａｒｏ，Ａ．編），Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．，１９９０に記載される）。例えば、処方物はポリアルキレングリコール（例えば、ポリエチレングリコール）、野菜起源の油、水素化ナフタレンなどを含み得る。特に、直接投与のための処方物は、グリセロールおよび他の高い粘度の組成物を含み得る。生体適合性、好ましくは生体再吸収可能な（ｂｉｏｒｅｓｏｒｂａｂｌｅ）ポリマー（例えば、ヒアルロン酸、コラーゲン、リン酸三カルシウム、ポリ酪酸、ポリラクチド、ポリグリコリド、およびラクチド／グリコリドコポリマーを含む）が、インビボでのモルフォゲンの放出を制御するための有用な賦形剤であり得る。

【０１３５】

これら治療的分子のための他の潜在的に有用な非経口的送達系は、エチレンビニル酢酸コポリマー粒子、浸透圧ポンプ（ｏｓｍｏｔｉｃ　ｐｕｍｐ）、移植可能な注入系（ｉｍｐｌａｎｔａｂｌｅ　ｉｎｆｕｓｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ）およびリポソームを含む。吸入投与のための処方物は、賦形剤として例えばラクトースを含み得るか、あるいは、例えば、ポリオキシエチレン－９－ラウリルエーテル、グリココール酸およびデオキシコール酸を含む水溶液もしくは点鼻薬の形態における投与のための油性溶液になり得るか、またはゲルとして鼻腔内に適用される。

【０１３６】

最終的に、治療的分子は、単独または他の組織形態形成に影響を及ぼすことが既知である他の分子すなわち、組織を修復ならびに再生し得、そして／または炎症を阻害し得る分子と組み合わせて投与され得る。骨粗鬆症個体における骨組織増殖を刺激するための有用な補因子の例には、例えば、ビタミンD_3、カルシトニン、プロスタグランジン、副甲状腺ホルモン、デキサメサゾン、エストロゲン、およびＩＧＦ－ＩまたはＩＧＦ－ＩＩが挙げられるが、これらに限定されない。神経組織の修復および再生のために有用な補因子は、神経増殖因子を含み得る。他の有用な補因子は、症状軽減補因子（ｓｙｍｐｔｏｍ　ａｌｌｅｖｉａｔｉｎｇ　ｃｏｆａｃｔｏｒ）が挙げられ、これには防腐剤、抗生物質、抗ウイルス剤および抗真菌剤ならびに鎮痛剤および麻酔薬が含まれる。

【０１３７】

治療的分子はさらに、薬学的に受容可能な非毒性賦形剤およびキャリアを有する混和剤によって、薬学的組成物に処方され得る。上記のように、そのような組成物は、特に脂質溶液または懸濁液の形態において、非経口的投与のために調製され得；特に錠剤およびカプセルの形態において、経口投与のために調製され得；または鼻腔内では、特に粉末、点鼻薬またはエアロゾルの形態において調製され得る。組織表面への癒着が所望される場合、この組成物は、フィブリノゲン－トロンビン組成物または他の生接着性組成物（例えば、ＰＣＴ　ＵＳ９１／０９

２７５に開示（その開示は参考として援用される）されるような）中に分散される生合成構築物を含み得る。次いで、この組成物は、塗布され、噴霧され、またはさもなくば所望の組織表面に適用される。この組成物は、治療的に有効量（例えば、その量は、所望される効果を誘導するのに十分な時間、標的組織に適切な濃度の形態単位を提供する）においてヒトまたは他の哺乳動物への非経口的投与または経口的投与のために処方され得る。

【０１３８】

この治療的分子は、組織保存溶液または器官保存溶液の部分を含む場合、任意の市販の保存溶液が都合よく使用され得る。例えば、当該分野において公知の有用な溶液には、Ｃｏｌｌｉｎｓ溶液、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ溶液、Ｂｅｌｚｅｒ溶液、Ｅｕｒｏｃｏｌｌｉｎｓ溶液および乳酸加リンガー溶液が挙げられる。保存溶液および有用な成分の詳細な記載は、例えば、米国特許第５，００２，９６５号において見出され得、その開示は、本明細書中に参考として援用される。

【０１３９】

いくつかのタンパク質構築物は（例えば、Ｖｇ／ｄｐｐサブグループのメンバーに基づくタンパク質構築物）はまた、マトリックスと組み合わされる場合、高レベルのインビボ活性を示すことが意図される。例えば、米国特許第５，２６６，６８３号を参照のこと（この開示は本明細書中に参考として援用される）。現在好ましいマトリックスは、天然における外因性マトリクス、同種異型マトリクスまたは自原性マトリックスである。しかし、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ酪酸、その誘導体およびコポリマーを含む合成材料もまた使用されて適切なマトリックスを産生し得ることが意図される。好ましい合成および天然に由来するマトリックス材料、それらの調製、本発明の形態形成タンパク質とともにそれらを処方するための方法および投与の方法は当該分野において周知であり、そのことから本明細書中において詳細に議論されない。例えば、米国特許第５，２６６，６８３号を参照のこと（この開示は、本明細書中において参考として援用される）。さらに、補綴デバイスのマトリックスまたは金属表面との結合、接着、または会合は、本明細書中に開示される材料または方法を使用して変えられ得ることに起因するということが本明細書中において意図される。例えば、増強されたマトリックス接着特性を有する本発明のマトリックスおよび骨活性構築物を含むデバイスが、徐放デバイスとして使用され得る。当業者は、その変動および操作は、現在、本明細書中における教示を考慮に入れると可能であることを理解する。

【０１４０】

当業者によって理解されるように、治療的組成物中の記載される化合物の濃度は多数の因子（投与されるべき形態形成有効量、使用される化合物の化学的特徴（例えば、疎水性）、および投与経路）に依存して変化する。投与されるべき薬物の好ましい投薬量もまた、おそらく、疾患、組織損失または欠損の型および程度、特定の患者の全体の健康状態、選択された化合物の相対的な生物学的有効性、この化合物の処方、処方物中の賦形剤の存在および型ならびに投与経路のような変数に依存する。大まかに言えば、本発明の治療的分子は、１日あたり約１０ｎｇ／ｋｇ体重～約１ｇ／ｋｇ体重の範囲の代表的用量で個体に提供され得る（好ましい用量範囲は、約０．１ｍｇ／ｋｇ体重～１００ｍｇ／ｋｇ体重である）。

【０１４１】

（ＩＩ　特定の改変されたタンパク質変異体）

いくつかの一般的な型の構築物が、ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質フォールディングを、ｆ２サブドメインの操作を用いて改善するために調製および評価された。本明細書中で言及されるように、ｆ２サブドメイン領域は、２つのＣｙｓ（表２、１～３１残基を参照のこと）の後から始まる。ｆ２サ

ブドメインのベース／ネック（ｂａｓｅ／ｎｅｃｋ）領域は、１～１０残基および２２～３１残基からなる。

【０１４２】

一般的に、本発明によって意図される構築物の型は、以下の変異体を含む：（１）Ｃ末端残基（一般的には残基番号３５）が、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｌｅｕ、Ａｌａ、またはＩｌｅで置換されている；（２）ｆ２領域における親水性残基の数が増加している；（３）ｆ２サブドメインのベース領域中の酸性残基の数が増加している（代表的には、４位、６位、９位、２５位、２６位および３０位の少なくとも１つにおいて、塩基性残基またはアミド残基の代わりの置換体としてＧｌｕまたはＡｓｐを使用することによる）；（４）極性残基を有するヒドロキシル基の数が増加している（代表的には、ベース領域（４位、６位、９位、２５位、２６位および３０位）において、親水性残基を有する、少なくとも１つの塩基性残基またはアミド基を、ＳｅｒまたはＴｈｒで置き換えることによる）；（５）ｆ２領域のすべてまたは一部を、良好なリフォールダー（例えば、ＢＭＰ－２またはＣＤＭＰ－２）に配置する；または（６）ｆ２ドメインの一部を、良好なフォールダーに由来するｆ２サブドメインの一部と交換する。当業者は、これらの特異的な残基が非限定であり、そして例示的な残基として提供されることを認識する。

【０１４３】

本発明の教示はまた、同時係属出願［代理人登録番号第ＳＴＤ－０７５号および代理人登録番号第ＳＴＫ－０７７号、本明細書と同日に出願された］において記載される改変と組み合わせられ得、この開示は、本明細書中で参考として援用される。

【０１４４】

本発明に従って、ネイティブなＢＭＰの性状またはＴＧＦ－βスーパーファミリーのタンパク質の他のメンバー（そのヘテロダイマーおよびホモダイマーを含む）は、ＢＭＰまたはＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーの１つ以上の生物学的特性を変更するためにネイティブなタンパク質のｆ２サブドメインを改変することによって変えられる。この発見の結果として、ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質を、以下のように設計することが可能である；（１）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質がポリペプチドまたはヌクレオチド合成装置を使用して合成された原核細胞または真核細胞において組み変え的に発現される；（２）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、変更されたフォールディング性状を有する；（３）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、中性ｐＨ（生理学的に適合する条件を含むが限定されない）下における変更された溶解性を有する；（４）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、変更された等電点を有する；（５）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、変更された安定性を有する；（６）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、変更された組織またはレセプター特異性を有する；（７）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、再設計されて変更された生物学的活性を有する；および／または（８）ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質が、固体表面（例えば、生体適合性マトリックスまたは金属が挙げられるがこれらに限定されない）に対する変更された結合特性または接着特性を有する。従って、本発明は、好ましいタンパク質構築物を含む速放性処方物、徐放性処方物および／または時限放出性処方物を設計するための機構を提供し得る。他の利点および特徴が、以下の教示により明らかである。さらに、本明細書中に開示される発見を利用して、変更された表面結合／表面接着特性を有する改変されたタンパク質が設計かつ選択され得る。特に重要な表面には、天然に存在し得る固体表面（例えば、骨）、または多孔性粒子表面（例えば、コラーゲン、または他の生体適合性マトリックス）または補綴移植物の作製された表面（金属を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書中に意図されるように、実質的に任意の表面が、構築物の差次的結合についてアッセイされ得る。従って、本発明は、その表面結合／表面接着特性における改変を有する多様な機能性分子を含み、それによって、変更されたインビボ適用（徐放性処方物、速放性処方物および／または時限放出性処方物を含む）について有用なこのような構築物を与える。

【０１４５】

当業者は、１つ以上の上記の任意の性状を混合し、かつ整合することは、カスタマイズされたタンパク質（およびこのタンパク質をコードするＤＮＡ）の用途を操作する特定の機会を提供する。例えば、変更された安定性の性状が開発され、タンパク質のインビボにおける回転を操作し得る。さらに、タンパク質がまた、このような変更されたリフォールディングおよび／または機能の性状を有する場合、おそらく、フォールディング、機能、および安定性との間に内部接続が存在する。例えば、Ｌｉｐｓｃｏｍｂら、７Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．７６５～７３（１９９８）；およびＮｉｋｏｌｏｖａら、９５Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１４６７５～８０（１９９８）を参照のこと。本発明の目的のために、安定性変化は、変性剤濃度または温度の関数として安定性の円二色性の他の指標の周知の技術を使用して慣用的にモニターされ得る。また、慣用的な熱量測定走査を使用し得る。同様に、任意の前述の性状と溶解度の性状との間におそらく相互関連が存在する。溶解度の場合、タンパク質構築物が、生理学的に適合する条件下においてより多く溶解するようになるか、もしくはより少なく溶解するようになるかのいずれかになるようにこの性状を操作することが可能であり、結果として、インビボにおいて投与される場合、それはそれぞれ容易に拡散するか、または局在化する。

【０１４６】

改変された性状を有するタンパク質構築物の上記の用途に加えて、改変された安定性を有するキメラ構築物はまた、有効期間、保存、および／または出荷の検討に関する実用上の利点のために用いられ得る。さらに関連事項について、改変された安定性はまた、投薬量の検討に直接影響し得、それによって、例えば、処置の費用を削減する。

【０１４７】

構築物の特に重要なクラスは、可溶化されるキャリアまたは賦形剤に対する改変された結合を有するものである。制限されない例として、可溶化されたキャリア（例えば、ヒアルロン酸）に対する増強された結合を有する、改変されたＢＭＰは、当業者が、拡散剤（ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ）または体液のいずれかにより、ＢＭＰの損失または希釈なしに、欠損部位に注射可能処方物を投与することを可能にする。従って、局在は最大となる。当業者は、本教示により改変が可能であることを理解する。同様に、身体／組織の構成要素に対する改変された結合を有する、構築物の別のクラスが、開発され得る。制限されない例として、インサイチュインヒビターに対する減少された結合を有する、改変されたＢＭＰを用いて、インビボで特定の組織の修復を増大させ得る。例えば、軟骨組織が、ネイティブのＢＭＰの活性を阻害し得る体液および／または軟骨自体において見出される特定のタンパク質と関連することは、当該分野で周知である。しかし、改変された結合特性を有するキメラ構築物は、これらのインサイチュインヒビターの効果を克服し得、それにより修復などを増強する。当業者は、本教示により改変が可能であることを理解する。

【０１４８】

ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質であるＯＰ－１の変異体は、その保存性改変体を含む、以下のいずれかであり得、ここで数字は、変異の残基位置を示し、続いて置換されたアミノ酸残基（一文字コード）、続いて矢印および置換する残基の一文字コードを示す。

【０１４９】
【化６】

OP-1 (4Q>E); OP-1 (6N>S); OP-1 (25R>E); OP-1 (26 N>D); OP-1 (4Q>E 6N>S); OP-1 (30R>E); OP-1 (25R>E 26N>D); OP-1 (4Q>E 25R>E); OP-1 (4Q>E 30R>E); OP-1 (25R>E 26N>D); OP-1 (25R>E 30R>E); OP-1 (26N>D 30R>E); OP-1 (4Q>E 26N>D 30R>E); OP-1 (4Q >E 26N>D); OP-1 (4Q>E 25R>E 26N>D),

【０１５０】
ならびに、さらなる置換を有するこれらの変異体のいずれか：３５Ｈ＞Ｒ（配列番号３９の４３１位）。
配列番号３９を含む命名法において、ＯＰ－１変異体は、以下の任意の１つである：
【０１５１】
【化７】

OP-1 (400Q>E); OP-1 (402N>S); OP-1 (421R>E); OP-1 (422N>D); OP-1 (400Q>E 402N>S); OP-1 (426R>E); OP-1 (421R>E 422N>D); OP-1 (400Q>E 421R>E); OP-1 (400Q>E 426R>E); OP-1 (421R>E 422N>D); OP-1 (421R>E 426R>E); OP-1 (422 N>D 426R>E); OP-1 (400Q>E 422N>D 426R>E); OP-1 (400Q>E 422 N>D); OP-1 (400Q>E 421R>E 422N>D),

【０１５２】
ならびに、さらなる置換を有するこれらの変異体のいずれか：４３１Ｈ＞Ｒ。
【０１５３】
他のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質の変異体もまた、再フォールディングが乏しいタンパク質（その改変体およびキメラタンパク質を含む）中で、４位、６位、９位、２５位、２６位、３０位の少なくとも１つに存在する置換を含み得、中でも、そのタンパク質は以下：ＢＭＰ－５（配列番号５）、ＢＭＰ－６（配列番号６）、ＯＰ－２（配列番号２６）、ＯＰ－３（配列番号２７）、６０Ａ（配列番号１）、Ｖｇ１（配列番号３５）、ＤＰＰ（配列番号１２）、ＧＤＦ－１（配列番号１３）、ＧＤＦ－３（配列番号１４）、ＧＤＦ－５（配列番号１５）、ＧＤＦ－６（配列番号１６）、ＧＤＦ－７（配列番号１７）、ＢＭＰ－３（配列番号３）、ＣＤＭＰ－２（配列番号１０）、ＢＭＰ－１０（配列番号８）、ＧＤＦ－９（配列番号１８）、インヒビンＡ（配列番号２０）、インヒビンβＡ（配列番号２１）、インヒビンβＢ（配列番号２２）、インヒビンβＣ（配列番号２３）、ＢＭＰ－１１（配列番号９）である。さらに、これらの変異体のいずれかはまた、Ｃ末端残基の、アルギニン、セリン、ロイシン、イソロイシン、またはアラニンのいずれか１つへの置換を含み得る。
【０１５４】
置換はまた、他のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質（配列番

号２９～３３）またはＮＯＤＡＬ（配列番号２５）のいずれかにおいて、以下の位置：４位、６位、９位、２４位、２５位、２９位の少なくとも１つ；ＵＮＩＶＩＮ（配列番号３４）における以下の位置：４位、６位、９位、２４位、２５位、２６位、３０位の少なくとも１つ；ＢＭＰ－９（配列番号７）およびＤｏｒｓａｌｉｎ（配列番号１１）における以下の位置：４位、６位、９位、２６位、２７位、および３１位の少なくとも１つに存在し得る。

【０１５５】

ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体は、組換え、化学合成、または生合成の手段を通して作製され、これらの手段は、ＤＮＡ分子、ＲＮＡ分子、およびＰＮＡ（ペプチド核酸）分子を含む核酸分子を使用する工程を包含し、その核酸分子は、置換された本発明のＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質ならびにネイティブなまたは改変されたアミノ酸のいずれかをコードする。この置換は、これらの位置の１つ以上で、非酸性残基を酸性残基（例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸）で置き換える形態であり得る。あるいは、この置換はまた、ペプチド配列中の１つ以上のこれらの位置で、アミノ酸をセリンまたはスレオニンで置き換えることを含む。置換はまた、Ｃ末端残基をアルギニンで置き換えることを含む。このことは、トリプレットのヌクレオチドを置き換えて、以下のいずれかを作製することによってなされ得る：ＡＧＡ　ＡＧＧ　ＣＧＧ　ＣＧＣ　ＣＧＡ　またはＣＧＵ。ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバー変異体は、上記の置換のいずれか１つまたは任意の組み合わせを含み得る。

【０１５６】

図４Ａおよび４Ｂは、種々の変異体およびそれらの再折りたたみおよび生物学的活性の特性の模式図である。図面において、太い実線は、ＯＰ－１（配列番号３９の残基３３０～４３１）を表し、細い実線は、ＣＤＭＰ－２／ＧＤＦ－６（配列番号８４）またはＧＤＦ－５（配列番号８３）を示し、そして斜線は、ＢＭＰ－２（配列番号）４９を示す。変異構築物は、図４Ａに示され、そして個々の配列変異体は、図４Ｂに示される。図面において、個々の残基変化は、図面の残基の置換により示される。残基の番号付けは上記の通りであり、フィンガー２の二重のシステイン（ｃｙｓｔｅｉｎ　ｄｏｕｂｌｅｔ）の後にある最初の残基から数える。例えば、変異体Ｈ２２３３は、ＯＰ－１（２５Ｒ＞Ｅ　２６Ｎ＞Ｄ　３０Ｒ＞Ｅ　３５Ｈ＞Ｒ）である。同様に、変異体Ｈ２４４７は、Ｈ２２３３における変化を全て有し、そしてさらに、１Ａ＞Ｖ　４Ｑ＞Ｅ　６Ｎ＞Ｓを有する。変異体Ｈ２４３３は、ＯＰ－１（４Ｑ＞Ｋ　３５Ｈ＞Ｒ）であり、そして変異体Ｈ２４５６は、ＯＰ－１（４Ｑ＞Ｅ　６Ｎ＞Ｓ　２５Ｒ＞Ｅ　２６Ｎ＞Ｄ　３０Ｒ＞Ｅ　２５Ｈ＞Ｒ）である。

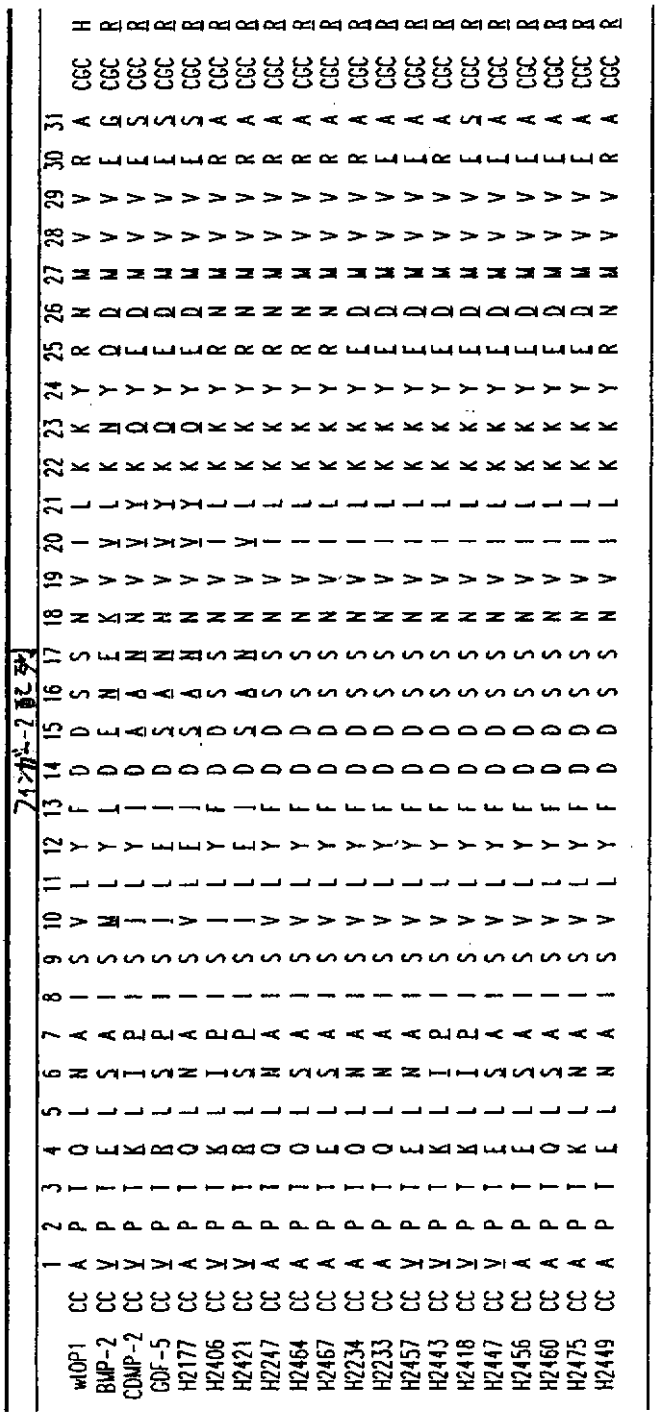
【０１５７】

表２は、種々の骨形成タンパク質のフィンガー２サブドメインおよびその変異改変体構築物の配列を提供する。二重のシステインの後ろに続く最初の残基で始まり、そしてこれは、以下に記載されるようにネイティブな配列に対応する。表において、ＯＰ－１とは異なる残基には、下線を付す。１つのキメラ構築物は、Ｈ２４２１：ＧＤＦ－５（配列番号１５）由来の残基１～２０およびＯＰ－１（配列番号３９）由来の残基２１～３４である。別の構築物は、Ｈ２４０６：ＣＤＭＰ（ＣＭＰ－２）（配列番号１０）由来の残基１～１０、およびＯＰ－１（配列番号３９）由来の残基１１～３４である。別の構築物は、Ｈ２４１０：ＢＭＰ－２（配列番号２）由来の残基１～３５である。別の構築物は、Ｈ２４１８：ＧＤＦ－６（配列番号１６）由来の残基１～７および２５～３５ならびにＯＰ－１（配列番号３９）由来の残基８～２４である。全ての他の構築物は、ＯＰ－１に対する配列（配列番号３９）において、ボールドにした残基により示されるように１つ以上の個々のアミノ酸変化と一致し、これは、表における１つ以上の位置、１、４、６、７、２５、２６、３０、３１、３５および配列番号３９の残基

３９７、４００、４０２、４０３、４２１、４２２、４２６および４３１に対応する。

【０１５８】

【表２】



【０１５９】

本願明細書において列挙される各々の変異体について、本願明細書において記載されているパラメータのうちの少なくとも１つを用いて再折りたたみを測定した（例えば、実施例４を参照のこと）。記載される全ての値は、再折りたたみの際に、さらなる精製なしに、少なくともおよそ２５％のダイマーを生じる公知の良好な再折りたたみ物（ｒｅｆｏｌｄｅｒ）（例えば、ＣＤＭＰ－２またはＢＭ

Ｐ－２）に対して測定された。値は、表３（以下）および図４において次のように示される：（＋＋＋）＝＞２５％；（＋＋）＝５－２５％；（＋）＝１～５％；（＋／－）＝＜１％、ここで、ネイティブなＣＤＭＰ－２およびＢＭＰ－２は、各々＋＋＋の再折りたたみ値を有する。骨肉腫細胞に基づくアッセイにおいて活性を測定した。そして、これはまた、骨誘導活性の尺度である。すなわち、このアッセイにおいて、ＯＰ－１およびＢＭＰ－２はこの細胞に基づくアッセイのアルカリホスファターゼ活性を誘導し得るが、ＣＤＭＰ－２およびＣＤＭＰ－１は誘導しない。しかし、４つの全てのタンパクは、ラット皮下のアッセイ（実施例８）の軟骨内性骨形成を生じる形態形成事象の全カスケードを誘導する能力がある。実施例５の細胞に基づくアッセイにおいて、測定した活性は、４０５ｎｍの光学密度により決定した、アルカリホスファターゼ活性である。示したｈＯＰ－１値は、哺乳動物の細胞が生成したタンパクからである。「Ｎ／Ａ」は、「試験していない」を意味する。図の値は、以下の通りである：（＋＋＋）＝≧１．２；（＋＋）０．８～１．２；（＋）＝０．４～０．８；（＋／－）＝＜０．４、ここで、ネイティブなｈＯＰ－１は、＋＋＋の生物学的活性値を有する。

【０１６０】

【表３】

変異体	フォールディング	ROS	コメント
WtOP1	+/-	N/A	OP-1は、貧弱なリフォルダーである
BMP-2	+++	+++	天然
CDMP-2	+++	+/-	良好
GDF-5	+++	+/-	リフォルダー
H2177	+	N/A	13のGDF-5由来残基を有するOP-1はリフォールディングする
H2406	+/-	N/A	11のOP-1誘導残基を有するCDMP-2は、失敗
H2421	+/-	N/A	6つのOP-1残基を有するGDF-5は、失敗
H2247	+	+++	HのＣ末端置換を用いた改善されたフォールディング
H2464	+	N/A	
H2467	+	N/A	
H2234	+1/2	N/A	さらなるE,D置換でのより良好なリフォールディング
H2233	++	+++	
H2457	++1/2	+++	
H2443	+++		上流のＮもまたＳまたはＴにより置換した場合に最良なリフォールディング
H2418	+++	++	
H2447	+++	++	
H2456	+++	++1/2	
H2460	+++	++1/2	
H2475	++	+++	BMP-5における同じ置換もまたリフォールディングを改善する

【０１６１】
図４Ａおよび４Ｂに示されるように、ＯＰ－１のＣ末端残基を置換することは、タンパク質の再折りたたみを増大させる。良好なリフォルダーに由来するヒールまたはフィンガー１サブドメインを置換するが、ＯＰ－１フィンガー２を維持するキメラ変異体は、実質的にタンパク質の再折りたたみ特性を改善しない（例えば、Ｈ２３６０、Ｈ２３６２、Ｈ２３３１、Ｈ２３８３を参照のこと）。しかし、良好なリフォルダーに由来するフィンガー２サブドメインを置換することは、再折りたたみを改善する。変異体モルフォゲン（例えば、Ｈ２４１０、Ｈ２３８９およびＨ２４７１）は、モルフォゲンのドメインが組み換わって、新たなまたは変化した特性または活性を有するモルフォゲンの改変体形態を生じ得る方法の特に鮮明な例である。例えば、フィンガー２の塩基のみを良好なリフォルダー（例えば、ＣＤＭＰ－２）の塩基と置換し、そしてＯＰ－１の先端領域（１０位～２０位）を維持することは、再折りたたみを改善することに加えて、細胞ベースのアッセイにおいてＯＰ－１の結合特異性（Ｈ２４１８）を維持する。

【０１６２】
さらなる改変は、個々のコドンを変異させて、個々のアミノ酸を変化させることにより得られた。フィンガー２塩基領域における変化を、１、２または３つの酸性残基置換まで最小化することは、再折りたたみを改善し、かつＯＰ－１結合特異性を維持することにおいて全て等しく良好であった（例えば、図４ＢのＨ２４４７およびＨ２４４３、ならびに表２および３のＨ２４５６）。最終的に、ヒドロキシル基保有残基で正に荷電するか、またはアミド保有残基を置換することはまた、再折りたたみを改善した（Ｈ２４５６）。また、ＯＰ－１のＨ２４５６Ｇｌｎ４における４位でのＢＭＰ－２　Ｇｌｕでの置換は、再折りたたみを改善した。さらに、二重のシステインの前にある正電荷またはプロリンは、インビトロでのタンパク質の再折りたたみ特性に有意に寄与しないようである。なぜなら、二重「ＣＣ」の前にある配列「ＫＰ」を、「ＮＳ」に変更することは、有意な効果をほとんどまたは全く示さないからである。

【０１６３】
モルフォゲン改変のさらなる例は、表２に示される。ＯＰ－１と対照的に、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのいくつかのメンバー（例えば、ＢＭＰ－２、ＣＤＭＰ－２およびＧＤＦ－５）は良好なリフォルダーであり、そして標準的なタンパク質再折りたたみプロトコルにおいて再折りたたみする本来の能力を有する。ＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバーのタンパク質の骨形成サブグループの種々の変異体を構築して、どのアミノ酸残基が変化して、貧弱なリフォルダータンパク質の再折りたたみ能力を改善するかを決定した。例えば、ＯＰ－１は、１３のアミノ酸を含むようにそのフィンガー２サブドメインにおいて改変された。これは、ＧＤＦ－５における対応する位置で見出される。ＯＰ－１の得られた変異改変体タンパク質は、野生型ＯＰ－１タンパク質より改善した再折りたたみ能力を示した（表２および３のＨ２１７７を参照のこと）。同様に、野生型ＢＭＰ－５　の再折りたたみ能力は、フィンガー２サブドメインの特定のアミノ酸残基がグルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、およびアラニンで置換された変異改変体において改善した（表２および３のＨ２４７５を参照のこと）。対照的に、再折りたたみ能力は、ＣＤＭＰ－２が、ＯＰ－１フィンガー２サブドメイン由来の１１のアミノ酸を含むように改変された場合（表２および３のＨ２４０６を参照のこと）、またはＧＤＦ－５がＯＰ－１フィンガー２サブドメイン由来の６つのアミノ酸を含むように改変された場合（表２および３のＨ２４２１を参照のこと）に減少した。表２のＣＤＭＰ－２変異体Ｈ２４０６およびＧＤＦ－５変異体Ｈ２４２１における変化は、基本的に、ＯＰ－１のフィンガー２サブドメインの領域を再び作製した（表２のＨ２４０６およびＨ２４２１のフィンガー２アミノ酸配列の領域を参照のこと）。

【０１６４】
野生型タンパク質およびその変異改変体の観察に基づくと、より選択的なアミノ酸残基の置換は、ＯＰ－１のフィンガー２サブドメインにおいて行われ、そして再折りたたみに対するそれらの効果を評価した。ＯＰ－１骨形成タンパク質のこのような選択的フィンガー２サブドメイン変異誘発は、表３のデータにより実証される。表２は、種々の骨形成タンパク質およびその変異改変体のアミノ酸配列フィンガー２サブドメインを示す。表２において、下線を付した全てのアミノ酸残基は、野生型ＯＰ－１における対応する残基とは異なる。表２において下線を付さない残基は、野生型ＯＰ－１において見出されるネイティブなアミノ酸残基に対応する。ＯＰ－１のＣ末端ヒスチジンをアルギニン（ＣＤＭＰ－２、ＧＤＦ－５、およびＢＭＰ－２のような天然の良好なリフォルダー骨形成タンパク質において見出されるＲ）での置換は、再折りたたみ能力を増強した（表２および３における変異構築物Ｈ２２４７、Ｈ２４６４およびＨ２４６７を参照のこと）。ＯＰ－１のＣ末端のフィンガー２サブドメイン領域における負に荷電した残基を、例えば、良好なリフォルダー骨形成タンパク質において見出されるようなグルタミン酸（Ｅ）またはアスパラギン酸（Ｄ）で置換することによって増加させることは、再折りたたみ能力を増強した（例えば、表２および３のＨ２２３４、Ｈ２２３３、およびＨ２４５７を参照のこと）。最も良好なリフォルダーは、Ｃ末端フィンガー２サブドメインにおいてより大きな負電荷そしてまた、荷電残基の比較的高い総量を有する。再折りたたみ能力におけるさらなる改善はまた、ＯＰ－１のフィンガー２サブドメインにおけるヒドロキシル基保有極性残基の数を増加させることにより達成された。例えば、上記の置換に加えて、ヒドロキシル基保有極性アミノ酸残基のセリン（Ｓ）またはスレオニン（Ｔ）で、フィンガー２サブドメインにおける最も上流のアスパラギン（Ｎ）を置換することは、再折りたたみを増強した（表２および３のＨ２４４３、Ｈ２４１８、Ｈ２４４７、Ｈ２４５６、およびＨ２４６０を参照のこと）。

【０１６５】
良好なＲＯＳ活性を有する変異体（例えば、Ｈ２２４７、Ｈ２２３３、Ｈ２４５７、およびＨ２４７５）は、本来のペプチドＬｅｕ－Ａｓｎ－Ａｌａ（残基５、６、７）を含む。いくらか良好に折り畳む他のＯＰ－１変異体は、ＢＭＰ－２、Ｈ２４５６およびＨ２４６０において見出される改変ペプチドＬｅｕ－Ｓｅｒ－Ａｌａを含むが、これらのタンパク質は、ＲＯＳアッセイにおいていくらかあまり活性でない。表３を参照のこと。従って、Ｌｅｕ－Ａｓｎ－Ａｌａペプチドにおけるアスパラギンは、ＲＯＳアッセイにおいてポジティブに寄与する。

【０１６６】
ＯＰ－１関連ＢＭＰのさらなる代表として、ＢＭＰ－５変異体Ｈ２４７５（これは、７システインドメインにおいて８８％同一性を有するＯＰ－１に対する配列に非常に類似している）を発現した。その非改変形態においてＢＭＰ－５（ＯＰ－１に等しい）は、再折りたたみしなかった。同じ変化がフィンガー２に導入され、ＯＰ－１のリフォールディングを可能にし、有用な再折りたたみ収率を得た。図３Ｂは、ＢＭＰ－５ヌクレオチド配列およびその再折りたたみについての改変を示す。ＢＭＰ－５の場合、Ｃ末端での最初の変更（ヒスチジンからアルギニン）は、再折りたたみには十分でなかった。従って、３つの酸性残基が近くに導入され、このことは、ＯＰ－１の再折りたたみに有益であったことを示した。これを、ＯＰ－１由来のＣ末端配列を有するＢＭＰ－５（これはまた、さらなるセリンからアラニンへの変換を導入した）をスプライシングすることにより実施した。この構築物をＲＯＳアッセイにおいて試験した。この構築物は、首尾良いＯＰ－１改変体（例えば、Ｈ２４７１（ＣＤＭＰ－２フィンガー２を有する変異体ＯＰ－１）と等価またはそれより良好な活性を有した。コントロールとして試験したＣＤＭＰ－２は、いかなる活性も示さなかった。

【０１６７】
これらの改変タンパク質変異体は、それらの未改変の対応物よりも可溶性である。例えば、変異体Ｈ２２２３（これは、プロドメインを伴わない変異体Ｈ２２３３（表２を参照のこと）であり、そしてＣＨＯ細胞において樹立された）は、成熟野生型ＯＰ－１と比較して、可溶性において驚くべき増加を示した。Ｈ２２２３は、４つのアミノ酸置換（２５Ｒ＞Ｅ　２６Ｎ＞Ｄ　３０Ｒ＞Ｅ　３５Ｈ＞Ｒ、二重システインから最初の残基を計数する）を伴うＯＰ－１変異体である。変異体および野生型モルフォゲンを凍結乾燥し、そして引き続いてｐＨ７．４またはｐＨ７．０のＰＢＳ中に可溶化した。室温での４０時間の後、サンプルをスピンダウンして任意の不溶化タンパク質を収集し、そして生じた上清をＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析に供した。凍結乾燥したＨ２２２３変異体のかなりの部分がＰＢＳ緩衝液中で可溶化されたが、野生型ＯＰ－１は、中性ｐＨにおいて事実上不溶性であった。変異体ＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質を作製するために荷電残基を導入することは、これらのタンパク質の可溶性を改善するように思われる。この可溶性の増加は、野生型ＯＰ－１と比較したＲＯＳアッセイにおける活性の増加を説明し得ることがさらに予期され得る。

【０１６８】
荷電残基がそれらの極性において逆転した場合、たとえＲＯＳアッセイにおいてその活性が変化し得なかったとしても、タンパク質の等電点に影響した。変異体Ｈ２４５６、Ｈ２４５７、およびＨ２４６０を、リフォールディングし、精製し、そして等電点電気泳動ゲルで分析した。これらの変異体は、わずか１つまたは２つの荷電アミノ酸（ヒールとフィンガー２が整合する場合、システイン４およびシステイン５の付近に位置付けられる）で異なる。Ｈ２４５６よりもあまり酸性でない１つの残基を有するＨ２４６０は、Ｈ２４５６よりも塩基性の範囲に焦点を合わせられる。同様に、Ｈ２４５６よりもあまり塩基性でない１つの残基を有するＨ２４５７は、Ｈ２４５６よりも酸性の範囲に焦点を合わせられる。アルギニンに代わるグルタミン酸の導入およびアスパラギンに代わるアスパラギン酸の導入は、酸性ｐＨへの等電点のシフトを生じた。これは、細菌性産生タンパク質におけるグリコシル化の欠如に対する代償として所望され得る可溶性の改善または改変を生じ得る。

【０１６９】
このような荷電の改変はまた、ヘテロダイマーの精製において有益であり得る。ヘテロダイマーにおける２つのサブユニットが、それらの正味の荷電に起因して、異なる結合親和性を有する場合、混合リフォールディング実験から生じる３つの種（すなわち、各サブユニットのホモダイマー、およびヘテロダイマー）を、カラムにおいてお互いから容易に分離し得る。

【０１７０】
本発明の実施は、以下の実施例から、なおより充分に理解される。実施例は、本明細書において例示のためにのみ示され、そしていかなる方法でも本発明を制限するとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【０１７１】
（ＩＩＩ．実施例）
（実施例１．本発明の例示的変異タンパク質の合成：ＢＭＰ変異体）
図３Ａは、ＯＰ－１のＣ末端の７つのシステインドメインのためのヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。これらの配列を知ることにより、例えば、カセット変異誘発またはＫｕｎｋｅｌの周知の方法（ｍｌ３から派生した一本鎖の鋳型を使用するプライマー伸長による変異誘発）によって、または周知のＰＣＲ方法（重複伸長を含む）によって変異操作のための有用な制限部位の同定が可能になる。ＯＰ－１の例示的な変異体は、以下に記載のように構築される

、フィンガー－２サブドメインにおいて４つのアミノ酸変化および最後のＣ末端アミノ酸において１つのアミノ酸変化を有する、Ｈ２４６０である。記載されている変異誘発プロトコルが例示のみであること、および本発明の構築物を作製するための他の手段は周知であり、そして当該技術分野において十分に記載されていることが当業者によって理解される。

【０１７２】

４つのアミノ酸変化が、重複伸長技術を用いる標準的ポリメラーゼ連鎖反応によって、ＯＰ－１フィンガー２のサブドメイン配列に導入され、ＯＰ－１変異体Ｈ２４６０を生じた。フィンガー２の領域の４つの変化は、Ｎ６＞Ｓ、Ｒ２５＞Ｅ、Ｎ２６＞ＤおよびＲ３０＞Ｅであった。この変異体はまた、Ｃ末端残基のさらなる変化（Ｈ３５＞Ｒ）を含んだ。これらの反応のための鋳型は、野生型ＯＰ－１のｃＤＮＡクローンの成熟したドメインであった。それは成熟領域の初めのＡＴＧ開始コドンと共に、操作されるＥ．ｃｏｌｉ発現ベクターに挿入された。ＡＴＧは、順方向プライマーとして以下の配列の合成オリゴヌクレオチドを用いるＰＣＲによって導入された：ＡＴＧ　ＴＣＣ　ＡＣＧ　ＧＧＧ　ＡＧＣ　ＡＡＡ　ＣＡＧ（配列番号３６）、これは、Ｍ　Ｓ　Ｔ　Ｇ　Ｓ　Ｋ　Ｑ（配列番号３７）をコードする。ＰＣＲ反応を、ｃＤＮＡの３’コード領域に相補的な適当なバック－プライマーと組み合わせて行った。

【０１７３】

フィンガー２変異体Ｈ２４６０を構築するために、標準のＰＣＲ反応において、市販のＰＣＲキットを用いて、そしてプライマーとして合成オリゴヌクレオチドを用いる製造業者の指示に従って、改変フィンガー２をコードするＰＣＲフラグメントを作製した。

【０１７４】

Ｎ６＞Ｓ変化を得るために、配列ＧＣＧ　ＣＣＣ　ＡＣＧ　ＣＡＧ　ＣＴＣ　ＡＧＣ　ＧＣＴ　ＡＴＣ　ＴＣＣ　ＧＴＣ　ＣＴＣ（配列番号７０）の順方向プライマー（プライマー＃１）を用いた。この配列は、アミノ酸配列Ａ　Ｐ　Ｔ　Ｑ　Ｌ　Ｓ　Ａ　Ｉ　Ｓ　Ｖ　Ｌ（配列番号７１）をコードする。

【０１７５】

Ｃ末端付近の変化については、バックプライマー（４３ヌクレオチド長）（プライマー＃２）を用いた。これは、Ｒ２５＞ＥおよびＮ２６＞ＤおよびＲ３０＞ＥおよびＣ－末端Ｈ３５＞Ｒの変化を導入した。このプライマー＃２は、以下の配列を有した：ＣＴＡ　ＴＣＴ　ＧＣＡ　ＧＣＣ　ＡＣＡ　ＡＧＣ　ＴＴＣ　ＧＡＣ　ＣＡＣ　ＣＡＴ　ＧＴＣ　ＴＴＣ　ＧＴＡ　ＴＴＴ　Ｃ（配列番号７２）。これは以下のコード配列の相補体である：Ｇ　ＡＡＡ　ＴＡＣ　ＧＡＡ　ＧＡＣ　ＡＴＧ　ＧＴＧ　ＧＴＣ　ＧＡＡ　ＧＣＴ　ＴＧＴ　ＧＧＣ　ＴＧＣ　ＡＧＡ　ＴＡＧ（配列番号７３）。この配列は、以下のアミノ酸をコードする：Ｋ　Ｙ　Ｅ　Ｄ　Ｍ　Ｖ　Ｖ　Ｅ　Ａ　Ｃ　Ｇ　Ｃ　Ｒ停止（配列番号７４）。

【０１７６】

次いで、フィンガー２およびＣ末端変異を有するフラグメントを、Ｎ末端、フィンガー－１およびヒールサブドメインを有する成熟ＯＰ－１の上流部分をコードする別のＰＣＲフラグメントと組み合わせた。Ｎ末端、フィンガー１およびヒールサブドメインをコードする後者のＰＣＲフラグメントを、鋳型としてＥ．ｃｏｌｉについてのＯＰ－１発現ベクターを用いて再度構築した。このベクターは、Ｔ７プロモーターに付着した成熟ＯＰ－１タンパク質をコードするＯＰ－１ｃＤＮＡフラグメント、および適切な宿主におけるＴ７プロモーターか、またはｔｒｐプロモーターの制御下のいずれかの制御下での発現のためのリボソーム結合部位を含んだ。このＴ７発現ベクターにおいて、成熟したＯＰ－１のＸｂａＩ部位のＴ７プロモーターとＡＴＧコドンとの間の配列である、Ｐｅｔ　３ｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ　Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ））は、以下の通りである：

ＴＣＴＡＧＡＡＴＡＡＴＴＴＴＧＴＴＴＡＡＣＣＴＴＴＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＧ　ＡＴＧ（配列番号７５）。

【０１７７】

この第２のＰＣＲ反応を、順方向プライマー（プライマー＃３）ＴＡＡ　ＴＡＣ　ＧＡＣ　ＴＣＡ　ＣＴＡ　ＴＡＧ　Ｇ（配列番号７６）によってプライムした。これは、Ｔ７プロモーター領域およびプライマー＃１と重複するバック－プライマー（プライマー＃４）においてプライムし、そしてヌクレオチド配列ＧＣＴ　ＧＡＧ　ＣＴＧ　ＣＧＴ　ＧＧＧ　ＣＧＣ（配列番号７７）を有する。この配列は、コード配列ＧＣＧ　ＣＣＣ　ＡＣＧ　ＣＡＧ　ＣＴＣ　ＡＧＣ（配列番号７８）の相補体である。そしてこれは、Ａ　Ｐ　Ｔ　Ｑ　Ｌ　Ｓ（配列番号７９）をコードする。

【０１７８】

第３のＰＣＲ反応（実際の重複伸長反応）において、上記の２つのＰＣＲフラグメントの部分を組み合わせ、そしてＰＣＲによって増幅した。そして、完全な成熟ＯＰ－１領域を含む単一のフラグメントを生じた。この反応のために、プライマー＃３を順方向プライマーとして用い、そして新規なプライマー（プライマー＃５）を以下の配列ＧＧ　ＡＴＣ　ＣＴＡ　ＴＣＴ　ＧＣＡ　ＧＣＣ　ＡＣＡ　ＡＧＣ（配列番号８０）を有するバック－プライマーとして用いた。この配列は、コード配列ＧＣＴ　ＴＧＴ　ＧＧＣ　ＴＧＣ　ＡＧＡ　ＴＡＧＧＡＴ　ＣＣ（配列番号８１）に対する相補体である。この配列は、Ａ　Ｃ　Ｇ　Ｃ　Ｒ停止（配列番号８２）をコードする。このプライマーはまた、遺伝子を発現ベクターに挿入するために都合の良い３’ＢａｍＨＩ部位を付加する。

【０１７９】

重複伸長ＰＣＲから生じる、完全な変異遺伝子を保有する得られたフラグメントを、ＰＣＲフラグメントのクローン化のために設計された市販のクローニングベクター（例えば、ｐＣＲ２．１－ｔｏｐｏ－ＴＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｉｎｃ．（Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ））にクローン化した。クローン化したＰＣＲフラグメントを、ＸｂａＩおよびＢａｍＨＩを用いる制限消化によって回収し、Ｐｅｔ３ｄ（Ｎｏｖａｇｅｎ　Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ））のような市販のＴ７発現ベクターのＸｂａＩおよびＢａｍＨＩ部位に挿入する。

【０１８０】

（実施例２．本発明の例示的変異タンパク質のＥ．ｃｏｌｉ発現：ＢＭＰ変異体の発現）

形質転換した細胞を、標準的培養条件下で、標準的ＳＰＹＥ　２ＹＴ培地、１：１比、（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、を参照のこと）中で、３７℃で増殖させた。異種タンパク質の過剰発現は、代表的には、８～４８の時間内に封入体を生じた。封入体を、単離して、次のように可溶化した。１リットルの培養液を、細胞を集めるために遠心分離した。次いで、得られたペレット中の細胞を６０ｍｌの２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ　８．０（ＴＥ緩衝液）＋１００μｇ／ｍｌのリゾチーム中に再懸濁し、そして、３７℃で２時間インキュベートした。次いで、細胞懸濁液を、氷冷して、超音波処理して細胞を溶解させた。細胞溶解を、検鏡によって確認した。溶解物の体積を、ＴＥ緩衝液で約３００ｍｌに調整した。次いで、封入体ペレットを得るために遠心分離した。このペレットを、ＴＥ緩衝液中の２～４回の連続的再懸濁および遠心分離によって洗浄した。洗浄した封入体ペレットを、４０ｍｌの１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、６ＭのＧｕＨＣｌ（グアニジウム塩酸塩）、２５０ｍＭのＤＴＴ、ｐＨ　８．８中での変性および還元により可溶化した。次いで、タンパク質を、標準的な、市販のＣ２またはＣ８カートリッジ（ＳＰＩＣＥカートリッジ、４００ｍｇ、Ａｎａｌｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）を用いて予め精製した。タンパク質溶液を２％　ＴＦＡ（トリフルオロ酢酸）で酸化し、カートリッジに適用し、０．１

％　ＴＦＡ／１０％アセトニトリルで洗浄し、そして０．１％ＴＦＡ／７０％アセトニトリルで溶出した。次いで、溶出した物質を、乾燥するかまたは希釈して、Ｃ４　ＲＰ－ＨＰＬＣによって分画した。

【０１８１】

（実施例３．本発明の例示的変異タンパク質のリフォールディング：変異体ＢＭＰダイマー）

上記の通りに調製したタンパク質を、リフォールディング前に乾燥するかまたはリフォールディング緩衝液に直接希釈した。用いた好適なリフォールディング緩衝液は、以下であった：１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、１Ｍ　ＮａＣｌ、２％　ＣＨＡＰＳ、５ｍＭ　ＧＳＨ（還元グルタチオン）、２．５ｍＭ　ＧＳＳＧ（酸化グルタチオン）、ｐＨ　８．５。リフォールディング（１２．５～２００μｇタンパク質／ｍｌ）を、２４～９０時間、代表的には３６～４８時間実行し（ただし、いくつかの変異体では、これより長い（数週間まで）と、良好なリフォールディングが提供されると予期される）、続いて、０．１％　ＴＦＡに対して透析し、次いで０．０１％　ＴＦＡ，５０％エタノールに対して透析した。次いで、透析した物質のアリコートを種々のアッセイに備えて乾燥した。

【０１８２】

（実施例４．本発明のリフォールディングされた例示的変異ダイマーの精製および試験：変異体ＢＭＰダイマー

（４Ａ．ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＲＰ　ＨＰＬＣ）

サンプルを乾燥して、Ｌａｅｍｍｌｉゲルサンプル緩衝液に再懸濁して、次いで、１５％のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルにおいて電気泳動した。全てのアッセイは、比較のための、分子量標準および／または哺乳動物細胞が産生した精製ＯＰ－１を含んだ。ＯＰ－１ダイマーの解析を、添加した還元剤の非存在下で実行した。一方で、ＯＰ－１モノマーをゲルサンプルへの１００ｍＭのＤＴＴの添加によって生成した。フォールディングしたダイマーは約３０～３６ｋＤａの範囲のみかけの分子量を有する。一方で、モノマー種は、約１４～１６ｋＤａの見かけの分子量を有する。

【０１８３】

あるいは、サンプルを、以下のように、市販のＲＰ－ＨＰＬＣにてクロマトグラフィーにかけた。サンプルを乾燥させ、そして０．１％のＴＦＡ／３０％のアセトニトリルの中に再懸濁した。次いで、タンパク質を、０．１％のＴＦＡ、３０％のアセトニトリル中のＣ１８カラムに適用し、そして、０．１％のＴＦＡ中の３０～６０％アセトニトリル勾配を用いて分画した。適切にフォールディングしたダイマーは、分離したピークとして４５～５０％アセトニトリルで溶出する；モノマーは、５０～６０％アセトニトリルで溶出する。

【０１８４】

（４Ｂ．ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー）

サンプルを１０ｍＭリン酸塩、６Ｍ　尿素、ｐＨ　７．０（カラム緩衝液）のヒドロキシアパタイトカラムにロードした。未結合の物質を、カラム緩衝液を用いる洗浄により除去し、次いでカラム緩衝液＋１００ｍＭ　ＮａＣｌでモノマーを溶出させた。ダイマーを、カラム緩衝液＋２５０ｍＭ　ＮａＣｌを用いて溶出した。

【０１８５】

（４Ｃ．トリプシン消化）

トリプシン消化は、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４Ｍ　尿素、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．３％　Ｔｗｅｅｎ　８０、２０ｍＭ　メチルアミン、ｐＨ　８．０の消化緩衝液において実行した。酵素対基質の比は、１：５０（重量比）であった。３７℃での１６時間のインキュベーションの後、１５μｌの消化混合液を、ＤＴＴ

を含まない５μｌの４×ゲルサンプル緩衝液と組み合わせ、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。精製した哺乳動物ＯＰ－１および未消化のＢＭＰダイマーを、比較のために含んだ。これらの条件の下で、適切にフォールディングされたダイマーを切断して、未切断の標準より僅かに速い移動を有する種を生産する。一方で、モノマー、および誤ってフォールディングしたダイマーは完全に消化され、そして染色したゲルにおいてバンドとして現われない。

【０１８６】

（実施例５．本発明の変異タンパク質の変化した特性の試験：骨原性活性についてのインビトロにおける細胞に基づくバイオアッセイ）

本実施例は、本発明の特定の骨原性変異タンパク質の生物活性を実証する。高い特異的な骨形成活性を有するネイティブの骨原性タンパク質は、ラット骨肉腫細胞およびラット頭蓋冠（ｃａｌｖｅｒｉａ）細胞を含むラット骨芽細胞においてアルカリホスファターゼ活性を誘導し得る。このアッセイにおいて、ラット骨肉腫または頭蓋冠細胞を、マルチウェルプレート（例えば、４８ウェルプレート）の上へ、１０％のＦＢＳ（ウシ胎仔血清）、Ｌ－グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含有するαＭＥＭ（改変イーグル培地、Ｇｉｂｃｏ　Ｉｎｃ．、Ｌｏｎｇ　Ｉｓｌａｎｄ）中で、１ウェルあたり５０，０００の骨芽細胞の濃度でプレートした。細胞を、３７℃で２４時間インキュベートした。この時点で、増殖培地を１％ＦＢＳ含有αＭＥＭで置換し、そしてこの細胞が実験の時点で血清枯渇増殖培地中にあるように、細胞をさらに２４時間インキュベートした。次いで、培養した細胞を以下の３つの群に分けた：（１）生合成骨原性タンパク質の種々の濃度を有するウェル；（２）哺乳動物が発現したｈＯＰ－１のような陽性コントロール；および陰性コントロール（タンパク質またはＴＧＦ－βなし）。試験したタンパク質濃度は、５０～５００ｎｇ／ｍｌの範囲であった。細胞を、７２時間インキュベートした。インキュベーション期間後、細胞層を、０．５ｍｌの１％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００を用いて抽出した。得られた細胞抽出物を遠心分離し、１００μｌの抽出物を９０μｌのＰＮＰＰ（パラニトロソフェニルホスフェート）／グリセリン混合液に添加して、３７℃の水浴中で３０分間インキュベートし、１００μｌの０．２Ｎ　ＮａＯＨで反応を停止した。次いで、サンプルをプレートリーダー（例えば、Ｄｙｎａｔｅｃｈ　ＭＲ７００）を通過させ、そして、標準としてｐ－ニトロフェノールを用いて４００ｎｍで吸光度を測定し、アルカリホスファターゼ活性の存在および量を決定した。タンパク濃度は、標準手段、例えば、Ｂｉｏｒａｄ方法、ＵＶスキャンまたは２１４ｎｍでのＲＰ　ＨＰＬＣ領域によって決定した。アルカリホスファターゼ活性を、タンパク質１μｇあたりのユニット（単位）で算出した。ここで、１ユニットは、３７℃で３０分あたりに１ｎｍｏｌの遊離したｐ－ニトロフェノールに等しい。

【０１８７】

ネイティブのｈＯＰ－１およびＢＭＰ２は、１００～２００ｎｇ／ｍｌで約１．０～１．４ユニットを生じる。

【０１８８】

（実施例６．本発明の変異タンパク質の変化した特性の試験：ＣＤＭＰ活性のインビトロにおける細胞に基づくバイオアッセイ）

本実施例は、本発明の特定の骨原性変異体の生物活性を示す。ネイティブなＣＤＭＰは、実施例５において用いたようなラット骨肉種細胞において、アルカリホスファターゼ活性を誘導し得ないが、それらは、マウス奇形癌細胞株ＡＴＤＣ－５（軟骨前駆細胞（ｃｈｏｎｄｒｏｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ）細胞株（Ａｔｓｕｍｉら、１９９０、Ｃｅｌｌ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　３０：１０９））においてアルカリホスファターゼ活性を誘導する。ラット骨癌腫細胞アッセイにおいて陰性であるが、ＡＴＤＣ－５アッ

セイにおいて陽性であるリフォールディングされた変異体構築物は、獲得したＣＤＭＰ様活性を有することが記載されている。ＡＴＤＣ－５アッセイにおいて、細胞を無血清基本培地（ＢＭ：Ｈａｍ’ｓ　Ｆ－１２／ＤＭＥＭ［１：１］以下を含む：ＩＴＳ™＋培養補充物［Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ］、α－ケトグルタレート（１×１０$^{-4}$Ｍ）、セルロプラスミン（０．２５　Ｕ／ｍｌ）、コレステロール（５μｇ／ｍｌ）、ホスファチジルエタノールアミン（２μｇ／ｍｌ）、α－トコフェロール酸スクシナート（ｔｏｃｏｐｈｅｒｏｌ　ａｃｉｄ　ｓｕｃｃｉｎａｔｅ）（９×１０$^{-7}$Ｍ）、還元グルタチオン（１０μｇ／ｍｌ）、タウリン（１．２５μｇ／ｍｌ）、トリヨードサイロニン（１．６×１０$^{-9}$Ｍ）、ヒドロコルチゾン（１×１０$^{-9}$Ｍ）、副甲状腺ホルモン（５×１０$^{-10}$Ｍ）、β－グリセロリン酸（１０ｍＭ）およびＬ－アスコルビン酸２－スルフェート（５０μｇ／ｍｌ））中、４×１０^{4}の密度でプレートした。ＣＤＭＰまたは変異タンパク質（０～３００ｎｇ／ｍｌ）をその翌日、添加し、そして、ＣＤＭＰまたは変異タンパク質を含む培養培地を１日おきに交換した。アルカリホスファターゼ活性を、処理の４、６および／または１２日後に超音波処理した細胞ホモジネート中で決定した。ＰＢＳを用いた大規模な洗浄の後、細胞層を０．０５％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００を含有する５００μｌのＰＢＳ中で超音波処理した。５０～１００μｌのアリコートを、アッセイ緩衝液（０．１Ｍ　バルビタールナトリウム緩衝液（ｐＨ　９．３））中で、そして基質としてｐ－ニトロフェニルホスフェートを用いて、酵素活性についてアッセイした。吸光度を、４００ｎｍで測定し、そして活性をＢｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイ（ウシ血清アルブミン標準）で測定されるタンパク含有量に対して正規化した。

【０１８９】

ネイティブなＣＤＭＰ－１およびＣＤＭＰ－２は、１００ｎｇ／ｍｌで１０日目に約２～３ユニットの活性を生成した。ネイティブなＯＰ－１標準は、１００ｎｇ／ｍｌで１０日目に約６～７ユニットの活性を生成した。

【０１９０】

（実施例７．本発明の変異タンパク質の変化した特性の試験：ＴＧＦ－β様活性のインビトロにおける細胞に基づくバイオアッセイ）

本実施例は、本発明の特定のＴＧＦ－βに基づく変異タンパク質の生物活性を実証する。ネイティブのＴＧＦ－βタンパク質は、上皮細胞増殖を阻害し得る。多数の細胞阻害アッセイが、当該分野において十分に記載されている。例えば、Ｂｒｏｗｎら（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：２９７７（ヒト黒色腫Ａ３７５線維芽細胞を用いる比色アッセイを記載しており、そして、本願明細書において以下に記載される）を参照のこと。別のアッセイは上皮細胞、例えば、ミンク肺上皮細胞を使用し、そして増殖の効果は^{3}Ｈ－チミジン取込みによって決定される。

【０１９１】

簡潔には、アッセイにおいて、ＴＧＦ－β生合成変異体を、ＲＰＭＩ－１６４０の培地（Ｇｉｂｃｏ）および５％のウシ胎仔血清を含むマルチウェル組織プレートにおいて階段希釈する。コントロールウェルには、培地のみを入れる。次いで、黒色腫細胞を、ウェルに添加する（１．５×１０^{4}）。次いで、プレートを５％のCO_2中で約７２時間３７℃でインキュベートする。そして、細胞単層を一度洗って、固定して、そして１５分間クリスタルバイオレットで染色する。未結合の染料を洗い流し、次いで染色した細胞を３３％の酢酸で溶解し、染料（細胞核に閉じ込められた）を遊離させ、そして試験分子の活性を算出するために標準的な市販の光度計を用いて５９０ｎｍでＯＤを測定する。それぞれのウェルにおける染色の強度は、核の数に直接関連する。従って、活性なＴＧＦ－β分子は、ウェルを不活性化合物または陰性コントロールウェルより薄く染色すると予期

される。

【０１９２】

別のアッセイにおいては、ミンク肺細胞を用いる。これらの細胞は、標準的培養条件下で成長および増殖するが、ミンク肺上皮細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ６４、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）由来の培養細胞を用いる^{3}Ｈ－チミジン取込みによって決定されるようにＴＧＦ－βに曝露された後、停止される。簡潔には、細胞を、１０％のＦＢＳ、２００ユニット／ｍｌペニシリンおよび２００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補充したＥＭＥＭを用いて、コンフルエンスまで増殖させる。これらの細胞を、１ウェルあたり約２００，０００細胞の細胞密度まで培養する。コンフルエンスの時点で、培地を１％のＦＢＳおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含有する０．５ｍｌのＥＭＥＭで置換し、そしてこの培養物を３７℃で２４時間インキュベートする。次いで、候補タンパク質を各ウェルに添加し、そして細胞を３７℃で１８時間インキュベートする。インキュベーションの後、１０μｌ中に１．０μＣｉの^{3}Ｈ－チミジンを、各々のウェルに添加し、そして細胞を３７℃で４時間インキュベートした。次いで、培地を各ウェルから取り除き、そして細胞を、氷冷リン酸緩衝化生理食塩水を用いて１回洗浄し、そして、各ウェルに０．５ｍｌの１０％　ＴＣＡを添加することによってＤＮＡを沈殿して、１５分間室温でインキュベートした。この細胞を、氷冷蒸留水で３回洗浄し、０．５ｍｌの０．４Ｍ　ＮａＯＨで溶解し、次いで、各ウェルからの溶解物をシンチレーションバイアルに移し、そしてシンチレーションカウンター（Ｓｍｉｔｈ－Ｋｌｉｎｅ　Ｂｅｃｋｍａｎ）を用いて放射活性を記録する。生物学的に活性な分子は、細胞増殖を阻害し、不活性タンパク質および／または陰性コントロールウェル（増殖因子を添加してない）と比べて、より少ないチミジン取込みおよびより少ない計数を生じる。

【０１９３】

（実施例８．本発明の変異タンパク質の変化した特性の試験：骨原性活性（軟骨内の骨形成および関連特性）のインビボにおけるバイオアッセイ）

ＳａｍｐａｔｈおよびＲｅｄｄｉ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８３）８０：６５９１－６５９５）、および米国特許第４，９６８，５９０号、同第５，２６６，６８３号（これらの開示は本明細書において参考として援用される）によって記載される、骨誘導のための当該分野で認識されるバイオアッセイは、所定のデバイスまたは処方の効力を確立するために用いられ得る。簡潔には、このアッセイは、エーテル麻酔下で試験サンプルをレシピエントラットの皮下の部位に配置することからなる。垂直の切開（１ｃｍ）を、胸の領域にわたる皮膚に無菌条件下で作製し、そして、平滑（ｂｌｕｎｔ）切開によってポケットを準備する。特に、凍結乾燥のような標準的手順を用いて、所望の量の骨原性タンパク質（１０ｎｇ～１０μｇ）に、約２５ｍｇのマトリックス物質を添加し、そして、試験サンプルを、ポケットの内側深くに埋め込み、そして切開を金属の皮膚クリップで閉鎖する。異所性部位は、同所性部位の使用から生じる潜在的なあいまい性なしに骨誘導の研究を可能にする。このインプラントはまた、筋肉内に提供され得る。これはこのデバイスを接触可能な前駆細胞とより接近して設置する。代表的には、筋肉内インプラントを両方の脚の骨格筋に作製する。

【０１９４】

異所性部位で生じる連続的な細胞反応は、複雑である。軟骨内骨形成の多段階のカスケードは、以下を包含する：埋め込んだマトリックスに対するフィブリンおよびフィブロネクチンの結合、細胞の走化性、線維芽細胞の増殖、軟骨芽細胞への分化、軟骨形成、血管浸潤、骨形成、再構築および骨髄分化。

【０１９５】

首尾良いインプラントは、以下を含むタンパク誘導性軟骨内性骨発生の段階を

通じて制御された進行を示す：（１）１日目の多形核白血球による一過性浸潤；（２）２日目および３日目の間葉細胞遊走および増殖；（３）５日目および６日目の軟骨細胞出現；（４）７日目の軟骨基質形成；（５）８日目の軟骨石灰化；（６）９日目および１０日目の血管浸潤、骨芽細胞の出現および新しい骨の形成；（７）１２～１８日目の骨芽細胞および骨の再構築の出現；ならびに（８）２１日目の小骨における造血性骨髄分化。

【０１９６】

組織学的な断片化および染色は、インプラントにおける骨形成の程度を決定するために好ましい。トルイジンブルーまたはヘマトキシリン（ｈｅｍｏｔｏｘｙｌｉｎ）／エオシンを用いる染色は、軟骨内性骨の最終的な発達を明らかに実証する。１２日目のバイオアッセイは、骨誘導活性が試験サンプルと関連しているか否かを決定するために十分である。

【０１９７】

さらに、アルカリホスファターゼ活性および／または総カルシウム含量は、骨形成についての生化学的マーカーとして使用され得る。このアルカリホスファターゼ酵素活性は、切り出された試験物質の均質化の後に、分光測光的に決定され得る。この活性は、インビボで９～１０日目でピークとなり、そしてその後にゆっくりと減少する。組織学によって骨の発達を全く示さないサンプルは、これらのアッセイ条件下でアルカリホスファターゼ活性を全く示さないはずである。このアッセイは、定量のために、および試験サンプルがラットから取り出された後に非常に迅速に骨形成の概算を得るために有用である。アルカリホスファターゼ活性レベルおよび組織学的評価によって測定される結果は、「骨形成単位」として表され得る。１骨形成単位は、１２日目の最大の骨形成活性の半分に必要とされるタンパク質の量を表す。さらに、用量曲線は、種々の濃度のタンパク質をアッセイすることにより、精製スキームの各工程にて、インビボで骨誘導活性について作成され得る。従って、当業者は、慣用的な実験のみを使用して、代表的な用量曲線を作成し得る。

【０１９８】

総カルシウム含量は、例えば、冷たい０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、３ｍＭ、$NaHCO_3$、ｐＨ９．０中で均質化し、そして沈渣の酸可溶性画分のカルシウム含量を測定する後に決定され得る。

【０１９９】

（実施例９：変化した特性を有する、例示的な改変されたモルフォゲン変異体：ドメインスワッピング（Ｄｏｍａｉｎ　Ｓｗａｐｐｉｎｇ））

図４は、種々の生合成変異体およびそれらの再フォールディング特性および生物学的特性の模式図である。太い実線は、ＯＰ－１を表し、細い実線は、ＣＤＭＰ－２／ＧＤＦ－６またはＧＤＦ－５を表し、そして斜線は、ＢＭＰ－２を表す。変異体構築物を図４Ａに提示し、そして個々の配列変異体を図４Ｂに提示する。個々の残基の変化を、図において、置換している残基によって示す。残基の番号付けは上記の通りであり、フィンガー２における二重システイン（ｃｙｓｔｅｉｎ　ｄｏｕｂｌｅｔ）の後の第１の残基から数える。例えば、変異体Ｈ２２３３は、ＯＰ－１（２５Ｒ＞Ｅ　２６Ｎ＞Ｄ　３０Ｒ＞Ｅ　３５Ｈ＞Ｒ）である。同様に、変異体Ｈ２４４７は、Ｈ２２３３における全ての変化を有し、そしてさらに、１Ａ＞Ｖ　４Ｑ＞Ｅ　６Ｎ＞Ｓを有する。変異体Ｈ２４３３は、ＯＰ－１（４Ｑ＞Ｋ　３５Ｈ＞Ｒ）であり、そして変異体Ｈ２４５６は、ＯＰ－１（４Ｑ＞Ｅ　６Ｎ＞Ｓ　２５Ｒ＞Ｅ　２６Ｎ＞Ｄ　３０Ｒ＞Ｅ　３５Ｈ＞Ｒ）である。

【０２００】

本明細書中に教示されるように、本発明は、注文に応じた（ｃｕｓｔｏｍｉｚｅｄ）変異体タンパク質およびこの変異体タンパク質をコードするＤＮＡを巧妙に作るノウハウを当業者に提供する。変異体タンパク質を特定のインビボでの適

用に適切にする、特定の所望される特性を有する変異体タンパク質を設計する手段が、本明細書中にさらに教示および例示される（少なくともＩ．Ｂ．節、ＩＩ節、およびＩＩＩ節、前述の変異体タンパク質の例示的な実施態様についての実施例１～４、８および１１を参照のこと）。例えば、変化した溶解度という特性を有する変異体タンパク質は、レシピエントに提供される形態形成的有効量を操作するために、インビボで使用され得る。すなわち、溶解度の増大は、アベイラビリティーの増大を生じ得；溶解度の減少は、アベイラビリティーの減少を生じ得る。従って、このような全身投与される変異体タンパク質は、即座に利用可能であり得／即効性の形態形成効果を有し得、一方、局所投与された変異体タンパク質は、よりゆっくりと利用可能であり得／延長した形態形成効果を有し得る。当業者は、手近な事実および状況を考慮して、減少した溶解度という特性に対して増大した溶解度という特性が好ましい場合をすぐに理解する。このようなパラメーターの最適化は、慣用的な実験および通常の技能を必要とする。

【０２０１】

同様に、変化した安定性という特性を有する変異体タンパク質は、レシピエントに提供される形態形成的有効量を操作するために、インビボで使用され得る。すなわち、安定性の増大は、半減期の増大を生じ得る。なぜなら、インビボでの代謝回転は、より小さくなるからである；安定性の減少は、半減期およびアベイラビリティーの減少を生じ得る。なぜなら、インビボでの代謝回転がより大きくなるからである。従って、このように全身投与された変異体タンパク質は、迅速に利用可能であり得るか／ボーラス型投薬を達成する即効性の形態形成効果を有し得るか、あるいは延長した期間にわたってインビボで利用可能であり得るか／持続性放出型の投薬を達成する延長された形態形成効果を有し得るかのいずれかである。当業者は、手近な事実および状況を考慮して、減少した安定性という特性に対して増大した安定性という特性が好ましい場合を理解する。このようなパラメーターの最適化は、慣用的な実験および通常の技能を必要とする。

【０２０２】

さらに、変化した特性の組合せ（例えば、溶解度および安定性の特性であるがこれらに限定されない）を有する変異体タンパク質が、レシピエントに提供される形態形成的有効量を操作するために、インビボで使用され得る。すなわち、特定の変化した特性の組合せを有する変異体タンパク質を設計することによって、形態形成的有効量は、時限放出の様式において投与され得；投薬は、量および持続時間の両方に関して調節され得；処置レジメは、少ないがいくつかの典型を挙げると全身的または局所的に、低用量で開始され、続いて高用量に移され得るか、またはその逆であり得る。当業者は、手近な事実および状況下で、多い形態形成的有効量に対して少ない形態形成的有効量が適切である場合を理解する。このようなパラメーターの最適化は、慣用的な実験および通常の技能を必要とする。

【０２０３】

さらに、１以上の変化した特性を有する変異体タンパク質は、発達における固有の欠損を克服するために有用である。１以上の変化した特性を有する変異体タンパク質は、宿主のネイテイブな形態形成シグナル伝達系における固有の欠損を回避するように設計され得る。非限定的な例として、本発明の変異体タンパク質は、標的組織中のネイティブなレセプターにおける欠損、細胞内シグナル伝達経路における欠損、および／または異なるサブドメインに含まれる機能／生物学的活性と関連する特性と逆であるような、部分自体の認識と関連したサブドメインの特性に依存する他の事象における欠損を迂回するために使用され得る。当業者は、手近な事実および状況を考慮して、このような変異体タンパク質が適切である場合を理解する。最適化は、慣用的な実験および通常の技能を必要とする。

【０２０４】

（実施例１０．ＯＰ－１ベースの変異体構築物の結合活性の決定）

ＯＰ－１レセプターをその細胞表面上に発現している細胞を、３５ｍｍディッシュ中にプレートし、そして１０％仔ウシ血清を加えたＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）中で４８時間インキュベートする。精製ＯＰ－１、またはＯＰ－１アナログを、本質的には、Ｆｒｏｌｉｋら（１９８４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．５９５：１０９９５～１１０００のプロトコルに従うことにより、クロラミンＴ酸化によって$Na^{125}I$（好ましくは、約５０ｍＣｉ／ｍｇ～１００ｍＣｉ／ｍｇという比活性を有する）でヨウ素化する。次いで、標識されたＯＰ－１またはＯＰ－１アナログを、標準的な手順を使用して（例えば、クロマトグラフィー分離によって）精製する。次いで、プレートされた細胞を、０．１％ ＢＳＡの存在下で生理学的に緩衝化された生理食塩水で２回洗浄し、そしてＢＳＡ、緩衝液および標識されたＯＰ－１（１ｎｇ）ならびに種々の濃度（例えば、０～１０ｍｇ／ｍｌ）の未標識競合物（例えば、未標識ＯＰ－１またはＯＰ－１ベースの変異体）の存在下で２２℃でインキュベートする。結合後に、これらの細胞を、冷緩衝液で３回洗浄し、０．５ｍｌの０．５Ｎ ＮａＯＨ中に可溶化し、このディッシュから取り出し、そしてγカウンターまたはシンチレーションカウンターによって放射活性を決定する。次いで、データを阻害パーセントとして表す（ここで、特異的結合の１００％の阻害は、競合物の非存在下での結合と、１００倍モル濃度の過剰の未標識競合物の存在下での結合との間の差である）。結合パラメーターを、好ましくは、コンピュータープログラム（例えば、ＬＩＧＡＮＤ（Ｍｕｎｓｕｎら（１９８０）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０７：２２０～２５９））を使用して決定する。このアッセイの実行の際に、ＯＰ－１ベースの変異体が、ＯＰ－１レセプターに対する特異的な結合活性を有し得ることが意図される。結合活性の確認の際に、この変異体は、生物学的活性の他のしるしについてその後に試験され得る。

【０２０５】

（実施例１１．ＯＰ－１ベースの変異体構築物の生物学的活性の他のしるし）

得られたＯＰ－１ベースの変異体構築物の生物学的活性は、インビボおよびインビトロでのアッセイにおける標準的なものの使用のいずれかの使用（代表的には、ネイティブなＯＰ－１活性を評価するために使用される）によって決定され得る。種々のさらなる例示的アッセイを、以下に詳細に示す。

【０２０６】

（Ａ．前駆体細胞刺激）

以下の実施例は、ＯＰ－１ベースの変異体が間葉前駆体細胞の増殖を刺激する能力を実証するために設計される。有用なナイーブ幹細胞は、従来の方法論（例えば、Ｆａｒａｄｊｉら（１９８８）Ｖｏｘ Ｓａｎｇ．５５（３）：１３３～１３８またはＢｒｏｘｍｅｙｅｒら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８６：３８２８～３８３２を参照のこと）を使用して、骨髄または臍帯血から単離され得る多能性幹細胞、ならびに血液から得られるナイーブ幹細胞を含む。あるいは、胚細胞（例えば、培養された中胚葉細胞株由来）が、使用され得る。

【０２０７】

前駆体細胞を得るため、およびＯＰ－１ベースの変異体が細胞増殖を刺激する能力を決定するための別の方法は、インビボでの供給源から前駆体細胞を捕捉することである。例えば、遊走前駆体細胞の流入を可能にし得る生体適合性マトリクス材料は、遊走前駆体細胞の流入が可能となるに十分な長さで、インビボで部位に移植され得る。例えば、骨に由来する、グアニジン抽出マトリクス（例えば、Ｓａｍｐａｔｈら（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：６５９１～６５９５、または米国特許第４，９７５，５２６号に開示されるように処方される）は、Ｓａｍｐａｔｈらの方法に本質的に従って、ラットに皮下部位で移植され得る。３日後に、この移植片を取り出し、そしてマトリ

クスに結合した前駆体細胞を分散させ、そして培養する。

【０２０８】

しかし、次いで、得られた前駆体細胞は、標準的な細胞培養条件（例えば、本明細書中以下に記載される条件）下で、ＯＰ－１ベースの構築物とともに、インビトロでインキュベートされる。外部刺激の非存在下では、この前駆体細胞は、培養物中でそれら自体では増殖しないか、またはほんの最小限に増殖する。しかし、ＯＰ－１のような生物学的に活性なＯＰ－１変異体の存在下で培養された前駆体細胞が増殖することが意図される。細胞増殖は、当該分野において周知の標準的な方法を使用して、可視的または分光測光的に決定され得る。

【０２０９】

（Ｂ．モルフォゲン誘導性細胞分化）

種々のアッセイが、ＯＰ－１ベースの細胞分化を決定するために使用され得る。

【０２１０】

（１．胚性間葉分化）

天然ＯＰ－１に関して、ＯＰ－１ベースの変異体が、細胞分化を誘導するために利用され得ることが意図される。細胞分化を誘導する能力は、当該分野において十分に記載されている標準的な細胞培養および細胞染色の方法論を使用して、変異体タンパク質の存在下で、初期の間葉細胞を培養すること、次いでトルイジンブルーでの染色によってこの培養された細胞の組織学を研究することによって実証され得る。例えば、第１１期（ｓｔａｇｅ　１１）にて重層している上皮細胞から分離され、かつ標準的な組織培養条件（例えば、化学的に規定された、無血清培地（例えば、ＨＡＴ（０．１ｍＭヒポキサンチン、１０ｍＭアミノプテリン、１２ｍＭチミジン）を加えた、６７％　ＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）、２２％　Ｆ－１２培地、１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ　ｐＨ７、２ｍＭ　グルタミン、５０ｍｇ／ｍｌトランスフェリン（ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎｇ）、２５ｍｇ／ｍｌインスリン、微量元素、オレイン酸に結合されたウシ血清アルブミン（２ｍｇ／ｍｌ）を含む）中で）下でインビトロで培養された場合に、下顎骨になるように運命付けられたラット間葉細胞は、分化し続けないことが公知である。しかし、これらの同じ細胞が、さらに１日（この時点で細胞は第１２期の細胞になる）、重層している内胚葉と接触されたままである場合、それらは、インビトロでそれら自体が分化し続け、軟骨細胞を形成する。骨芽細胞へのさらなる分化、および最終的には下顎骨へのさらなる分化は、適切な局所的な環境（例えば、血管形成した環境）を必要とする。

【０２１１】

天然ＯＰ－１に関してと同様に、ＯＰ－１変異体（例えば、１０～１００ｎｇ／ｍｌ）の存在下でインビトロで培養された第１１期の間葉細胞は、それらを重層している内胚葉細胞から収集される細胞産物とともに培養した場合にインビトロで分化し続けるのとまさに同様に、インビトロで分化し続けて、軟骨細胞を形成することが予測される。この実験は、細胞分化能力を実証するために、異なる間葉細胞を用いて実行され得る。

【０２１２】

（２．骨芽細胞のアルカリホスファターゼ誘導）

モルフォゲン誘導性細胞分化の別の例として、ＯＰ－１変異体が骨芽細胞の分化を誘導する能力は、骨芽細胞の初代培養物、または骨芽細胞様細胞株を使用して、そして分化した骨芽細胞表現型に対する特異的マーカーである種々の骨細胞マーカー（例えば、アルカリホスファターゼ活性、上皮小体ホルモン媒介性サイクリックＡＭＰ（ｃＡＭＰ）産生、オステオカルシン合成、および鉱化速度の増強）についてアッセイして、インビトロで実証され得る。

【０２１３】

無血清培地中で培養された骨芽細胞を、ある範囲のＯＰ－１変異体の濃度（例えば、１ｍｌの培地あたり０．１ｎｇ、１．０ｎｇ、１０．０ｎｇ、４０．０ｎｇまたは８０．０ｎｇのＯＰ－１変異体）とともに；あるいは、同様の濃度範囲の天然ＯＰ－１またはＴＧＦ－βとともにインキュベートする。７２時間のインキュベーション後に、この細胞の層を、０．５ｍｌの１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で抽出する。この得られた細胞抽出物を遠心分離し、そして１００μｌの抽出物を９０μｌのパラニトロソ－フェニルホスフェート（ＰＮＰＰ）／グリセリン混合物に添加し、そして３７℃の水浴中で３０分間インキュベートし、そしてこの反応を１００μｌの０．２Ｎ　ＮａＯＨで停止させる。次いで、これらのサンプルを、プレートリーダー（例えば、Ｄｙｎａｔｅｃｈ　ＭＲ７００プレートリーダー、そして吸光度は、標準物としてｐ－ニトロフェノールを使用して、４００ｎｍで測定される）を通じて実行し、アルカリホスファターゼ活性の存在および量を決定する。タンパク質濃度を、ＢｉｏＲａｄ方法によって決定する。アルカリホスファターゼ活性を、ユニット／μｇタンパク質（ここで１ユニット＝遊離された１ｎｍｏｌのｐ－ニトロフェノール／３０分（３７℃））で算定する。

【０２１４】

天然ＯＰ－１単独のように、ＯＰ－１変異体は、骨芽細胞においてアルカリホスファターゼの産生を刺激し、それによって骨芽細胞が分化した表現型の増殖および発現を促進する。

【０２１５】

ラット骨芽細胞によるアルカリホスファターゼの産生に対するＯＰ－１変異体の長期効果もまた、以下の通りに実証され得る。

【０２１６】

ラットの骨芽細胞を、上記のマルチウェル（ｍｕｌｔｉ－ｗｅｌｌ）プレートにおいて調製し、そして培養する。この例において、６セットの２４ウェルプレートに、１ウェルあたり５０，０００のラット骨芽細胞をプレートする。次いで、上記のように調製された各々のプレートにおけるウェルを、３つの群に分割する：（１）例えば、培地１ｍｌあたり１ｎｇのＯＰ－１変異体を受けるもの；（２）培地１ｍｌあたり４０ｎｇのＯＰ－１変異体を受けるもの；および（３）培地１ｍｌあたり８０ｎｇのＯＰ－１変異体を受けるもの。次いで、各プレートを、異なる長さの時間（０時間（コントロール時間）、２４時間、４８時間、９６時間、１２０時間、および１４４時間）、インキュベートする。各々のインキュベーション期間後に、この細胞層を、０．５ｍｌの１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で抽出する。得られた細胞抽出物を、遠心分離し、そしてアルカリホスファターゼ活性を、上記のように、パラニトロソ－フェニルホスフェート（ＰＮＰＰ）を使用して決定する。天然ＯＰ－１のように、ＯＰ－１変異体は、骨芽細胞におけるアルカリホスファターゼの産生を用量依存様式で刺激し、その結果、漸増用量のＯＰ－１変異体はさらに、アルカリホスファターゼ産生のレベルを増大させる。さらに、処理した骨芽細胞におけるＯＰ－１変異体で刺激された上昇したレベルのアルカリホスファターゼは、延長した期間にわたって持続することが意図される。

【０２１７】

（３．ＰＴＨ媒介性ｃＡＭＰの誘導）

この実験は、インビトロでのラット骨芽細胞における上皮小体ホルモン媒介性ｃＡＭＰ産生に対するＯＰ－１変異体の効果を試験するために設計される。簡潔には、ラット骨芽細胞を、上記のように、マルチウェルプレートにおいて調製し、そして培養する。次いで、培養された細胞を、４つの群に分割する：（１）例えば、培地１ｍｌあたり１．０ｎｇ、１０．０ｎｇおよび４０．０ｎｇのＯＰ－１変異体を受けるウェル；（２）同様の濃度範囲にて、例えば、天然ＯＰ－１を

受けるウェル；（３）同様の濃度範囲にて、例えば、ＴＧＦ－βを受けるウェル；および（４）増殖因子を全く受けないコントロール群。次いで、プレートを、さらに７２時間インキュベートする。７２時間の終了時に、０．５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）および１ｍＭ　３－イソブチル－１－メチルキサンチンを含む培地で２０分間これらの細胞を処理し、続いてこれらのウェルの半分にヒト組換え上皮小体ホルモン（ｈＰＴＨ、Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ）を、２００ｎｇ／ｍｌの濃度で１０分間添加する。次いで、この細胞層を、０．５ｍｌの１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を用いて各ウェルから抽出する。次いで、ｃＡＭＰレベルを、ラジオイムノアッセイキット（例えば、Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ　Ｈｅｉｇｈｔｓ、Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）を使用して決定する。ＯＰ－１のように、単独のＯＰ－１変異体は、ＰＴＨ媒介性ｃＡＭＰ応答における増大を刺激し、それによって骨芽細胞の分化した表現型の増殖および発現を促進する。

【０２１８】

（４．オステオカルシン産生の誘導）

オステオカルシンは、インビボでの骨の鉱化の速度における肝要な役割を果たす骨芽細胞によって合成される骨特異的タンパク質である。血清中のオステオカルシンの循環レベルを、インビボでの骨芽細胞活性および骨形成についてのマーカーとして使用する。骨芽細胞に富む培養物におけるオステオカルシン合成の誘導は、インビトロでのＯＰ－１変異体効力を実証するために使用され得る。

【０２１９】

ラット骨芽細胞を、上記のように、マルチウェルプレートにおいて調製し、そして培養する。この実験では、この培地に、１０％　ＦＢＳを補充し、そして２日目に、細胞に、新鮮な１０ｍＭ　β－グリセロホスフェート（Ｓｉｇｍａ，Ｉｎｃ．）を補充した新鮮な培地を供給する。５日目に始めて、そしてその後１週間に２回、細胞を、全ての上記の成分に加えて、新鮮なＬ（＋）－アスコルビン酸を培地１ｍｌあたり５０ｍｇの最終濃度で含む、完全鉱化培地を供給する。次いで、ＯＰ－１変異体を、例えば、０．１％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を含む５０％アセトニトリル（または５０％エタノール）において、培地１ｍｌあたり５ｍｌ以下の変異体で直接的にウェルに添加する。コントロールウェルは、溶媒ビヒクルのみを受ける。次いで、これらの細胞に再び供給し、そして馴化培地サンプルを、標準的なプロテアーゼインヒビターを含む標準的なラジオイムノアッセイ緩衝液中で１：１に希釈し、そしてオステオカルシンについてアッセイするまで、－２０℃で貯蔵する。オステオカルシン合成を、市販のオステオカルシン特異的抗体を使用する標準的なラジオイムノアッセイにより測定する。

【０２２０】

鉱化を、固定された細胞層に対する改変ｖｏｎ　Ｋｏｓｓａ染色技術を使用して、長期間（１３日）の培養物に対して決定する。細胞を、新鮮な４％パラホルムアルデヒドにおいて、２３℃で１０分間固定し、続いて冷０．９％ＮａＣｌでリンスする。次いで、固定された細胞を、市販のキット（Ｓｉｇｍａ，Ｉｎｃ．）を使用して、ｐＨ９．５で１０分間、内因性アルカリホスファターゼについて染色する。次いで、紫色に染色された細胞を、メタノールを用いて脱水し、そして風乾する。暗室中での３％ＡｇＮＯ$_3$中での３０分のインキュベーション後に、Ｈ$_2$Ｏでリンスしたサンプルを、２５４ｎｍＵＶ光に３０秒間露光して、黒色の銀染色されたホスフェート小塊を呈色させる。個々の鉱化された病巣（少なくとも、２０ｍｍのサイズ）を、解剖顕微鏡下でカウントし、そして小塊／培養物として表す。

【０２２１】

天然ＯＰ－１のように、ＯＰ－１変異体は、骨芽細胞培養物におけるオステオカルシン合成を刺激する。さらに、ＯＰ－１変異体に応答して増大したオステオ

カルシン合成は、用量依存性様式においてであり、それによってインキュベーションの１３日後の基礎レベルに対して、有意な増大を示す。増強したオステオカルシン合成はまた、ラットオステオカルシン特異的プローブを使用して、オステオカルシンｍＲＮＡメッセージの上昇（２０倍の増大）を検出することによって確認され得る。さらに、オステオカルシン合成における増大は、鉱質小塊の出現によって決定されるように、長期の骨芽細胞培養物における鉱化の増大と相関する。天然ＯＰ－１のように、ＯＰ－１変異体は、未処理培養物と比較した場合に、初期鉱化速度を有意に増大させることもまた意図される。

【０２２２】

（５．モルフォゲン誘導性ＣＡＭ発現）

ｖｇ／ｄｐｐ亜群のネイティブなメンバーは、形態形成のそれらの誘導の部分として、ＣＡＭ発現、特にＮ－ＣＡＭ発現を誘導する（同時継続中の米国特許出願第９２２，８１３号を参照のこと）。ＣＡＭは、組織の発生における本質的な段階として、全ての組織において同定される形態調節（ｍｏｒｐｈｏｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ）分子である。Ｎ－ＣＡＭは、少なくとも３つのイソ型（Ｎ－ＣＡＭ－１８０、Ｎ－ＣＡＭ－１４０およびＮ－ＣＡＭ－１２０、ここで「１８０」、「１４０」および「１２０」が、ＳＤＳポリクリルアミドゲル電気泳動によって測定されるように、イソ型のみかけの分子量を示す）を含み、Ｎ－ＣＡＭは、発生中の組織中で少なくとも一過性で、そして神経組織中で永続的に発現される。Ｎ－ＣＡＭ－１８０イソ型およびＮ－ＣＡＭ－１４０イソ型の両方は、発生中の組織および成体組織の両方で発現される。Ｎ－ＣＡＭ－１２０イソ型は、成体組織のみで見出される。別の神経ＣＡＭは、Ｌ１である。

【０２２３】

ＯＰ－１ベースの変異体がＣＡＭ発現を刺激する能力は、ＮＧ１０８－１５細胞を使用する、以下のプロトコルを使用して実証され得る。ＮＧ－１０８－１５は、形質転換されたハイブリッド細胞株（神経芽腫×神経膠腫、Ａｍｅｒｉｃａ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）であり、形質転換された胚性ニューロンの形態学的な特徴を示す。以下の実施例Ｄに記載されるように、未処理のＮＧ１０８－１５細胞は、線維芽細胞性形態、または最小に分化した形態を示し、そして発生中の細胞と通常関連するＮ－ＣＡＭの１８０イソ型および１４０イソ型のみを発現する。ｖｇ／ｄｐｐ亜群のメンバーでの処理後に、これらの細胞は、成体ニューロンの形態学的特徴を示し、そして上昇したレベルの、３つ全てのＮ－ＣＡＭイソ型を発現する。

【０２２４】

この実施例では、ＮＧ１０８－１５細胞を、標準的な培養手順、および細胞全体の抽出物に対して実行される標準的なウエスタンブロットを使用して、漸増濃度のＯＰ－１形態単位または天然ＯＰ－１のいずれかの存在下で、４日間培養する。Ｎ－ＣＡＭイソ型を、３つ全てのイソ型と交差反応する抗体であるｍＡＢＨ２８．１２３（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓから得られる）を用いて検出する。ここで、異なるイソ型は、電気泳動ゲル上でのそれらの異なる移動度によって識別可能である。コントロールＮＧ１０８－１５細胞（未処理）は、１００ｍｇまでのタンパク質を使用したウエスタンブロット分析によって決定されるように、１４０ｋＤａおよび１８０ｋＤａの両方のイソ型を発現するが、１２０ｋＤａを発現しない。天然ＯＰ－１のように、ＯＰ－１変異体でのＮＧ１０８－１５細胞での処理は、１８０ｋＤａおよび１４０ｋＤａのイソ型の発現、ならびに誘導される１２０ｋＤａイソ型の誘導において用量依存性の増大を生じる。さらに、天然ＯＰ－１で誘導されるＣＡＭ発現のように、ＯＰ－１変異体は、組織学によって決定されるように細胞の凝集と相関し得ることが意図される。

【０２２５】
（Ｃ．形質転換した表現型の再分化）
ＯＰ－１変異体はまた、天然のＯＰ－１と同様に、非形質転換細胞の特徴である形態へと、形質転換した細胞の再分化を誘導する。以下に提供する例は、ニューロン起源の形質転換したヒト細胞株（ＮＧ１０８－１５）；ならびにマウス神経芽細胞腫細胞（Ｎ１Ｅ－１１５）、およびヒト胚癌細胞の、非形質転換細胞の特徴である形態への、モルフォゲン誘導性再分化を詳説する。
【０２２６】
上記のように、ＮＧ１０８－１５は、神経芽細胞×神経膠腫（ＡＴＣＣ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤから得た）を融合すること、および形質転換した胚ニューロンの特徴である形態を示す（例えば、繊維芽細胞の形態を有する）ことによって産生される、形質転換したハイブリッド細胞株である。詳細には、この細胞は、多角形細胞体、短い小穂様突起を有し、そして近くの細胞とほとんど接触していない。化学的に規定された無血清培地にて培養されたＮＧ１０８－１５細胞を０．１～３００ｎｇ／ｍｌのＯＰ－１変異体または天然のＯＰ－１とともに４時間インキュベートすると、細胞形態の規則正しい用量依存性の変化が誘導される。
【０２２７】
例えば、ＮＧ１０８－１５細胞を、ポリ－Ｌ－リジンコートした６ウェルプレート上で継代培養する。各ウェルは、化学的に規定された培地２．５ｍｌ中に４０～５０，０００細胞を含む。３日目に、０．０２５％トリフルオロ酢酸を含む６０％エタノール中のＯＰ－１変異体または天然のＯＰ－１　２．５ｍｌを、各ウェルに添加する。この培地を、毎日、モルフォゲンの新しいアリコートと交換する。ＯＰ－１変異体がＯＰ－１と同様に、形質転換細胞の用量依存性再分化（細胞体の丸型化、相の明るさの増加、短い軸索突起（ｎｅｕｒｉｔｅ　ｐｒｏｃｅｓｓ）の伸長、および細胞の超微細構造の他の顕著な変化を含む）を誘導することが意図される。数日後に、処理した細胞が、顕微鏡試験により可視的に決定した場合に、類上皮シートを形成し始め、次いでこのシートが非常に密集した多層凝集物になることもまた意図される。
【０２２８】
さらに、この再分化は、ＤＮＡ合成、細胞分裂、または細胞生存度に関する、いかなる変化も伴わずに生じ、形態変化が、細胞分化またはモルフォゲンの毒性効果に派生することがないようにすることが、意図される。さらに、形態単位誘導性再分化が、^{3}Ｈ－チミジン取り込みにより決定されるように、細胞分裂を阻害しないかもしれないことが意図される。このことは、同様の実験において、形質転換細胞の再分化を刺激することが示されている他の分子（例えば、酪酸、ＤＭＳＯ、レチノイン酸またはフォルスコリン（Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ））とは異なる。ＯＰ－１変異体は、天然のＯＰ－１と同様に、再分化の誘導後に、細胞の安定性および生存度を維持する。
【０２２９】
本明細書中に記載の改変されたモルフォゲンは、従って、神経系の新形成および新形成病変の処置のために（特に、神経芽細胞腫（網膜芽細胞腫、および神経膠腫を含む）処置において）有用な治療薬剤を提供する。
【０２３０】
（Ｄ．表現型の維持）
ＯＰ－１変異体はまた、天然のＯＰ－１と同様に、細胞の分化した表現型を維持するために使用され得る。本願は、特に、老化細胞または休止細胞において、表現型の継続した発現を誘導するために有用である。
【０２３１】
（１．表現型の維持に関するインビトロモデル）

モルフォゲンの表現型維持能力は、容易に決定される。多数の分化した細胞が、当該分野で十分に記載された標準的組織培養条件（例えば、Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ｃ．Ｒ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編、Ｗｉｌｅｙ、１９８７）下のインビトロでの複数の継代の後に、老化細胞または休止細胞になる。しかし、これらの細胞が、ネイティブのモルフォゲン（例えば、ＯＰ－１）と共にインビトロで培養された場合、細胞は、複数の継代を通じて、その表現型の発現を維持されるように刺激される。例えば、培養された骨芽細胞（例えば、培養された骨肉腫細胞および頭蓋冠細胞）のアルカリホスファターゼ活性は、インビトロでの複数の継代の後に、有意に減少される。しかし、この細胞がＯＰ－１の存在下で培養される場合に、アルカリホスファターゼ活性は長期間にわたって維持される。同様に、筋細胞の表現型発現もまた、モルフォゲンの存在下で維持される。この実験において、骨芽細胞が上記のように培養される。この細胞は、グループに分けられ、種々の濃度の、ＯＰ－１変異体または天然のＯＰ－１のいずれか（例えば、０～３００ｎｇ／ｍｌ）とともにインキュベートされ、そして標準的方法論を使用して、複数回（例えば、３～５回）継代される。次いで、継代された細胞は、本明細書に記載のように、分化した細胞の代謝機能の指標として、アルカリホスファターゼ活性について試験される。ＯＰ－１変異体の非存在下で培養された骨芽細胞は、天然のＯＰ－１の非存在下と同様に、ＯＰ－１変異体処理細胞または天然のＯＰ－１処理細胞と比較した場合に、アルカリホスファターゼ活性が減少していることが意図される。

【０２３２】

（２．表現型維持に関するインビボモデル）

表現型維持能力はまた、骨粗しょう症についての標準的ラットモデルを使用して、インビボで示され得る。Ｌｏｎｇ Ｅｖａｎｓ雌性ラット（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ、ＭＡ）は、標準的外科技術を使用して、偽装操作される（コントロール動物）かまたは卵巣摘出され、エストロゲン産生の減少から生じる骨粗しょう症状態が作製される。手術後（例えば、卵巣摘出の２００日後）に、ラットは全身に、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）またはモルフォゲン（例えば、ＯＰ－１変異体または天然のＯＰ－１、１～１０ｍｇ）を２１日間（例えば、尾静脈注射を毎日行うことによって）提供される。次いで、このラットは屠殺され、そして血清アルカリホスファターゼレベル、血清カルシウムレベル、および血清オステオカルシンレベルが、ここおよび上記に記載のような標準的方法論を使用して決定される。このＯＰ－１変異体処理ラットは、ＯＰ－１処理ラットと同様に、オステオカルシンおよびアルカリホスファターゼ活性の上昇したレベルを示し得ることが意図される。脛骨ｄｉａｓｙｐｈｅａｌの組織形態観測分析は、未処理の卵巣除去ラットと比較した場合に、ＯＰ－１変異体処理マウスにおいて骨質量の改善を示す。

【０２３３】

（Ｅ．前駆（ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ）細胞集団の増殖）

前駆細胞が、インビボまたはエキソビボで増殖するように刺激され得る。細胞は、注射または他の方法で個体にＯＰ－１変異体を含む滅菌調製物を提供することによって、インビボで刺激され得ることが意図される。例えば、個体の造血多能性幹細胞集団が、その個体の骨髄に適切な濃度のＯＰ－１変異体を注射または他の方法で提供することによって、増殖するように刺激され得る。

【０２３４】

前駆細胞は、増大されるべき集団の前駆細胞を、形態形成的に活性なＯＰ－１変異体と、その細胞の増殖を刺激するに十分な濃度および時間で、滅菌条件下で接触させることによって、エキソビボで刺激され得る。適切な濃度および刺激時間は、経験的に、基本的に上記の実施例Ａに記載の手順に従って、決定され得る

。約０．１～１００ｎｇ／ｍｌの間のＯＰ－１変異体濃度、および約１０分～約７２時間、またはより一般的には約２４時間までの刺激期間が、約10^4～10^6細胞の細胞集団を刺激するには代表的に十分なはずである。次いで、刺激された細胞は、例えば、適切なインビボ位置にこの細胞を注射することによるように、個体に提供され得る。適切な生体適合性前駆細胞は、当該分野で公知であるかまたは本明細書中上記の方法のいずれかによって、得られ得る。

【０２３５】

（Ｆ．損傷または罹患した組織の再生）

ＯＰ－１変異体を使用して、罹患または損傷した哺乳動物組織を修復し得る。修復されるべき組織は、好ましくは、まず評価され、そして過剰の、壊死性または干渉性の瘢痕組織が、必要があれば、例えば、切除、あるいは外科的方法、化学的方法、または医学分野で公知の他の方法によって除去される。

【０２３６】

次いで、ＯＰ－１変異体は、外科的移植または注入のいずれかによって、滅菌した生体適合性組成物の一部として、組織位置に直接提供され得る。この変異体はまた、経口投与または非経口投与によるように、全身に提供され得る。あるいは、形態形成的に活性なＯＰ－１変異体により刺激される前駆細胞を含む、滅菌した、生体適合性組成物が、この組織位置に提供され得る。その位置に既存の組織は、罹患していようとまたは損傷していようと、前駆細胞の増殖および組織特異的分化を可能にするに適切なマトリクスを提供する。さらに、損傷または罹患した組織位置（特に、外科的手段によってさらに攻撃を受けた組織位置）は、形態形成的に許容可能な環境を提供する。ＯＰ－１変異体の全身への提供は、特定の適用（例えば、例として、骨粗しょう症および骨再造形周期の他の障害の処置において）にとって十分で有り得る。

【０２３７】

いくつかの環境、特に、組織損傷が広範である場合において、この組織は、細胞の流入および増殖に十分なマトリクスを提供し得ないかもしれない。これらの場合において、このＯＰ－１変異体により刺激された前駆細胞を、下記のいずれかの手段により調製された、適切な、生体適合性の、処方されたマトリクスと共に組織位置へと提供することが、必要であり得る。このマトリクスは、好ましくは、インビボで生分解性である。このマトリクスはまた、組織特異的であり得、そして／または７０～８５０ｍｍの範囲、最も好ましくは１５０～４２０ｍｍの範囲内の寸法を有する、多孔性粒子を含み得る。

【０２３８】

ＯＰ－１変異体はまた、免疫／炎症応答媒介性組織損傷、および損傷後の瘢痕組織形成を、予防するかまたは実質的に阻害するために使用され得る。ＯＰ－１変異体は、新規に損傷した組織位置に提供されて、その位置に組織形態形成を誘導し、それによって非分化結合組織への移動する繊維芽細胞の凝集を防ぎ得る。好ましくは、このＯＰ－１変異体は、損傷の５時間以内に組織位置へ注入される、滅菌した薬学的調製物として提供され得る。例えば、外科的または他の積極的臨床治療の一部として、免疫／炎症応答が、避けがたいかまたは故意に誘導される場合に、ＯＰ－１変異体は、好ましくは、その治療の前か、またはその治療と同時に、患者に予防的に提供され得る。

【０２３９】

（Ｇ．形態形成アッセイ）

下記はいくつかの例であり、本明細書中に開示される変異体タンパク質が組織形態形成を誘導するために使用され得ることを示すための、プロトコルを記載する。例として、以下は、骨、肝臓、神経、象牙質、セメント質および歯周組織における、ＯＰ－１変異体誘導性組織形態形成の記載である。

【０２４０】

（１．ＯＰ－１変異体誘導性骨形態形成）

上記のように、タンパク質の形態形成活性を示しそして評価するために特に有用な哺乳動物組織モデル系は、当該分野で公知である軟骨性骨組織形態形成モデルであり、そして例えば、米国特許第４，９６８，５９０号に記載され、そして本明細書中に参考として援用される。軟骨性骨形成を誘導する能力は、前駆細胞の増殖、および軟骨芽細胞および骨芽細胞への前駆細胞の分化を誘導する能力、軟骨マトリクス形成、軟骨石灰化、および骨再造形を誘導する能力、ならびに適切な血管供給の形成および造血骨髄分化を誘導する能力を含む。

【０２４１】

この形態形成物質が配置されている、局所環境は、組織形態形成に重要である。本明細書中で使用される場合、「局所環境」とは、組織構造マトリクス、およびその組織を取り囲む環境を含むことが理解される。例えば、その増殖のために適切な固定下層を必要とすることに加えて、モルフォゲンにより刺激された細胞は、その分化の組織特異性を指向するためにシグナルを必要とする。これらのシグナルは、異なる組織について変化し、そして細胞表面マーカーを含み得る。さらに、新しい組織の血管形成は、血管形成を支持する局所環境を必要とする。

【０２４２】

以下は、ＯＰ－１変異体およびＯＰ－１変異体含有組成物の、インビボでの形態形成的有用性を評価するための種々の手順を示す。この組成物は、哺乳動物において、当該分野で周知の多数の手順のいずれかに従って、注入されるか、または外科的に移植され得る。例えば、外科的移植バイオアッセイが、Ｓａｍｐａｔｈら（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：６５９１～６５９５および米国特許第４，９６８，５９０号の手順に本質的に従って、実施され得る。

【０２４３】

組織学的切片化および染色が、インビボにて形態形成の程度を決定するために、特に、組織修復手順において好まれる。切り出された移植片は、ブワン溶液に固定され、パラフィンに包理され、そして６～８ｍｍの切片へと切断される。トルイジンブルーまたはヘモトキシリン／エオシンを用いた染色は、その新しい組織の最終的発生を明らかに示す。１２日間の移植片が、その移植片が新たに誘導された組織を含むか否かを決定するためには、通常十分である。

【０２４４】

首尾良い移植片は、誘導性の組織発生の段階を通して制御された進行を示し、それにより生じる組織特異的事象を同定および追跡することを可能にする。例えば、軟骨性骨形成において、この段階は以下を含む：（１）１日目の白血球；（２）２日目および３日目の、間葉細胞の移動および増殖；（３）５日目および６日目の、軟骨細胞の出現；（４）７日目の軟骨マトリクス形成；（５）８日目の軟骨石灰化；（６）９日目および１０日目の、血管侵襲、骨芽細胞の出現、および新しい骨の形成；（７）１２日目～１８日目の、破骨細胞の出現、および骨再造形および移植されたマトリクスの溶解の開始；ならびに（８）２１日目の、生じた小骨における造血骨髄分化。

【０２４５】

組織学的評価に加えて、生物学的マーカーが、組織形態形成についてのマーカーとして使用され得る。有用なマーカーは、この移植片の均質化後に、（例えば、分光測定によって）アッセイされ得る活性を有する組織特異的酵素を含む。これらのアッセイは、この移植片が動物から取り出された後の組織形成の定量化およびその組織形成の評価を迅速に得るために、有用であり得る。例えば、アルカリホスファターゼ活性が、骨形成についてのマーカーとして使用され得る。

【０２４６】

全身に提供されたＯＰ－１変異体の取り込みは、標準的な標識プロトコルおよ

びパルス追跡手順を使用して、標識されたタンパク質（例えば、放射性標識された）を使用し、そしてその新しい組織におけるその限局化を決定し、そして／または循環系からのその消失をモニターすることによって、追跡され得る。ＯＰ－１変異体にはまた、組織特異的分子タグが提供され得、このタグの取り込みが、モニターされ得、そして提供されたＯＰ－１変異体の濃度と相関付けられ得る。例として、雌性ラットにおける卵巣除去は、骨のアルカリホスファターゼ活性の減少を生じ、そしてこのラットを骨粗しょう症にかかりやすくする。ここで、この雌性ラットがＯＰ－１変異体を提供された場合、カルシウムの全身濃度における減少が観察され得、これは、この提供されたＯＰ－１変異体の存在と相関し、かつアルカリホスファターゼ活性の増加に対応することが予期される。

【０２４７】

（２．ＯＰ－１変異体誘導性肝臓再生）

別の例として、ＯＰ－１変異体を利用する部分的肝切除の後に、実質的に損傷した肝臓組織の形態形成を誘導する方法が、提示される。この一般的プロトコルのバリエーションを使用して、他の異なる組織において、ＯＰ－１変異体のモルフォゲン活性を試験し得る。一般的方法は、組織の本質的に再生しない部分を切除する工程およびＯＰ－１変異体を、好ましくは可溶性薬学的調製物として、その切除した組織位置に提供する工程、その創傷を閉鎖する工程、および将来にその部位を試験する工程、を包含する。骨と同様に、肝臓は、胎児生活の間の損傷の際に再生する潜在能力を有する。

【０２４８】

生体適合性溶液中のＯＰ－１変異体（例えば、精製ＯＰ－１変異体、１ｍｇ／ｍｌ）を、０．１％トリフルオロ酢酸または適合性の酸を含む、５０％エタノールまたは適合性溶媒に可溶化する。注射可能なＯＰ－１変異体溶液を、例えば、１容量のＯＰ－１形態単位溶媒－酸ストック溶液を滅菌ＰＢＳ（リン酸緩衝化生理食塩水）中の０．２％ラット血清アルブミン、９容量で希釈することによって、調製する。

【０２４９】

この実験において、発育中のラットまたは老齢のラット（例えば、Ｌｏｎｇ Ｅｖａｎｓ、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ、ＭＡ）を、ケタミンを使用して麻酔する。その肝臓の葉２つ（左および右）を切り出し（その葉の約１／３）、そしてこのＯＰ－１変異体を、その切除末端に沿って複数の部位に局所的に注射する。注射するＯＰ－１変異体の量は、例えば、１００～１０００μｌのＰＢＳ／ＲＳＡ（リン酸緩衝化生理食塩水／ラット血清アルブミン）注射緩衝液中に２０～１００μｇで有り得る。プラシーボサンプルは、注射緩衝液のみを含む。実験アッセイにおいて、好ましくは、各グループで５匹のラットを使用する。この創傷を閉鎖し、そしてこのラットに通常の食餌を食べさせ、そして水道水を飲ませる。

【０２５０】

１２日後、このラットを屠殺し、そして肝臓再生を目で観察して、肝臓再生に対するＯＰ－１変異体の効果を最も効果的に評価する。このＯＰ－１変異体を注射したグループが、完全な肝臓組織再生を示して、この肝臓中にどこにも切除の痕跡が残っていないことを示すことが、意図される。対照的に、ＰＢＳのみを注射したコントロールグループは、代表的には最小の再生のみを示し、そのサンプル中に切開が残っていることを示す。

【０２５１】

（３．ＯＰ－１変異体誘導性の、象牙質、セメント質、歯周靭帯の再生）

なお別の例として、ＯＰ－１変異体が象牙質形成を誘導する能力もまた、示され得る。現在まで、損傷に対する歯髄組織の予測不能な応答は、歯科学における基本的臨床問題である。より下等な非霊長類哺乳動物に基づくモデルよりも、サ

ルがヒトの歯科生物学の指標となると仮定されるので、カニクイザルを霊長類モデルとして選択する。

【０２５２】

標準的歯科手術的手順を使用して、サンプルの歯のその髄質のすぐ上のエナメル質および象牙質を（穴を開けることにより）取り出し、歯冠歯髄組織の部分的切断を実施し、ホメオスタシスを誘導し（髄質処理の適用）、そして標準的手順によって腔を閉鎖および充填することによって、歯髄の小さい領域（例えば、２ｍｍ）を外科的に露出する。

【０２５３】

使用する髄質処理は、キャリアマトリクス中に分散したＯＰ－１変異体、キャリアマトリクス単独、および処理なしを含む。１匹の動物（各処理あたり４匹）あたり１２本の歯を調製し、そして２匹の動物を使用する。４週間目に、歯を抜き取り、そして象牙質形成の分析のために組織学的に処理し、そして／または象牙質鉱化作用を分析するためにすりつぶす。骨様象牙質修復に対するＯＰ－１変異体の効果を、コントロールサンプルと比較することによって、視覚的に観察し得る。このＯＰ－１変異体は、天然のＯＰ－１と同様に、キャリアマトリクスと一緒になって、外科的に露出された健康な歯髄上を移動する、修復骨様象牙質橋の形成を誘導することが、意図される。対照的に、キャリアマトリクス単独で処理した髄質は、修復象牙質を形成しない。

【０２５４】

（４．ＯＰ－１変異体誘導性神経組織修復）

なお別の例として、中枢神経系（ＣＮＳ）修復に対する、形態形成的に活性なＯＰ－１変異体による再生効果の誘導を、ラット脳穿刺モデルを使用して示し得る。手短かには、雄性Ｌｏｎｇ　Ｅｖａｎｓラットを麻酔して、その頭の領域を手術のために調製する。頭蓋冠を、標準的外科手順を使用して露出し、そして各葉の中心に向かう穴を０．０３５Ｋワイヤを使用して開けて、この頭蓋冠をちょうど貫通させる。次に、ＯＰ－１変異体（２５ｍｇ）、天然のＯＰ－１（２５ｍｇ）またはＰＢＳのいずれかを含む、２５ｍｌの溶液を、ハミルトンシリンジによって、各穴に提供する。溶液を、表面の下約３ｍｍの深さまで、その下にある皮質、脳梁、および海馬へと送達する。次いで、皮膚を縫合し、そしてその動物を回復させる。

【０２５５】

手術の３日後、ラットを断頭することによって屠殺し、そしてその脳を切片化のために処理する。瘢痕組織形成を、グリア細胞繊維性酸性タンパク質（グリア細胞の瘢痕についてのマーカータンパク質）について免疫蛍光染色して、瘢痕形成の程度を定性的に決定することによって、評価する。ＯＰ－１変異体は、天然のＯＰ－１と同様に、ＯＰ－１変異体で処理した動物の組織切片において、グリア細胞繊維性酸性タンパク質のレベルを減少し得、これは、モルフォゲンが、グリア細胞の瘢痕形成を阻害し、それにより神経再生を刺激できることを示す。

【０２５６】

ＯＰ－１変異体が長い距離にわたる末梢神経系軸索成長を刺激する能力を、以下のモデルを使用して示し得る。この末梢神経系のニューロンは、損傷後にそれ自身で、新しい突起を発芽し得るが、ガイドがなければ、これらの発芽は、代表的には、適切に連結せず、そして死ぬ。この破裂が広範な（例えば、５または１０ｍｍより大きい）場合、再生は乏しいかまたは存在しない。ＯＰ－１を使用する以前の実験は、モルフォゲンが、長い距離にわたる末梢神経系軸索成長を刺激し、損傷した末梢神経経路の修復および再生を可能にすることを示す。

【０２５７】

本実施例において、神経再生のＯＰ－１変異体刺激を、このラット坐骨神経モデルを使用して示す。このラット坐骨神経は、その切断された末端が生理食塩水

で満たされた神経ガイドチャンネルに挿入された場合には、５ｍｍのギャップにそして時々１０ｍｍのギャップにわたって自発的に再生し得る。この実験において、少なくとも１２ｍｍのギャップにわたる神経再生を試験する。

【０２５８】

体重２３０～２５０ｇの成体雌性Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）に、ペントバルビタールナトリウム（３５ｍｇ／体重ｋｇ）の腹腔内注射をして麻酔する。皮膚の切開を、その大腿と平行かつそのすぐ後ろに行う。外側広筋と膝屈曲筋との間の無血管筋間平面に進入し、そして坐骨神経を取り囲む、弛緩した線維疎性組織に続く。この弛緩した組織を長軸方向に分割し、それにより、どの部分も脈管遮断することなく、その完全な程度にわたって坐骨神経を自由にする。外科用顕微鏡下で、坐骨神経を大腿の中程にて微小なはさみを用いて離断し、そして神経断端を１２ｍｍ分離するＯＰ－１形態単位ゲル移植片を移植する。この移植片領域を、内側の直径１．５ｍｍで長さが２０ｍｍのシリコーンチューブ中に入れ、その内側をこの変異体溶液で満たす。詳細には、このチューブの中央の１２ｍｍは、生成した実質的に純粋なＯＰ－１変異体１～５ｍｇをＭＡＴＲＩＧＥＬ™（Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡから入手）約１００ｍｌと混合することによって調製した、ＯＰ－１形態単位ゲル、マウス肉腫組織由来の細胞外マトリクス抽出物からなり、そして可溶化した組織基底膜（ラミニン、ＩＶ型コラーゲン、硫酸ヘパリン、プロテオグリカンおよびエンタクチンを含む）をリン酸緩衝化生理食塩水中に含む。次いで、この変異体を満たしたチューブを、欠損部位に直接移植し、各末端にて４ｍｍ、その神経断端に挿入する。各断端を、この変異体ゲルに対して隣接させ、そして、市販の外科用１０－０ナイロンを神経上膜（束保護鞘）に３回縫合することによって、このシリコーンチューブ中に確保する。

【０２５９】

ＯＰ－１変異体ゲル移植片に加えて、コントロール移植片（空のシリコーンチューブ、ゲルのみで満たしたシリコーンチューブおよび「リバース」自己移植片（この動物の坐骨神経の１２ｍｍ離断セグメントを、縫合の前に１８０°回転させる）を満たしたシリコーンチューブ）もまた、好ましくは移植する。全ての実験を、好ましくは、４連で行う。すべての創傷を、好ましくは創傷クリップによって閉じ、このクリップを１０日後に除去する。ラットには、両方の脚に移植し得る。３週目に、この動物を屠殺し、この移植したセグメントを取り出し、そしてすぐにドライアイス上で凍結させる。次に、凍結した切片を、その移植部位にわたって切断し、そしてフルオロセインを用いて標識した抗神経フィラメント抗体（例えば、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓから入手）を使用して免疫蛍光染色することによって、軸索再生について試験する。

【０２６０】

坐骨神経の再生は、そのギャップをＯＰ－１変異体ゲルで満たした場合に、すべての移植片部位にて１２ｍｍの距離全体にわたって生じ得ることが、意図される。対照的に、空のシリコーンチューブ、ゲルのみ、およびリバース自己移植片は、神経再生を示さない。

【０２６１】

（ＩＶ．一般的意見）

特性（例えば、フォールディング、可溶性、安定性、表面結合／付着、生物活性など）を評価するための前述の手段のいずれかを、ＯＰ－１ベースの変異体以外の変異体構築物を使用して実施し得ることが、理解され、そして評価される。必要なすべてのものは、天然のＴＧＦ－βスーパーファミリータンパク質と変異体構築物の特性との、比較評価である。従って、例えば、ネイティブのタンパク質Ｘの好ましいフォールディング特性を保持するが、ネイティブのタンパク質Ｙ

の神経組織分化特性を獲得した変異体を、本明細書中に提供される実験模範例および指針を使用して、容易に同定し得る。当業者は、最適に組み合わされた所望の特性をすべて有するものとして、好ましい構築物を認識する。最適とは、任意の１つの特定の特性の最大の発現を、必ずしも意味することを意図しない。むしろ、最適とは、組み合わせた発現が、当業者により意図される環境および／または用途に適切であるような、所望の特性各々の発現を意味することが意図される。

【０２６２】

本発明はまた、その精神および範囲から逸脱することなく、他の特定の形態で具現化され得る。従って、他の実施態様は、上記の特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【０２６３】

【図１】図１は、ＢＭＰファミリーの種々の既知のメンバー、およびＴＧＦ－βスーパーファミリーメンバータンパク質について、２つ並んでいるシステインに続く最初の残基で開始して並べた、フィンガー２サブドメインを規定する、整列したＣ末端の残基を列挙する。

【図２】図２は、ＢＭＰのＣ末端の活性ドメインのリボンモデルの模式図である。これは、７個のシステイン骨格、および３個の異なるサブドメイン：ヒール（１０）、フィンガー１（１２）、およびフィンガー２（１４）（これは、ネックまたはベース領域（１６）、およびチップまたはループ領域（１８）を含む）を示す。

【図３Ａ】図３Ａは、ＯＰ－１のＣ末端の７個のシステインの活性ドメインをコードするヌクレオチドおよび対応する一文字表記のアミノ酸配列である。

【図３Ｂ】図３Ｂは、ＢＭＰ－５およびリフォールディングについてのその改変体のヌクレオチドおよび対応する一文字表記のアミノ酸配列である。

【図４Ａ】図４Ａは、本発明のキメラタンパク質構築物の例示的な実施態様の模式図である。

【図４Ｂ】図４Ｂは、リフォールディングおよびＲＯＳ活性の特性に関する、本発明の例示的な実施態様の模式図である。

【図５】図５は、ＴＧＦ－βの７－システインのドメインにおける、リフォールディング効率と荷電アミノ酸との間の関係を示す。

【図６Ａ】図６Ａ、６Ｂ、および６Ｃは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのいくつかの既知のメンバーの、それぞれフィンガー１、ヒール、およびフィンガー２領域の相同性を示すように並べられた、一文字表記のアミノ酸コードを使用する配列アラインメントである。以下の各領域を含むそれぞれのアミノ酸が示されている：ヒトのＴＧＦ－β１からＴＧＦ－β５（ＴＧＦ－βサブグループ）、ｄｐｐ、Ｖｇ－１、Ｖｇｒ－１、６０Ａ（同時係属中のＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／２７１，５５６号を参照のこと）、ＢＭＰ－２Ａ（ＢＭＰ－２としてもまた文献において公知である）、ｄｏｒｓａｌｉｎ、ＢＭＰ－２Ｂ（ＢＭＰ－４としてもまた文献において公知である）、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－１（ＢＭＰ－７としてもまた文献において公知である）、ＯＰ－２（ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７６３５号、および米国特許第５，２６６，６８３号を参照のこと）、およびＯＰ－３（Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０７／９７１，０９１号）からなるＶｇ／ｄｐｐサブグループ、ＧＤＦ－１、ＧＤＦ－３、およびＧＤＦ－９からなるＧＤＦサブグループ、インヒビンα、インヒビンβＡ、およびインヒビンβＢからなるインヒビンのサブグループ。ダッシュ（－）は、隣接するアミノ酸間のペプチド結合を示す。各サブグループについてのコンセンサス配列パターンを、各サブグループの最下段に示す。

【図６Ｂ】図６Ａ、６Ｂ、および６Ｃは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのいくつかの既知のメンバーの、それぞれフィンガー１、ヒール、およびフィンガー２領域の相同性を示すように並べられた、一文字表記のアミノ酸コードを使用する配列アラインメントである。以下の各領域を含むそれぞれのアミノ酸が示されている：ヒトのＴＧＦ－β１からＴＧ

Ｆ－β５（ＴＧＦ－βサブグループ）、ｄｐｐ、Ｖｇ－１、Ｖｇｒ－１、６０Ａ（同時係属中のＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／２７１，５５６号を参照のこと）、ＢＭＰ－２Ａ（ＢＭＰ－２としてもまた文献において公知である）、ｄｏｒｓａｌｉｎ、ＢＭＰ－２Ｂ（ＢＭＰ－４としてもまた文献において公知である）、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－１（ＢＭＰ－７としてもまた文献において公知である）、ＯＰ－２（ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７６３５号、および米国特許第５，２６６，６８３号を参照のこと）、およびＯＰ－３（Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０７／９７１，０９１号）からなるＶｇ／ｄｐｐサブグループ、ＧＤＦ－１、ＧＤＦ－３、およびＧＤＦ－９からなるＧＤＦサブグループ、インヒビンα、インヒビンβＡ、およびインヒビンβＢからなるインヒビンのサブグループ。ダッシュ（－）は、隣接するアミノ酸間のペプチド結合を示す。各サブグループについてのコンセンサス配列パターンを、各サブグループの最下段に示す。

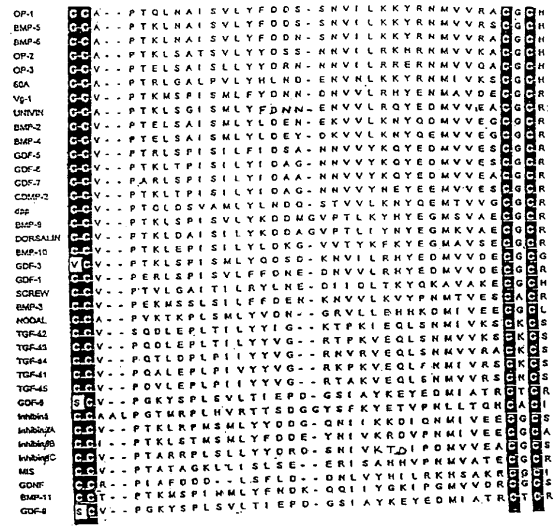
【図６Ｃ】図６Ａ、６Ｂ、および６Ｃは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーのいくつかの既知のメンバーの、それぞれフィンガー１、ヒール、およびフィンガー２領域の相同性を示すように並べられた、一文字表記のアミノ酸コードを使用する配列アラインメントである。以下の各領域を含むそれぞれのアミノ酸が示されている：ヒトのＴＧＦ－β１からＴＧＦ－β５（ＴＧＦ－βサブグループ）、ｄｐｐ、Ｖｇ－１、Ｖｇｒ－１、６０Ａ（同時係属中のＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／２７１，５５６号を参照のこと）、ＢＭＰ－２Ａ（ＢＭＰ－２としてもまた文献において公知である）、ｄｏｒｓａｌｉｎ、ＢＭＰ－２Ｂ（ＢＭＰ－４としてもまた文献において公知である）、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＯＰ－１（ＢＭＰ－７としてもまた文献において公知である）、ＯＰ－２（ＰＣＴ／ＵＳ９１／０７６３５号、および米国特許第５，２６６，６８３号を参照のこと）、およびＯＰ－３（Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０７／９７１，０９１号）からなるＶｇ／ｄｐｐサブグループ、ＧＤＦ－１、ＧＤＦ－３、およびＧＤＦ－９からなるＧＤＦサブグループ、インヒビンα、インヒビンβＡ、およびインヒビンβＢからなるインヒビンのサブグループ。ダッシュ（－）は、隣接するアミノ酸間のペプチド結合を示す。各サブグループについてのコンセンサス配列パターンを、各サブグループの最下段に示す。

【図７】図７は、標準的な一文字表記のアミノ酸コードで大文字で示されている、アミノ酸配列の一文字コードのリストであり、そして小文字で、その位置において有用であるアミノ酸の群を同定する。ここで、アミノ酸を表す小文字は、表８に示されているパターン定義の鍵となる表に従って示されている。図７は、本発明の生合成構築物のフィンガー１、ヒール、およびフィンガー２領域を構成するための好ましいパターン配列を同定する。ダッシュ（－）は、隣接するアミノ酸間のペプチド結合を示す。

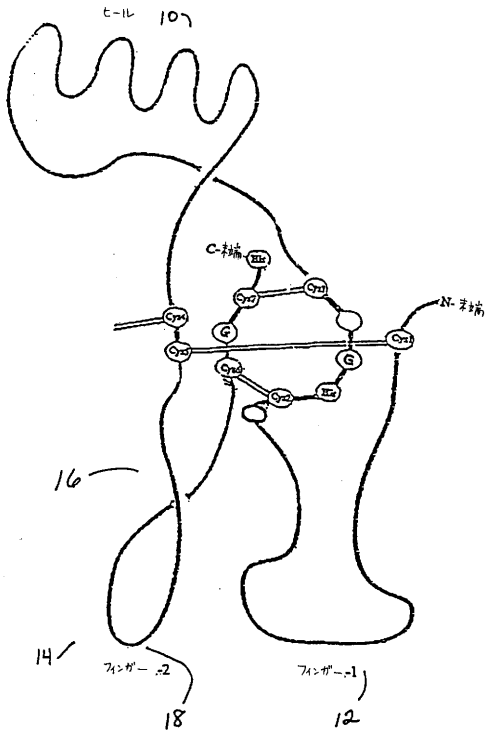
【図８】図８は、ＳｍｉｔｈおよびＳｍｉｔｈ（１９９０）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：１１８－１２２の教示に従って作成されたパターン定義の表である。

【図１】

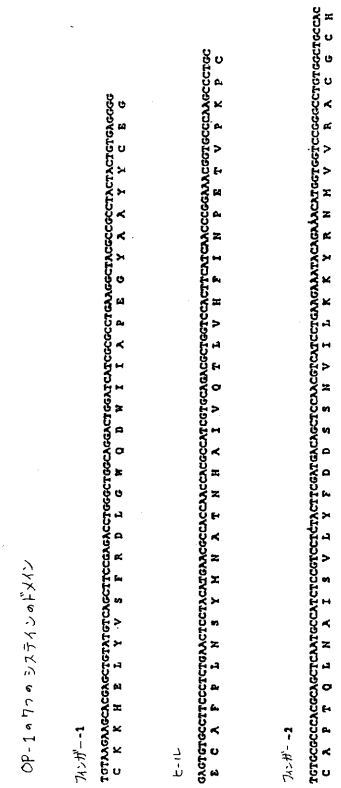
Fig. 1



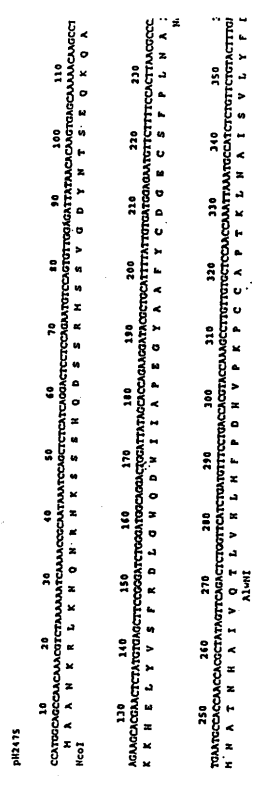
【図２】



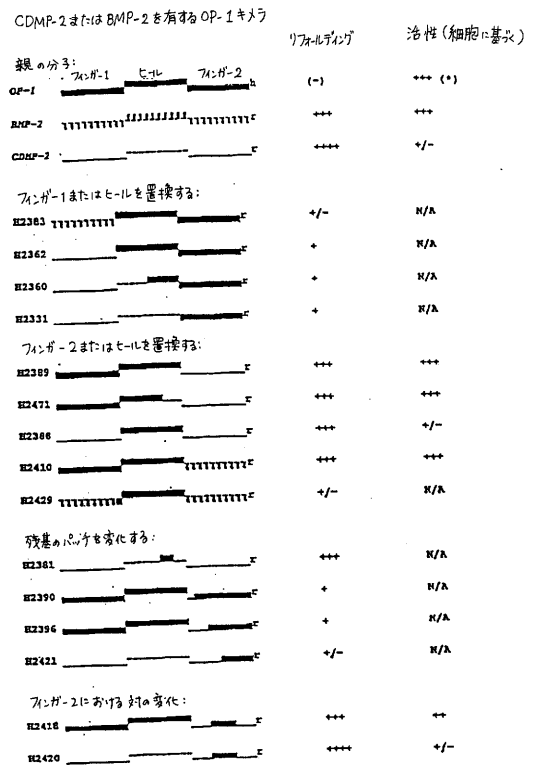
【図３Ａ】



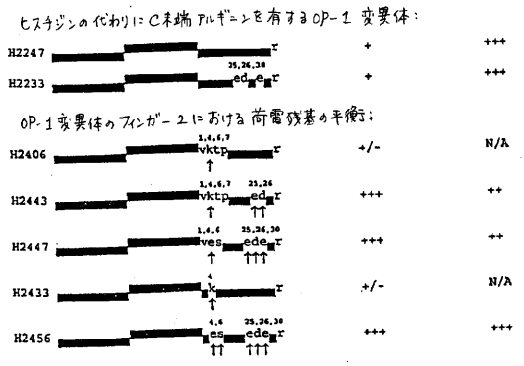
【図３Ｂ】



【図４Ａ】



【図４Ｂ】

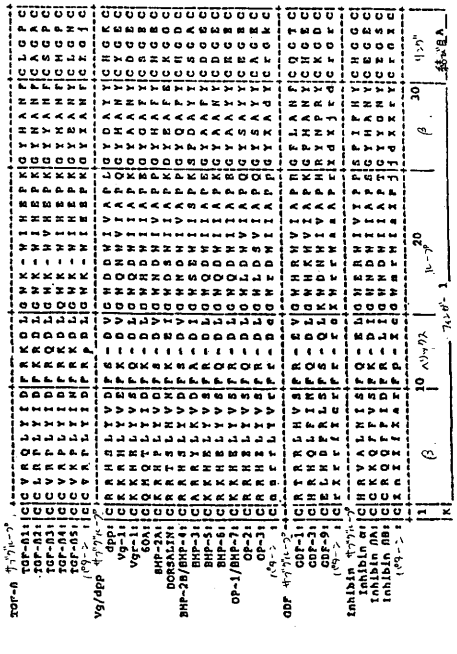


【図５】

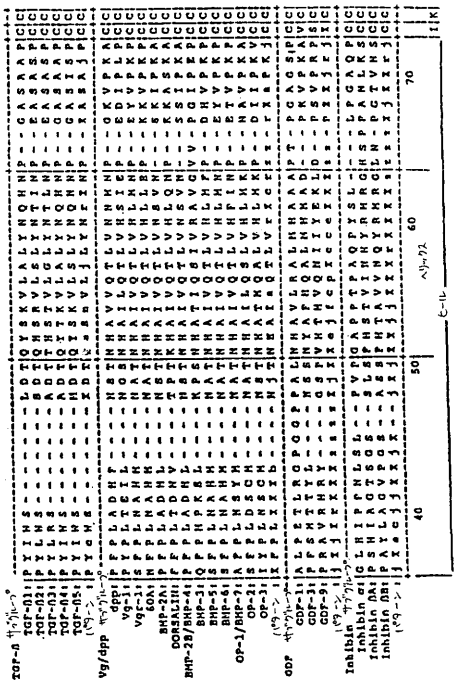
ＴＧＦ－β（７つのシステイン）ドメインにおけるリフォールディング効率
および荷電アミノ酸の関係

タンパク質	フィンガー1	CXGXC	ヒール	フィンガー2	CXCX C末端	荷電残基の合計 (+)-(−)＝合計	最小荷電 ヒール フィンガー2	正味α 荷電 フィンガー2	リフォールディング効率
OP-1	3+, 4-	2-	1+, 1-	4+, 2-	0	8+, 9- = 17	2-	2+	+/-
H2247	3+, 4-	2-	1+, 1-	4+, 2-	1+	9+, 9- = 18	2-	2+	+
H2447	3+, 4-	2-	1+, 1-	2+, 6-	1+	7+, 12- = 19	6-	4-	+++
BMP-3	4+, 4-	0	3+, 1-	3+, 4-	1+	11+, 9- = 20	4-	1-	+++
BMP-2	2+, 3-	1-	2+, 1-	2+, 6-	1+	7+, 11- = 18	6-	4-	+++
GDF-5	3+, 5-	1-	1+, 4-	2+, 4-	1+	6+, 14- = 20	4-	2-	+++
CDMP-2	3+, 5-	1-	1+, 3-	2+, 4-	1+	6+, 13- = 19	4-	2-	+++
GDNF	2+, 4-	0	6+, 4-	5+, 5-	0	13+, 13- = 26	5-	0	+++
TGF-β1	5+, 3-	0	1+, 1-	5+, 2-	1+	11+, 6- = 17	2-	3+	+/-
TGF-β2	5+, 3-	0	1+, 2-	4+, 3-	1+	10+, 8- = 18	3-	1+	+/-

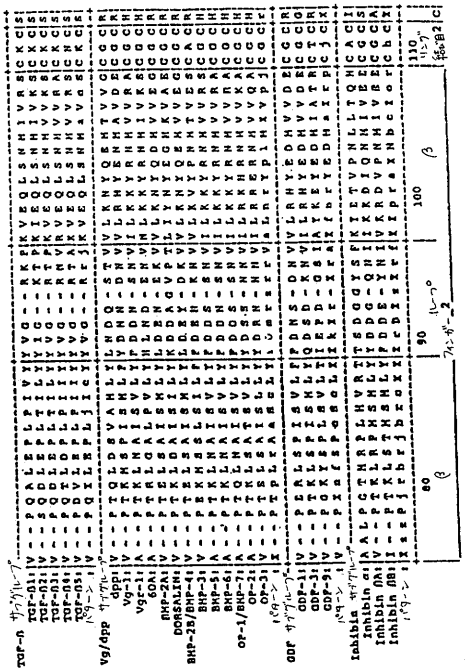
【図６Ａ】



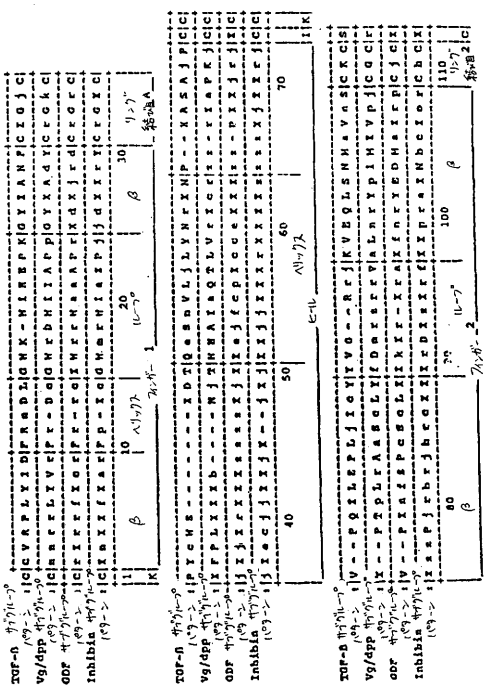
【図６Ｂ】



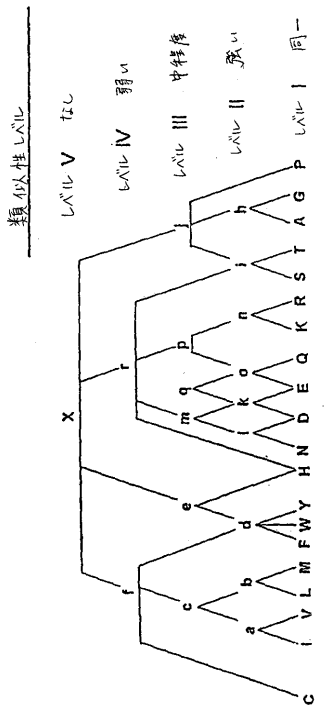
【図６Ｃ】



【図７】



【図８】


類似性レベル
レベル V なし
レベル IV 弱い
レベル III 中程度
レベル II 強い
レベル I 同一
X
r
e
f
c
b
a
d
m
q
p
k
o
n
j
h
i
C
V
L
M
F
W
Y
H
N
D
E
Q
K
R
S
T
A
G
P

【配列表】
0005149070000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ハーマン オッパーマン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２０５３, ミッドウェイ, サマー ヒル ２２
(72)発明者 メイ－セング タイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１５４５, シャーウズバーリー, マンロー ストリート ４７
(72)発明者 ジョン マッカートニー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７４６, ホリストン, メレン ストリート ２１０

合議体
審判長 鈴木 恵理子
審判官 六笠 紀子
審判官 冨永 みどり

(56)参考文献 仏国特許出願公開第２７２００６９（ＦＲ, Ａ１）
米国特許第５７５６３０８（ＵＳ, Ａ）
国際公開第９１／５５６５（WO, Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N15/00-90
C07K14/00-18/00
C12Q1/00-70
C12N1/00-9/99
PUBMED
MEDLINE
BIOSIS
WPI
GENBANK
DDBJ
EMBL
GENESEQ
UNIPROT