

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5100662号
(P5100662)

(45) 発行日 平成24年12月19日 (2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日 (2012.10.5)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/51 (2006.01)

C O 7 K 14/51

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 33 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-547532 (P2008-547532)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月20日 (2006.12.20)
 (65) 公表番号 特表2009-521220 (P2009-521220A)
 (43) 公表日 平成21年6月4日 (2009.6.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/048730
 (87) 国際公開番号 W02007/087053
 (87) 国際公開日 平成19年8月2日 (2007.8.2)
 審査請求日 平成21年9月8日 (2009.9.8)
 (31) 優先権主張番号 60/752, 969
 (32) 優先日 平成17年12月22日 (2005.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503054122
 セントカー・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 5
 5 マルバーン・グレートバレイパークウエ
 イ 2 0 0
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 アメガジー, バーナード
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 6
 0 フェニックスビル・マグノリアドライブ
 1 3 9
 (72) 発明者 カニンガム, マーク・アール
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 4
 8 ケネットスクエア・ガーデンドライブ 7
 1 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BMP-7 変異体組成物、方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 2】

配列番号：1 2 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 3】

配列番号：1 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 4】

配列番号：1 6 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 5】

配列番号：1 8 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 6】

配列番号：2 0 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 7】

配列番号：2 2 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 8】

配列番号：2 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 9】

配列番号：2 6 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項 10】

10

20

配列番号：28において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項11】

配列番号：30において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項12】

配列番号：32において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項13】

配列番号：34において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖。

【請求項14】

少なくとも1個のポリエチレングリコール分子をさらに含んでなる請求項13のペプチド鎖。

10

【請求項15】

請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13のペプチド鎖をコードしている核酸を含んでなる単離核酸。

【請求項16】

配列番号：3 (p 3 1 0 5 ; R 2 9 9 S / R 3 1 4 S) において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項17】

配列番号：5において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項18】

配列番号：13において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

20

【請求項19】

配列番号：15において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項20】

配列番号：17において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項21】

配列番号：19において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項22】

配列番号：21において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項23】

配列番号：23において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

30

【請求項24】

配列番号：25において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項25】

配列番号：27において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項26】

配列番号：29において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項27】

配列番号：31において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項28】

配列番号：33において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

40

【請求項29】

配列番号：35において示される核酸配列を含んでなる単離核酸。

【請求項30】

請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13のペプチド鎖を細胞に与えることを含む、TGF-β誘導細胞増殖を抑制する方法。

【請求項31】

請求項15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29の核酸を含んでなるベクター。

【請求項32】

請求項31のベクターを含む宿主細胞。

50

【請求項 3 3】

請求項 3 2 の宿主細胞を培養し、そして宿主細胞によって生産されたペプチド鎖を回収することを含む、ペプチド鎖を作成する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト骨形成タンパク質 7 (hBMP-7) 変異体 (variant) ペプチド鎖、これらのペプチド鎖をコードしている核酸鎖、ならびに前記物質を作成および使用する方法に関する。

【背景技術】

10

【0002】

ヒト骨形成タンパク質 7 (hBMP-7) は、タンパク質の TGF- β サブファミリーの 1 員であり、そして骨構造および腎機能の両モジュレーターとして認識された治療学的可能性を有する (非特許文献 1)。例えば、活性 hBMP-7 は、骨髄線維症、特発性肺線維症、腎性骨形成異常、糖尿病性腎症、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) および変形性関節症のような適応症においてタンパク質治療剤として使用することができた。

【0003】

hBMP-7 は、1293 個の塩基対のオープンリーディングフレームを含有する mRNA (対応する cDNA は配列番号: 1 において示される) として転写され、これが、431 個のアミノ酸残基 (図 1; 配列番号: 2) の前駆タンパク質として翻訳され、そしてこれがタンパク質分解的にプロセスされる。hBMP-7 前駆タンパク質は、配列番号: 2 の残基 1 ~ 29 にわたるシグナルペプチド、配列番号: 2 の残基 30 ~ 292 にわたるプロドメイン (prodomain)、および配列番号: 2 の残基 293 ~ 431 にわたる成熟形態ドメインを含有する (図 1)。

20

【0004】

hBMP-7 前駆タンパク質のタンパク質分解プロセッシングは数段階において起きると信じられている。最初に、シグナルペプチドが hBMP-7 を細胞の小胞体に対向させ、ここでフォールディングが起き、そして hBMP-7 はホモ二量体タンパク質複合体を形成する。次に、hBMP-7 プロドメインがタンパク質分解プロセッシングによって除去されて、2 個の反並行 hBMP-7 成熟ドメインペプチド鎖からなる共有結合されたホモ二量体が生成される。この最終ホモ二量体タンパク質複合体は生物学的に活性のある形態物であり、そして細胞によって分泌される。

30

【0005】

分泌された hBMP-7 は、他の細胞の表面受容体および可溶性アンタゴニスト、例えば ActRII、BMPRIa および Noggin と相互作用して、その生物学的効果および活性を媒介する。これらの相互作用に関する構造情報は、多数の異なる BMP-7 結晶構造物から得ることができる (非特許文献 2; 非特許文献 3; 非特許文献 4; 非特許文献 5)。

【0006】

hBMP-7 (Ozkanakら (非特許文献 6) によって骨形成タンパク質 1 (OP-1) として既に既知である) は少なくとも 1990 年以來知られていたけれども、今日まで、いくつかの未解決な問題が、治療学的タンパク質としてのその開発を阻んできた。第 1 に、哺乳動物細胞における hBMP-7 の組み換え発現は、類似サイズの他のタンパク質に較べて極端に低い。これは、hBMP-7 の治療学的使用のために必要とされる大規模な商業生産および精製には合致しない。第 2 に、hBMP-7 の成熟ドメインのタンパク質分解プロセッシングは、そのドメインにおける 4 個の異なる部位のいずれにおいて起きてよい。これは、このタンパク質の組み換え発現の間に生産される hBMP-7 の多数の異なる成熟形態物をもたらす。発現タンパク質におけるこの高度の不均一性は、タンパク質治療剤においては甚だ望ましくない。第 3 に、hBMP-7 の成熟形態物は 7.0 に近い pH 値では乏しい溶解度を有し; したがって、hBMP-7 の溶解性を維持する

40

50

ためには酸性pH値が求められる。しかしながら、酸性pH値は、患者に対してタンパク質治療剤を投与するために使用される、もっとも普通の送達方法、例えば静脈内注射には合致しない。最後に、hBMP-7のプロドメインはhBMP-7の成熟ドメインとは非共有的に結合している。それ故、hBMP-7の成熟ドメインからプロドメインを除去して精製することは、比較的困難であり、かつ大規模な商業生産および精製には合致しない。

【0007】

したがって、治療学的タンパク質としての使用のために適当であり、そして大規模な商業生産および精製と合致する、改良された性質を有するhBMP-7変異体ペプチド鎖に対するニーズが存在する。

10

【0008】

【非特許文献1】Klahr, J. Nephrol. 16: 179 - 185 (2003)

【非特許文献2】Greenwald et al., Mol. Cell. 11: 605 - 017 (2003)

【非特許文献3】Griffith et al., PNAS. 93: 878 - 883 (1996)

【非特許文献4】Keller et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 5: 481 - 488 (2004)

【非特許文献5】Groppe et al., Nature. 420 (6916): 636 - 642 (2002)

20

【非特許文献6】Ozkaynak et al., EMBO J. 9 (7), 2085 - 2093 (1990)

【発明の開示】

【0009】

本発明の1つの態様は、配列番号：4において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0010】

本発明のその他の態様は、配列番号：6において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0011】

30

本発明のその他の態様は、配列番号：8において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0012】

本発明のその他の態様は、配列番号：10において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0013】

本発明のその他の態様は、配列番号：12において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0014】

本発明のその他の態様は、配列番号：14において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

40

【0015】

本発明のその他の態様は、配列番号：16において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0016】

本発明のその他の態様は、配列番号：18において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【0017】

本発明のその他の態様は、配列番号：20において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

50

【 0 0 1 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 2 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 1 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 6 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 1 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 8 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 2 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 0 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 2 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 6 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 8 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 4 0 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 4 2 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。

【 0 0 2 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 5 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 1 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 7 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 2 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 9 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 1 1 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 1 3 において示される核酸配列を含んでなる単離

10

20

30

40

50

核酸である。

【 0 0 3 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 1 5 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 1 7 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 1 9 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

10

【 0 0 3 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 1 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 3 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 3 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 5 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 1 】

20

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 7 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 2 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 9 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 1 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 3 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

30

【 0 0 4 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 5 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 7 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 9 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

40

【 0 0 4 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 4 1 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 4 9 】

本明細書において引用される、限定されるものではないが特許および特許出願を含む、すべての公表物は、完全な記述をとおして引用によって本明細書に組み入れられている。

【 0 0 5 0 】

本明細書および請求項において使用されるように、単数形態物「 a 」、「 a n d 」および「 t h e 」は、文脈が外に明白に指示しない限り、複数引用物を含む。かくして、例えば、「 a c e l l 」に関しては、 1 個以上の細胞に関する引用であり、そして当業者に

50

とって既知のその等価物を含む。

【0051】

外に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する当該技術分野における熟達者によって普通に理解されるような同じ意味を有する。本明細書に記述されるものと類似または等価のすべての組成物および方法が、本発明の実行または教示において使用されてもよいが、代表的な組成物および方法が本明細書では記述される。

【0052】

用語「ペプチド鎖」は、鎖を形成するようにペプチド結合によって連結された少なくとも2個のアミノ酸残基を含んでなる分子を意味する。50個以上のアミノ酸の大ペプチド鎖は、「ポリペプチド」または「タンパク質」として言及されてもよい。50個未満のアミノ酸の小ペプチド鎖は、「ペプチド」として言及されてもよい。

10

【0053】

用語「核酸」は、鎖を形成するように連結された少なくとも2個の核酸残基を含んでなる分子を意味する。そのような核酸残基はDNAまたはRNAにおいて見出だされるそれらのものであってもよい。50個未満の残基の小核酸は、「オリゴヌクレオチド」として言及されてもよい。

【0054】

用語「hBMP-7応答症状」は、hBMP-7ペプチド鎖またはhBMP-7変異体ペプチド鎖の生物学的活性に応答する病理学的症状を意味する。そのようなペプチド鎖は、配列番号：2のフラグメントまたは本発明のペプチド鎖を含んでもよい。hBMP-7活性応答性病理学的症状の例は、例えば、骨髄線維症、特発性肺線維症、腎性骨形成異常、糖尿病性腎症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)および変形性関節症を含む。hBMP-7ペプチド鎖またはhBMP-7変異体ペプチド鎖からもたらされる生物学的活性は、例えば、骨形成の誘導、アルカリホスファターゼ活性の増大、ヒアルロナン(hyaluronan)シンターゼ2mRNAレベルの増大、I型コラーゲンmRNAレベルの増大、オステオカルシン合成の増大およびTGF- β 誘導細胞増殖の抑制を含む。当業者は、多くの他のそのような生物学的活性および病理学的症状を認識できる。

20

【0055】

本発明は、単離ペプチド鎖hBMP-7変異体組成物、これらの組成物をコードしている核酸、および関連する方法を提供する。本発明の組成物および方法は、細胞増殖の制御において、ならびに骨髄線維症、特発性肺線維症、腎性骨形成異常、糖尿病性腎症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)および変形性関節症のようなhBMP-7応答症状の処置において有用であろう。

30

【0056】

本発明の全ペプチド鎖および核酸は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖をコードしているcDNA(配列番号：1)から、標準的インビトロまたはインビボ法、またはそのような方法の組み合わせ法を使用する突然変異誘発によって得られた。本発明のhBMP-7変異体ペプチド鎖における全突然変異位置は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖において変化されたアミノ酸残基の位置を引用することによって本明細書では記述される。慣用の1および3文字アミノ酸コードが、次に示すように本明細書では使用される：

40

【0057】

【表 1】

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
アラニン	ala	A
アルギニン	arg	R
アスパラギン	asn	N
アスパラギン酸	asp	D
システイン	cys	C
グルタミン酸	glu	E
グルタミン	gln	Q
グリシン	gly	G
ヒスチジン	his	H
イソロイシン	ile	I
ロイシン	leu	L
リジン	lys	K
メチオニン	met	M
フェニルアラニン	phe	F
プロリン	pro	P
セリン	ser	S
トレオニン	thr	T
トリプトファン	trp	W
チロシン	tyr	Y
バリン	val	V

10

20

【0058】

単文字アミノ酸略語は変化の性質を記述するために使用される。例えば、R299Sは、配列番号：2の位置299におけるR（アルギニン）アミノ酸がS（セリン）アミノ酸に変化されたことを指し、そして S293 - R299は、配列番号：2の位置293のS

30

【0059】

野生型hBMP-7（配列番号：2）は、突然変異によって改変されてもよいいくつかの重要な性質および特徴を有する。第1には、各々が異なるアミノ末端をもつ多数の成熟hBMP-7イソ型が、hBMP-7前駆タンパク質（配列番号：2）のタンパク質分解プロセッシングの間に生産されることがある。これらの末端は、野生型hBMP-7前駆タンパク質（配列番号：2）のS293、R299、R314およびM315において生成することがある。S293、R299S、R314S、S293 - R299、S293 - R314および S293 - M315突然変異は、各々、各突然変異によって影響される位置においてhBMP-7変異体ペプチド鎖における切断を排除することによって、異なるアミノ末端をもつ多数の成熟hBMP-7イソ型の生成を妨げるために計画された。H287R突然変異は、配列番号：2のhBMP-7プロドメインに位置されるコア

40

【0060】

第2に、成熟hBMP-7形態物は、ActRIIおよびBMPRII受容体タンパク質と複合する。L407K、F409K、L417R、L382K、L382N、V383K、I386RおよびI386N突然変異は、hBMP-7変異体ペプチド鎖の表面

50

疎水性を減少させ、一方同時に、hBMP-7変異体：ActRIIまたはhBMP-7変異体：BMPRIIaペプチド鎖複合体形成へのいずれかの崩壊を最小化するために設計された。hBMP-7変異体ペプチド鎖におけるそのような表面疎水性の減少は、これらの突然変異を含有する変異体による凝集体の形成を低下させるが、一方なお、ActRIIおよびBMPRIIa受容体タンパク質を介するhBMP-7媒介シグナル伝達を可能にするために設計される。

【0061】

第3に、成熟hBMP-7は、可溶性アンタゴニストタンパク質Nogginによって結合されることがある。W347D突然変異は、Nogginに結合するhBMP-7変異体ペプチド鎖を減少させて、hBMP-7媒介シグナル伝達および生物学的活性を増進するために設計された。

10

【0062】

さらに、hBMP-7のR421、N422およびR426における突然変異は、得られるhBMP-7変異体ペプチド鎖の発現を増進するであろう。いかなる理論によっても制約されないことを願えば、R421E、N422DおよびR426Eのような突然変異は、発現されるペプチド鎖の溶解度を増大することによってhBMP-7変異体ペプチド鎖発現を改善すると考えられる。

【0063】

さらに、hBMP-7変異体ペプチド鎖の薬理的性質、例えばインビボの半減期は、ペギレーション(pegylation)によって改良されるかもしれない。S293C突然変異は、この突然変異を含有するhBMP-7変異体ペプチド鎖の成熟形態においてアミノ末端C残基を創製するために設計される。このアミノ末端C残基は、次に、当業者にとって既知の技術によるポリエチレングリコールの共有結合によって翻訳後に修飾することができる。

20

【0064】

最後に、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られる欠失およびドメイン置換突然変異体が、hBMP-7変異体ペプチド鎖発現を改良するために設計されてもよい。1つのそのようなhBMP-7変異体ペプチド鎖突然変異体は、hBMP-7シグナルペプチドおよびプロドメインのみを含むが、欠失されたhBMP-7成熟形態ドメインを欠如している。その他のそのような突然変異体は、ヒト成長ホルモンシグナルペプチド(配列番号：38の残基M1~A26)を含み、これは、ネイティブhBMP-7分泌シグナルペプチドを置換し、欠失されたhBMP-7プロドメインを欠如し、そしてhBMP-7成熟形態ドメインにおいてR299SおよびR314S突然変異を含有する。その他の突然変異体は、ネイティブhBMP-7分泌シグナルペプチドの代わりにヒトBMP-2(hBMP-2)分泌シグナルペプチドを、ネイティブhBMP-7プロドメインの代わりにhBMP-2プロドメインを、そしてhBMP-7成熟形態ドメインにおいてR299SおよびR314S突然変異を含む。これらのhBMP-7変異体ペプチド鎖突然変異体は、hBMP-7の分泌、タンパク質分解プロセッシングおよび発現の改良を促進するために設計された。

30

【0065】

本明細書に記述される各個々の突然変異、例えば点突然変異、欠失またはドメイン置換は、本発明のペプチド鎖を生成するために単独でもまたは組み合わせて使用されてもよい。また、本明細書に記述される突然変異は、本明細書に記述される種々の個々の突然変異に、一部、対応する改変された性質を有するさらなる変異体BMP-7ペプチド鎖を生成するために組み合わせられてもよい。そのようなさらなる変異体ペプチド鎖をコードしている核酸は、当該技術分野において周知の、標準的インビトロもしくはインビボ方法、またはそのような方法の組み合わせ法を使用して生成されてもよい。また、本発明のペプチド鎖は、例えば、本発明のペプチド鎖のアミノ末端または他の部分へのポリエチレングリコールの付加のような1つ以上の共有結合修飾物の付加によって翻訳後に修飾されてもよい。最後に、本発明の変異体ペプチドのシグナルペプチドおよびプロドメイン配列は、機

40

50

能的に等価のアミノ酸配列により置換されてもよい。そのようなさらなる変異体およびそれらをコードしている核酸もまた本発明の範囲内にある。同様に、突然変異された成熟ドメインペプチド鎖のみを含んでなる変異体ペプチド鎖およびそれらをコードしている核酸もまた本発明の範囲内である。

【 0 0 6 6 】

本発明の1つの態様は、配列番号：4において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：4のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314S突然変異を含有する。

【 0 0 6 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号：6において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：6のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてS293-R299およびR314S突然変異を含有する。

10

【 0 0 6 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号：8において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：8のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてS293-M314突然変異を含有する。

【 0 0 6 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号：10において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：10のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてS293-M315突然変異を含有する。

20

【 0 0 7 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号：12において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：12のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314SおよびL407K突然変異を含有する。

【 0 0 7 1 】

本発明のその他の態様は、配列番号：14において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：14のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314SおよびF409K突然変異を含有する。

30

【 0 0 7 2 】

本発明のその他の態様は、配列番号：16において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：16のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314SおよびL417R突然変異を含有する。

【 0 0 7 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号：18において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：18のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314SおよびL382K突然変異を含有する。

40

【 0 0 7 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号：20において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：20のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314SおよびL382N突然変異を含有する。

【 0 0 7 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号：22において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：22のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られ、そしてR299S、R314SおよびV383K突然変異を含有する。

50

異を含有する。

【 0 0 7 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 2 4 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られ、そして R 2 9 9 S、R 3 1 4 S および I 3 8 6 R 突然変異を含有する。

【 0 0 7 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 6 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 2 6 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られ、そして R 2 9 9 S、R 3 1 4 S および I 3 8 6 N 突然変異を含有する。

10

【 0 0 7 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 8 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 2 8 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られ、そして R 2 9 9 S、R 3 1 4 S、V 3 8 3 K、L 4 0 7 K および F 4 0 9 K 突然変異を含有する。

【 0 0 7 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 0 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 3 0 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られ、そして R 2 9 9 S、R 3 1 4 S および W 3 4 7 D 突然変異を含有する。

20

【 0 0 8 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 2 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 3 2 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られ、そして R 2 9 9 S、R 3 1 4 S、R 4 2 1 E、N 4 2 2 D および R 4 2 6 E 突然変異を含有する。

【 0 0 8 1 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 3 4 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られ、そして S 2 9 3 C、R 2 9 9 S および R 3 1 4 S 突然変異を含有する。

30

【 0 0 8 2 】

1 つの実施態様では、本発明は、少なくとも 1 個のポリエチレングリコール分子をさらに含んでなる配列番号： 3 4 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖を提供する。そのようなポリエチレングリコール残基は、例えば、配列番号： 3 4 の C 2 9 3 に共有結合されてもよい。C 2 9 3 は、タンパク質分解プロセッシングから得られる配列番号： 3 4 の成熟形態におけるアミノ末端残基であることが期待される。

【 0 0 8 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 6 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 3 6 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から得られた。配列番号： 3 6 のペプチド鎖は、h B M P - 7 シグナルペプチド（配列番号： 2 の残基 M 1 ~ A 2 9）およびプロドメインのみ（配列番号： 2 の残基 D 3 0 ~ R 2 9 2）を含み；h B M P - 7 成熟形態ドメイン（配列番号： 2 の残基 S 2 9 3 ~ H 4 3 1）は欠失されている。

40

【 0 0 8 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 8 において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号： 3 8 のペプチド鎖は、配列番号： 2 の野生型 h B M P - 7 前駆ペプチド鎖から一部得られた。配列番号： 3 8 のペプチド鎖は、ヒト成長ホルモンシグナルペプチド（配列番号： 3 8 の残基 M 1 ~ A 2 6）を含み、h B M P - 7 プロドメインを欠如し、そして h B M P - 7 成熟形態ドメインにおいて R 2 9 9 S および R 3 1

50

4 S 突然変異を含有する。

【 0 0 8 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号：40において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：40のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から一部得られた。配列番号：40のペプチド鎖は、ネイティブhBMP-7分泌シグナルペプチドの代わりにhBMP-2分泌シグナルペプチドを、ネイティブhBMP-7プロドメインの代わりにhBMP-2プロドメインを、そしてhBMP-7成熟形態ドメインにおいてR299SおよびR314S突然変異を含む。

【 0 0 8 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号：42において示されるアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチド鎖である。配列番号：42のペプチド鎖は、配列番号：2の野生型hBMP-7前駆ペプチド鎖から得られた。配列番号：42のペプチド鎖は、H258R、R299S、R314S、R421E、N422DおよびR426E突然変異を含有する。

【 0 0 8 7 】

本発明の1つの実施態様は、本発明のペプチド鎖をコードしている核酸配列を含んでなる単離核酸である。そのような核酸は、当該技術分野において周知の、標準的インビトロもしくはインビボ法、またはそのような方法の組み合わせ法を使用して生成されてもよい。そのような核酸は、本発明のペプチド鎖のアミノ酸をコードしている代替コドン、あるいは本発明のペプチド鎖のアミノ酸をコードしている生物体に最適化されたコドンを含んでもよい。

【 0 0 8 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号：3において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である(p3105; R299S/R314S)。

【 0 0 8 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号：5において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号：7において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 1 】

本発明のその他の態様は、配列番号：9において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 2 】

本発明のその他の態様は、配列番号：11において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号：13において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号：15において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号：17において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号：19において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号：21において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 8 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 3 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 0 9 9 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 5 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 0 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 7 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 1 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 2 9 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 2 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 1 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 3 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 3 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 4 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 5 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 5 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 7 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 6 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 3 9 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 7 】

本発明のその他の態様は、配列番号： 4 1 において示される核酸配列を含んでなる単離核酸である。

【 0 1 0 8 】

本発明のその他の実施態様は、本発明のペプチド鎖を細胞に与えることを含む、TGF- β 誘導細胞増殖を抑制する方法である。本発明のペプチド鎖は、例えば、真核細胞である細胞に与えられてもよい。本発明のペプチド鎖は、そのような分子を細胞に与えるいかなる技術によっても投与することができる。ペプチド鎖は、例えば、ペプチド鎖またはそのペプチド鎖をコードしている核酸鎖を培養培地に補足することによってインビトロで細胞に与えられてもよい。また、ペプチド鎖は、ペプチド鎖をコードしている核酸鎖を細胞中にトランスフェクトすることによって細胞に与えられてもよい。ペプチド鎖は、例えば、ペプチド鎖またはそのペプチド鎖をコードしている核酸を動物または組織中に静脈内注射することによってインビボで細胞に与えられてもよい。当業者は、本発明のペプチド鎖をインビトロまたはインビボで細胞に投与するための他の手段を認識できる。そのような手段はまた、以下に議論される、宿主に作用物を送達するそれらの方式を含む。

【 0 1 0 9 】

本発明のその他の実施態様は、hBMP-7応答症状を有する動物を同定し；そしてその病理学的症状を弱めるのに十分な量において、本発明のペプチド鎖を動物に投与すること；の段階を含む処置の方法である。hBMP-7活性応答性病理学的症状の例は、例えば、骨髄線維症、特発性肺線維症、腎性骨形成異常、糖尿病性腎症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)および変形性関節症を含む。

【 0 1 1 0 】

本発明の処置の方法は、いかなる分類に属する動物患者をも処置するために使用されて

10

20

30

40

50

もよい。そのような動物の例は、ヒト、齧歯類、イヌ、ネコおよび農場動物のような哺乳類、ならびに鳥類、爬虫類および魚類のような他の動物類を含む。

【 0 1 1 1 】

本発明のペプチド鎖の治療学的使用のための投与方式は、ペプチド鎖を宿主に送達するいかなる適当な経路であってもよい。本発明のペプチド鎖および核酸鎖は、非経口投与、すなわち、皮下、筋肉内、皮内、静脈内または鼻内投与のために特に有用である。

【 0 1 1 2 】

本発明のペプチド鎖および核酸は、製薬学的に許容できる担体中の有効成分としてペプチド鎖または核酸の有効量を含有する製薬学的組成物として製造されてもよい。ペプチド鎖または核酸を、好ましくは生理学的 pH において緩衝化されて、注射のための即時使用形態物中に含有する水性懸濁剤または液剤が好適である。非経口投与のための組成物は、通常には、製薬学的に許容できる担体、好ましくは水性担体中に溶解された本発明のアンタゴニストまたはその混合物の溶液を含むであろう。種々の水性担体が用いられる、例えば、0.4%食塩水、0.3%グリシンなど。これらの液剤は無菌であり、一般に、特定の物質を含有しない。これらの液剤は、慣用の、周知の無菌化技術（例えば、濾過）によって無菌化されてもよい。組成物は、pH調節剤および緩衝剤などのような生理学的状態に近づけるために要求される製薬学的に許容できる補助物質を含有してもよい。そのような製薬学的調合物における本発明のペプチド鎖または核酸鎖の濃度は、広範に、すなわち、重量で約0.5%未満、通常は約1%または少なくとも約1%から15または20%位の多くまで変えることができ、そして主として、選ばれる特定の投与方式にしたがって、液体容量、粘度などに基づいて選択できる。

【 0 1 1 3 】

かくして、筋肉内注射のための製薬学的組成物は、1mlの無菌緩衝水、および本発明のペプチド鎖または核酸の約1ng～約100mg、例えば、約50ng～約30mg、またはより好ましくは約5mg～約25mgを含有するように製造されてもよい。同様に、静脈内注入のための本発明の製薬学的組成物は、無菌リンゲル液の約250ml、および本発明のアンタゴニストの約1mg～約30mg、好ましくは5mg～約25mgを含有するように作成されてもよい。非経口に投与される組成物を製造する実際の方法は周知であり、そして例えば、“Remington's Pharmaceutical Science”, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PAにおいてより詳細に記述されている。

【 0 1 1 4 】

本発明のペプチド鎖および核酸は、製薬学的調製物中では、単位用量形態物において存在してもよい。適当な治療学的に有効な用量は当業者によって容易に決定することができる。決定された用量は、必要であれば、処置期間中医者によって適当であると選ばれた適当な時間間隔で反復されてもよい。

【 0 1 1 5 】

本発明のペプチド鎖または核酸は貯蔵のために凍結乾燥され、そして使用前に適当な担体において再構成されてもよい。この技術は、慣用のタンパク質および免役グロブリン調製物について有効であることが分かっており、そして技術的に既知の凍結乾燥および再構成技術が用いられてもよい。

【 0 1 1 6 】

本発明のその他の実施態様は、本発明の少なくとも1種の核酸を含んでなるベクターである。そのようなベクターは、本発明の核酸が細胞、動物または他の核酸複製系および発現系、例えばインビトロの転写および翻訳系中に導入されるのを可能にする。例えば、本発明のベクターは、単独でも合わされても、本発明の核酸が細胞または他の系中に導入されるのを可能にするトランスポゾン、プラスミド、ウイルスまたは染色体の部分を含んでもよい。広範なそのようなベクターは当業者にとっては周知である。

【 0 1 1 7 】

本発明のその他の実施態様は、本発明のベクターを含む宿主細胞である。そのような宿

10

20

30

40

50

主細胞は、真核細胞、細菌細胞、植物細胞または古細菌 (archaeal) 細胞であってもよい。代表的な真核細胞は、哺乳類、昆虫類、鳥類または他の動物起源のものであってもよい。代表的な哺乳類真核細胞系は、HEK-293 (American Type Culture Collection, Manassas, VA; ATCC^(R) Number: CRL-1573TM) 細胞系である。他の有用な細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、例えば CHO-K1 (ATCC^(R) Number: CRL-61TM) およびラット骨肉腫 (ROS) 細胞、例えば ROS 27/2.8 細胞由来の細胞系を含む。また哺乳類真核細胞は、ハイブリドーマのような不死化細胞系または SP2/0 (ATCC^(R) Number: CRL-1581TM)、NSO (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, UCACC No. 85110503)、FO (ATCC^(R) Number: CRL-1646TM) および Ag 653 (ATCC^(R) Number: CRL-1580TM) マウス細胞系のような骨髓腫細胞系を含む。代表的なヒト骨髓腫細胞系は U266 (ATCC^(R) Number: CRL-TIB-196TM) である。

【0118】

本発明のその他の実施態様は、本発明の宿主細胞を培養し、そして宿主細胞によって生産されたペプチド鎖を回収することを含む、ペプチド鎖を作成する方法である。当該技術分野において周知の標準細胞培養および酵素学的方法が使用されて、本発明の宿主細胞が培養され、そしてそのような宿主細胞によって生産されたペプチド鎖を回収することができる。

【0119】

本発明のその他の実施態様は、発現系において配列番号：36 および配列番号：38 のペプチド鎖を共発現させ、そして ROS 17/2.8 細胞においてアルカリホスファターゼ活性を増大することができるペプチド鎖を回収することを含む、ペプチド鎖を作成する方法である。本発明の方法において有用な発現系は、例えば、インビトロの共役された転写および翻訳系、あるいは細胞または他の発現系、例えば動物または植物であってもよい。

【0120】

hBMP-7 成熟形態物活性は、hBMP-7 の成熟形態物により処置されたラット骨肉腫 17/2.8 (ROS 17/2.8) 細胞におけるアルカリホスファターゼ活性の増大について、無処置の対照 ROS 17/2.8 細胞と比較してアッセイすることによって決定できる。ROS 17/2.8 細胞においてアルカリホスファターゼ活性を増大することができるペプチド鎖は、hBMP-7 活性を有する。ROS 17/2.8 細胞を使用するアルカリホスファターゼに基づく hBMP-7 アッセイは、当該技術分野において周知の標準細胞培養および酵素学的方法、例えば、Mallikaraj et al., Growth Factors, 112(3): 227-234 (1994) によって記述される方法を使用して実施されてもよい。また、当業者は、hBMP-7 活性についてのそのようなアッセイが使用されて、本発明の組成物および方法の生物学的活性および効果がまた確認されてもよいことを認識できる。

【0121】

本発明は、ここに、次に示す特定の、限定されるものではない実施例を引用して記述される。

【実施例 1】

【0122】

プラスミド DNA により一過性にトランスフェクトされた哺乳動物細胞における hBMP-7 変異体の発現

hBMP-7 変異体タンパク質は、各変異体のヘキサヒスチジン・タグ形態物をコードしているプラスミド DNA により一過性にトランスフェクトされた哺乳動物 HEK-293 細胞において組み換え技術を用いて発現された (図 1)。HEK-293 細胞 (ATCC^(R) Number: CRL-1573TM) が、標準培養条件および方法を使用して拡大

10

20

30

40

50

された。細胞は、標準トランスフェクション法を使用して p 3 1 0 5、p 3 1 0 6、p 3 1 0 7 および p 3 1 0 8 により一過性にトランスフェクトされた。また H E K - 2 9 3 細胞は、対照として p 3 1 0 4 により一過性にトランスフェクトされた。

【 0 1 2 3 】

p 3 1 0 4 対照ベクターは、野生型 h B M P - 7 前駆タンパク質（配列番号：2）をコードしている c D N A（配列番号：1）を含有する。p 3 1 0 5 ベクターは、R 2 9 9 S / R 3 1 4 S h B M P - 7 変異体タンパク質（配列番号：4）をコードしている c D N A（配列番号：3）を含有する。p 3 1 0 6 ベクターは、S 2 9 3 - R 2 9 9 / R 3 1 4 S h B M P - 7 変異体タンパク質（配列番号：6）をコードしている c D N A（配列番号：5）を含有する。p 3 1 0 7 ベクターは、S 2 9 3 - R 3 1 4 h B M P - 7 変異体タンパク質（配列番号：8）をコードしている c D N A（配列番号：7）を含有する。p 3 1 0 8 ベクターは、S 2 9 3 - M 3 1 5 h B M P - 7 変異体タンパク質（配列番号：10）をコードしている c D N A（配列番号：9）を含有する。これらのベクターの各々では、野生型または変異体 h B M P - 7 c D N A が、ヘキサヒスチジン・タグをコードしている c D N A に対してその 3' 末端において枠内に融合される。その結果、これらのベクターによって発現されるタンパク質は、それらのカルボキシ末端においてすべてヘキサヒスチジン・タグを付加される。

10

【 0 1 2 4 】

細胞培養上澄液がトランスフェクション後に回収され、そしてヘキサヒスチジン・タグ付加タンパク質が、T a l o nTM固定化金属アフィニティークロマトグラフィー樹脂（C l o n t e c h , I n c . , M o u n t a i n V i e w , C A）を使用して上澄液から精製された。T a l o nTM樹脂を使用するヘキサヒスチジン精製および上澄液の調製は、製造者によって指示されたように実施された。次に、h B M P - 7 に特異的な標準サンドイッチ型 E L I S A が、得られるサンプルに関して実施された（図 2）。この型の E L I S A は、すべての細胞タイプ（例えば、C H O - K 1）による h B M P - 7 変異体の発現を確認するために使用することができる。また、ポジティブ対照 E L I S A が精製された野生型 h B M P - 7 サンプルに関して実施された。アッセイデータは、相対光単位（R e l a t i v e L i g h t U n i t s）（R L U） マイナス バックグラウンド発光（図 2；Y 軸） 対 T a l o nTM樹脂精製タンパク質の濃度（図 2；X 軸）において表される。

20

30

【 0 1 2 5 】

E L I S A データは、全 h B M P - 7 変異体が、一過性にトランスフェクトされたベクター D N A から哺乳動物 H E K - 2 9 3 細胞において発現されたことを示している。重要なことには、標準的方法を使用する N 末端配列決定分析は、配列番号：2 の S 2 9 3 が成熟形態 h B M P - 7 の形成のために必要なアミノ末端切断部位であることを例証した。

【 0 1 2 6 】

本発明は、ここに、完全に記述されたので、多くの変更および修飾が、付随する請求項の精神または範囲から逸脱することなく、それに対して作成できることは、当業者にとって明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

40

【 0 1 2 7 】

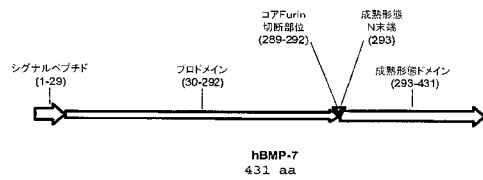
【図 1】野生型 h B M P - 7 前駆体アミノ酸配列および h B M P - 7 アミノ酸配列の特徴マップを示す。下線をされた太いテキストは成熟 h B M P - 7 のアミノ末端を指す。

【図 2】サンドイッチ型 E L I S A によってアッセイされるような、p 3 1 0 4、p 3 1 0 5、p 3 1 0 6、p 3 1 0 7 および p 3 1 0 8 によってコードされた h B M P - 7 変異体の発現を示す。

【図 1】

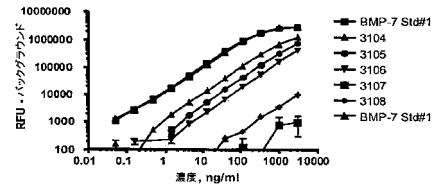
Fig. 1

10 20 30 40 50 60
MHVRSRLRAAA PHSFVALWAP LFLRLSALAD FSLDNEVHSS FIIHRLRSQE RREMQREILS
70 80 90 100 110 120
ILGLPHRPRP HLQGGKINSAP MFMLDLYNAM AVEEGGGPGG QGFSYPYKAV FSTQGPPLAS
130 140 150 160 170 180
LQDSHFLTDA DMVMSFVNLV EHDKEFFHPR YHHREFRFDL SKIPEGEAVT AAEFRYYKDY
190 200 210 220 230 240
IRERFDNETF RISVYQVLQE HLGRESDFL LDSRTLWASE EGWLVDITA TSNHWVVNPR
250 260 270 280 290 300
HNLGLQLSVE TLDGQSINPK LAGLGRHGP QNKQPFMVAF FKATEVHFRS IRSTGSKQRS
310 320 330 340 350 360
QNRSKTPKNQ EALRMANVAE NSSSDQRQAC KKHELYVSFR DLGWQDWIA PEGYAAYYCE
370 380 390 400 410 420
GECAPPLNSY MNATNHAIVQ TLVHFINPET VPKPCCAPTQ LNAISVLYFD DSSNVILKKY
430
RNMVVRACGC H



【図 2】

Fig. 2



【配列表】

0005100662000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

(72)発明者 ルオ, ジェフリー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 5 5 マルバーン・ニツカーボツカーレーン 4 6

(72)発明者 ミルズ, ジュリアン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 8 6 ウオリングフオード・カメロンドライブ 1 1 9

(72)発明者 スウエンキ - アンダーウツド, ベサニー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 2 5 チェスターズプリングス・フレンチクリークレーン 6
0 3

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 1 4 0 3 7 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 0 0 / 0 2 0 5 9 1 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 0 5 / 0 9 7 8 2 5 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

UniProt/GeneSeq

WPIDS(STN)

PubMed