

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7231411号

(P7231411)

(45)発行日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(24)登録日 令和5年2月20日(2023.2.20)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

N Z N A

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 P

7/06

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 1 1

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N

33/68

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N

33/53

D

請求項の数 74 (全144頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-565674(P2018-565674)

(86)(22)出願日 平成29年6月13日(2017.6.13)

(65)公表番号 特表2019-519546(P2019-519546
A)

(43)公表日 令和1年7月11日(2019.7.11)

(86)国際出願番号 PCT/IB2017/053507

(87)国際公開番号 WO2017/216724

(87)国際公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

審査請求日 令和2年6月9日(2020.6.9)

(31)優先権主張番号 62/350,257

(32)優先日 平成28年6月15日(2016.6.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 504389991

ノバルティス アーゲー

スイス国 パーゼル リヒトシュトラッセ
3 5

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100095360

弁理士 片山 英二

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100181168

弁理士 丸山 智裕

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 コン, フェン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 骨形成タンパク質6 (B M P 6) の阻害剤を使用して疾患を処置する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

治療有効量の B M P 6 アンタゴニストを含む医薬組成物であって、
選択的に、

i . B M P 6 を阻害すること、

i i . 血清鉄レベル、トランスフェリン飽和度 (T A S T)、網状赤血球ヘモグロビン
含量 (C H r)、網状赤血球カウント、赤血球カウント、ヘモグロビンもしくはヘマトク
リットを上昇させること、

i i i . ヘプシジンの活性またはレベルを低減すること、

i v . 貧血を処置すること、または

v . ヘモグロビンレベルを上昇させるかもしくは維持すること

を、それを必要とする患者において行う方法において、選択的に、5 0 0 n g / m L から
2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する前記患者からの血清試料に基づき、前記
患者に投与されるものであり、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および
H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L
C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および
H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L

C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

10

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、

20

医薬組成物。

【請求項 2】

貧血を有する患者を B M P 6 アンタゴニストで処置するための、治療有効量の B M P 6 アンタゴニストを含む医薬組成物であって、選択的に、5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する前記患者からの血清試料に基づき、前記患者に投与されるものであり、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

30

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

40

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L

50

C D R 2 配列および L C D R 3 配列
を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、
医薬組成物。

【請求項 3】

選択的に、貧血を有する患者を B M P 6 アンタゴニストで処置するための、治療有効量の B M P 6 アンタゴニストを含む医薬組成物であって、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

10

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

20

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

30

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片であり、

i) 前記患者からの血清試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、

i i) その後、5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記血清試料に基づき、選択的に、前記医薬組成物を前記患者に投与するステップと

を含む方法において前記患者に投与される、

医薬組成物。

【請求項 4】

選択的に、貧血を有する患者を B M P 6 アンタゴニストで処置するための、治療有効量の B M P 6 アンタゴニストを含む医薬組成物であって、

40

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L

50

C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片であり、

i) 前記患者からの血清試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、

i i) その後、5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記血清試料に基づき、前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置のために前記患者を選択するステップと、

i i i) その後、前記医薬組成物を前記患者に投与するステップと

を含む方法において前記患者に投与される、

医薬組成物。

【請求項 5】

貧血を有する患者の処置のための医薬組成物の調製における B M P 6 アンタゴニストの使用であって、前記医薬組成物は治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストを含み、前記患者からの血清試料は 5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有し、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C

10

20

30

40

50

D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、
使用。

【請求項 6】

貧血を有する患者の処置のための医薬組成物の調製における B M P 6 アンタゴニストの使用であって、

前記患者は、5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する前記患者からの血清試料に基づき、前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置のために選択され、

前記医薬組成物は治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストを含み、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、
使用。

【請求項 7】

貧血を有する患者の処置のための医薬組成物の調製における B M P 6 アンタゴニストの使用であって、

前記患者からの血清試料は、フェリチンについてアッセイされ、

前記医薬組成物は治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストを含み、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および

H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

10

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

20

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片であり、

前記患者は 5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する、使用。

【請求項 8】

貧血を有する患者の処置のための医薬組成物の調製における B M P 6 アンタゴニストの使用であって、

前記患者からの血清試料は、フェリチンについてアッセイされ、

前記患者は、5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記血清試料に基づき、前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置のために選択され、

30

前記医薬組成物は治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストを含み、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

40

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

50

(g) それぞれ配列番号 9、10 および 11 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 19、20 および 21 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 12、13 および 14 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 22、23 および 24 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、
使用。

【請求項 9】

貧血を有する患者が B M P 6 アンタゴニストによる処置に応答する可能性を予測するためのデータを取得する方法であって、前記患者からの血清試料をフェリチンについてアッセイするステップを含み、500 ng / mL から 2000 ng / mL のフェリチンレベルは、前記患者が前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置に応答する上昇した可能性を示し、
前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 69、70 および 71 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 79、80 および 81 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 72、73 および 74 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 82、83 および 84 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 29、30 および 31 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 39、40 および 41 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 32、33 および 34 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 42、43 および 44 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 49、50 および 51 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 59、60 および 61 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 52、53 および 54 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 62、63 および 64 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、10 および 11 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 19、20 および 21 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 12、13 および 14 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 22、23 および 24 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、
方法。

【請求項 10】

前記フェリチンレベルは、フェリチンタンパク質レベルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記アッセイするステップは、イムノアッセイ、免疫組織化学、E L I S A、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、H P L C および質量分析からなる群から選択される技法を含む、請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記フェリチンレベルは、フェリチンタンパク質レベルである、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記アッセイするステップは、イムノアッセイ、免疫組織化学、E L I S A、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、H P L Cおよび質量分析からなる群から選択される技法を含む、請求項 7 または 8 に記載の使用。

【請求項 14】

B M P 6 アンタゴニストによる処置に対する、貧血を有する患者の応答性を予測するための伝達可能な形態の情報を生成する方法であって、

i) 前記患者からの血清試料における 5 0 0 n g / m L から 2 0 0 0 n g / m L のフェリチンレベルの存在に基づき、前記患者が前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置に応答する上昇した可能性を決定するためのデータを取得するステップと、

i i) 前記データを、伝達に使用するための有形または無形の媒体形態に記録するステップとを含み、

前記 B M P 6 アンタゴニストは、

(a) それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(b) それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む抗 B M P 6 抗体又はその抗原結合性断片である、方法。

【請求項 15】

前記貧血は、慢性疾患に関連する貧血である、請求項 1 ~ 4、1 0 および 1 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記慢性疾患は、慢性腎臓病、癌または炎症である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記患者は、赤血球生成刺激剤 (E S A) で処置されるかまたは処置されている、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1、1 5 および 1 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記 E S A は、エリスロポエチン (E P O) である、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記貧血は、EPO低応答性貧血である、請求項1～4、10、11および15～18のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項20】

前記貧血は、鉄欠乏性貧血、例えば機能的鉄欠損性貧血である、請求項1～4、10、11および15～19のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項21】

前記患者は、慢性血液透析患者である、請求項1～4、10、11および15～20のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項22】

前記治療有効量の前記BMP6アンタゴニストによる処置の非存在下におけるEPO要求用量および/または鉄要求用量と比べて、前記患者の鉄要求用量が低減されるか、前記患者のEPO要求用量が低減されるか、または前記患者の鉄要求用量および前記患者のEPO要求用量の両方が低減される、請求項1～4、10、11および15～21のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項23】

前記抗BMP6抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号75のVH配列、
- (b) 配列番号35のVH配列、
- (c) 配列番号55のVH配列、または
- (d) 配列番号15のVH配列

20

を含む、請求項1～4、10、11および15～22のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項24】

前記抗BMP6抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号85のVL配列、
- (b) 配列番号45のVL配列、
- (c) 配列番号65のVL配列、または
- (d) 配列番号25のVL配列

を含む、請求項1～4、10、11および15～23のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項25】

前記抗BMP6抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号75のVH配列および配列番号85のVL配列、
- (b) 配列番号35のVH配列および配列番号45のVL配列、
- (c) 配列番号55のVH配列および配列番号65のVL配列、または
- (d) 配列番号15のVH配列および配列番号25のVL配列

30

を含む、請求項1～4、10、11および15～24のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項26】

前記抗BMP6抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号77の重鎖配列、
- (b) 配列番号37の重鎖配列、
- (c) 配列番号57の重鎖配列、または
- (d) 配列番号17の重鎖配列

40

を含む、請求項1～4、10、11および15～25のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項27】

前記抗BMP6抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号87の軽鎖配列、
- (b) 配列番号47の軽鎖配列、
- (c) 配列番号67の軽鎖配列、または
- (d) 配列番号27の軽鎖配列

を含む、請求項1～4、10、11および15～26のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項28】

50

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
 (a) 配列番号 7 7 の重鎖配列および配列番号 8 7 の軽鎖配列、
 (b) 配列番号 3 7 の重鎖配列および配列番号 4 7 の軽鎖配列、
 (c) 配列番号 5 7 の重鎖配列および配列番号 6 7 の軽鎖配列、または
 (d) 配列番号 1 7 の重鎖配列および配列番号 2 7 の軽鎖配列
 を含む、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
 a) 1 n M 以下の K D でヒト B M P 6 に結合するか、または
 b) 0 . 1 n M 以下の K D でヒト B M P 6 に結合する、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および
 1 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3 0】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
 a) ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 7 の少なくとも約 1 0 0 倍のアフィニティを有し、
 b) ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 2、ヒト B M P 5 またはヒト B M P 7 の少なくとも約 1 0 0 倍のアフィニティを有し、
 c) ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 2、ヒト B M P 5 またはヒト B M P 7 の少なくとも約 5 0 0 倍のアフィニティを有し、および / または
 d) E L I S A においてヒト B M P 2 および / または B M P 7 に対する検出可能な結合を有しない、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 3 1】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、I g M および I g G から選択されるスクヤフォールドを含む、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、I g G 1、I g G 2 および I g G 3 または I g G 4 から選択される I g G である、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 3 3】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F a b および s c F v からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、免疫コンジュゲートの成分である、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、F c 領域の突然変異を通して、改変されたエフェクター機能を有する、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 3 6】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、配列 Q T L V H L M N P E Y V P K P (配列番号 9 8) を含むヒト B M P 6 エピトープに結合する、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 0 0 1 m g / k g ~ 0 . 1 m g / k g の範囲の用量で投与される、請求項 1 ~ 4、1 0、1 1 および 1 5 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

50

前記抗体またはその抗原結合性断片は、 0.001 mg/kg 、 0.0016 mg/kg 、 0.0025 mg/kg 、 0.0040 mg/kg 、 0.0063 mg/kg 、 0.01 mg/kg 、 0.016 mg/kg 、 0.025 mg/kg 、 0.040 mg/kg 、 0.063 mg/kg または 0.1 mg/kg の用量で投与される、請求項1～4、10、11および15～37のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項39】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、前記患者に2回以上投与される、請求項1～4、10、11および15～38のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項40】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、

a) 静脈内、または

b) 皮下

に投与される、請求項1～4、10、11および15～39のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項41】

前記投与は、約30～約60分間の期間にわたる注入によるものである、請求項40に記載の医薬組成物。

【請求項42】

前記フェリチンレベルは、 1900 ng/mL 以下、 1800 ng/mL 以下、 1700 ng/mL 以下、 1600 ng/mL 以下、 1500 ng/mL 以下、 1400 ng/mL 以下、 1300 ng/mL 以下、 1200 ng/mL 以下、 1100 ng/mL 以下または 1000 ng/mL 以下である、請求項1～4、10、11および15～41のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項43】

前記フェリチンレベルは、 500 ng/mL から 1500 ng/mL である、請求項1～4、10、11および15～41のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項44】

前記フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上、 600 ng/mL 以上、 700 ng/mL 以上、 800 ng/mL 以上、 900 ng/mL 以上、 1000 ng/mL 以上、 1100 ng/mL 以上、 1200 ng/mL 以上、 1300 ng/mL 以上、 1400 ng/mL 以上、 1500 ng/mL 以上、 1600 ng/mL 以上、 1700 ng/mL 以上、 1800 ng/mL 以上または 1900 ng/mL 以上である、請求項1～4、10、11および15～41のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項45】

前記貧血は、慢性疾患に関連する貧血である、請求項5～8、12および13のいずれか一項に記載の使用。

【請求項46】

前記慢性疾患は、慢性腎臓病、癌または炎症である、請求項45に記載の使用。

【請求項47】

前記患者は、赤血球生成刺激剤(ESA)で処置されるかまたは処置されている、請求項5～8、12、13、45および46のいずれか一項に記載の使用。

【請求項48】

前記ESAは、エリスロポエチン(EPO)である、請求項47に記載の使用。

【請求項49】

前記貧血は、EPO低応答性貧血である、請求項5～8、12、13および45～48のいずれか一項に記載の使用。

【請求項50】

前記貧血は、鉄欠乏性貧血、例えば機能的鉄欠損性貧血である、請求項5～8、12、13および45～49のいずれか一項に記載の使用。

【請求項51】

10

20

30

40

50

前記患者は、慢性血液透析患者である、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 50 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 52】

前記治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置の非存在下における E P O 要求用量および / または鉄要求用量と比べて、前記患者の鉄要求用量が低減されるか、前記患者の E P O 要求用量が低減されるか、または前記患者の鉄要求用量および前記患者の E P O 要求用量の両方が低減される、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 51 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 53】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
(a) 配列番号 75 の V H 配列、
(b) 配列番号 35 の V H 配列、
(c) 配列番号 55 の V H 配列、または
(d) 配列番号 15 の V H 配列
を含む、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 52 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 54】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
(a) 配列番号 85 の V L 配列、
(b) 配列番号 45 の V L 配列、
(c) 配列番号 65 の V L 配列、または
(d) 配列番号 25 の V L 配列
を含む、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 53 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 55】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
(a) 配列番号 75 の V H 配列および配列番号 85 の V L 配列、
(b) 配列番号 35 の V H 配列および配列番号 45 の V L 配列、
(c) 配列番号 55 の V H 配列および配列番号 65 の V L 配列、または
(d) 配列番号 15 の V H 配列および配列番号 25 の V L 配列
を含む、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 54 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 56】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
(a) 配列番号 77 の重鎖配列、
(b) 配列番号 37 の重鎖配列、
(c) 配列番号 57 の重鎖配列、または
(d) 配列番号 17 の重鎖配列
を含む、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 55 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 57】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
(a) 配列番号 87 の軽鎖配列、
(b) 配列番号 47 の軽鎖配列、
(c) 配列番号 67 の軽鎖配列、または
(d) 配列番号 27 の軽鎖配列
を含む、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 56 のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項 58】

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、
(a) 配列番号 77 の重鎖配列および配列番号 87 の軽鎖配列、
(b) 配列番号 37 の重鎖配列および配列番号 47 の軽鎖配列、
(c) 配列番号 57 の重鎖配列および配列番号 67 の軽鎖配列、または
(d) 配列番号 17 の重鎖配列および配列番号 27 の軽鎖配列
を含む、請求項 5 ～ 8、12、13 および 45 ～ 57 のいずれか一項に記載の使用。

50

【請求項 59】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- a) 1 nM 以下の KD でヒト BMP 6 に結合するか、または
- b) 0.1 nM 以下の KD でヒト BMP 6 に結合する、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 58 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 60】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- a) ヒト BMP 6 に対して、ヒト BMP 7 の少なくとも約 100 倍のアフィニティを有し、
- b) ヒト BMP 6 に対して、ヒト BMP 2、ヒト BMP 5 またはヒト BMP 7 の少なくとも約 100 倍のアフィニティを有し、
- c) ヒト BMP 6 に対して、ヒト BMP 2、ヒト BMP 5 またはヒト BMP 7 の少なくとも約 500 倍のアフィニティを有し、および / または
- d) ELISA においてヒト BMP 2 および / または BMP 7 に対する検出可能な結合を有しない、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 59 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 61】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、IgM および IgG から選択される スキャフォールドを含む、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 60 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 62】

20

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、IgG1、IgG2 および IgG3 または IgG4 から選択される IgG である、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 61 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 63】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fab および scFv からなる群から選択される、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 62 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 64】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、免疫コンジュゲートの成分である、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 63 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 65】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、Fc 領域の突然変異を通して、改変されたエフェクター機能を有する、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 64 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 66】

前記抗 BMP 6 抗体またはその抗原結合性断片は、配列 Q T L V H L M N P E Y V P K P (配列番号 98) を含むヒト BMP 6 エピトープに結合する、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 65 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 67】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、0.001 mg/kg ~ 0.1 mg/kg の範囲の用量で投与される、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 66 のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項 68】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、0.001 mg/kg、0.0016 mg/kg、0.0025 mg/kg、0.0040 mg/kg、0.0063 mg/kg、0.01 mg/kg、0.016 mg/kg、0.025 mg/kg、0.040 mg/kg、0.063 mg/kg または 0.1 mg/kg の用量で投与される、請求項 5 ~ 8、12、13 および 45 ~ 67 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 69】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、前記患者に 2 回以上投与される、請求項 5 ~ 8

50

、 12、13および45～68のいずれか一項に記載の使用。

【請求項70】

前記抗体またはその抗原結合性断片は、

a) 静脈内、または

b) 皮下

に投与される、請求項5～8、12、13および45～69のいずれか一項に記載の使用。

【請求項71】

前記投与は、約30～約60分間の期間にわたる注入によるものである、請求項70に記載の使用。

【請求項72】

前記フェリチンレベルは、1900 ng/mL以下、1800 ng/mL以下、1700 ng/mL以下、1600 ng/mL以下、1500 ng/mL以下、1400 ng/mL以下、1300 ng/mL以下、1200 ng/mL以下、1100 ng/mL以下または1000 ng/mL以下である、請求項5～8、12、13および45～71のいずれか一項に記載の使用。

【請求項73】

前記フェリチンレベルは、500 ng/mLから1500 ng/mLである、請求項5～8、12、13および45～71のいずれか一項に記載の使用。

【請求項74】

前記フェリチンレベルは、500 ng/mL以上、600 ng/mL以上、700 ng/mL以上、800 ng/mL以上、900 ng/mL以上、1000 ng/mL以上、1100 ng/mL以上、1200 ng/mL以上、1300 ng/mL以上、1400 ng/mL以上、1500 ng/mL以上、1600 ng/mL以上、1700 ng/mL以上、1800 ng/mL以上または1900 ng/mL以上である、請求項5～8、12、13および45～71のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットにより電子的に提出され、参照により全体的に本明細書に組み込まれる配列表を含む。2017年5月23日に作成された前記ASCIIコピーは、PAT057354-WO-PCT__SL.txtという名称であり、82,879バイトのサイズである。

【0002】

本発明は、骨形成タンパク質6 (BMP6) の阻害剤を使用して貧血を処置する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

貧血は、慢性腎疾患 (CKD) を伴う患者における有病率が高く、生活の質の低下ならびに循環器疾患および死を含む転帰不良の危険性の増大と関連する。CKDを伴う患者における貧血管理のいくつかの方式は、赤血球生成刺激剤 (ESA)、経口鉄および静脈内鉄の補充ならびに輸血の使用を伴う。しかし、多くの患者は、これらの処置に十分に応答せず、またはより高用量のESAおよび/もしくは鉄を必要とする。高用量の鉄は、酸素ラジカルおよびアレルギー反応の発生と関連する毒性も引き起こし得る。これらの処置は、貧血の基礎原因、すなわち鉄吸収および体内貯蔵部からの鉄移動の機能障害に十分に対処しないため、有効性を欠く場合がある。

【0004】

エリスロポエチン抵抗性を管理しようとする試みは、現在、高用量の非経口鉄の共投与により実施されている。しかし、静脈内調製物に由来する大半の鉄は、マクロファージによりまず処理され、赤血球生成のためのその活用は、フェロポルチンにより媒介される鉄

10

20

30

40

50

移出に依存する。

【 0 0 0 5 】

多くの貧血患者では、フェロポルチンにより媒介される鉄移出は、高レベルのヘプシジンにより抑制される。さらなる証拠は、ヘプシジンレベルの増大が血液透析時の E S A 応答性の不良と相関することを示唆する。したがって、ヘプシジン降下剤は、この患者集団および鉄欠乏により特徴付けられる慢性疾患性貧血 (A C D) の他の形態における E S A 不応性貧血を改善するために有効な戦略であり得る。

【 0 0 0 6 】

したがって、循環ヘプシジンレベルを低下させる方法は、鉄吸収を増強し、隔離された鉄の放出を容易にし、慢性腎疾患患者に存在する E S A 不応性貧血における赤血球生成を促進するはずである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

貧血と関連する疾患および障害を処置するための現行の処置選択肢にもかかわらず、有効でありかつ良好に忍容される改善された貧血の処置方法が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

フェリチンは、貯蔵鉄を示す細胞内タンパク質である。フェリチンレベルは、体内に貯蔵されている鉄の総量の間接的な指標として使用することができる。理論に束縛されるものではないが、B M P 6 の阻害剤は、細胞、例えばマクロファージおよび / または腸細胞からの貯蔵鉄の放出をもたらし得ると考えられる。やはり理論に束縛されるものではないが、本発明は、B M P 6 の阻害剤が高いフェリチン、例えば血清フェリチンのレベル (例えば、5 0 0 n g / m L を超える処置前のフェリチンレベル) を有し、したがって高貯蔵鉄を有する患者において、隔離された鉄に関連する状態、例えば貧血の処置に有効であり得るという発見に部分的に基づいている。

【 0 0 0 9 】

第 1 の態様では、本発明は、選択的に、

- a . B M P 6 を阻害すること、
- b . 血清鉄レベル、トランスフェリン飽和度 (T A S T) 、網状赤血球ヘモグロビン含量 (C H r) 、網状赤血球カウント、赤血球カウント、ヘモグロビンもしくはヘマトクリットを上昇させること、
- c . ヘプシジンの活性またはレベルを低減すること、
- d . 貧血を処置すること、または
- e . ヘモグロビンレベルを上昇させるかもしくは維持すること

を、それを必要とする患者において行う方法であって、選択的に、2 0 0 0 n g / m L 以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、治療有効量の B M P 6 アンタゴニストを患者に投与するステップを含む方法に関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、5 0 0 n g / m L 以上である。

【 0 0 1 0 】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者を B M P 6 アンタゴニストで処置する方法であって、選択的に、2 0 0 0 n g / m L 以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、治療有効量の B M P 6 アンタゴニストを患者に投与するステップを含む方法に関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、5 0 0 n g / m L 以上である。

【 0 0 1 1 】

別の態様では、本発明は、選択的に、貧血を有する患者を B M P 6 アンタゴニストで処置する方法であって、

- a) 患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
- b) その後、選択的に、治療有効量の B M P 9 アンタゴニストを患者に投与するステップ

であって、フェリチンレベルは、 2000 ng/mL 以下である、ステップとを含む方法に関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上である。

【0012】

別の態様では、本発明は、選択的に、貧血を有する患者をBMP6アンタゴニストで処置する方法であって、

a) 患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、 2000 ng/mL 以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、BMP6アンタゴニストによる処置のために患者を選択するステップと、
c) その後、治療有効量のBMP9アンタゴニストを患者に投与するステップとを含む方法に関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上である。

10

【0013】

別の態様では、本発明は、選択的に、

a. BMP6を阻害すること、
b. 血清鉄レベル、トランスフェリン飽和度(TASST)、網状赤血球ヘモグロビン含量(CHr)、網状赤血球カウント、赤血球カウント、ヘモグロビンもしくはヘマトクリットを上昇させること、
c. ヘプシジンの活性またはレベルを低減すること、
d. 貧血を処置すること、または
e. ヘモグロビンレベルを上昇させるかもしくは維持すること
を、それを必要とする患者において行う方法であって、選択的に、 500 ng/mL 以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、治療有効量のBMP6アンタゴニストを患者に投与するステップを含む方法に関する。

20

【0014】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者をBMP6アンタゴニストで処置する方法であって、選択的に、 500 ng/mL 以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、治療有効量のBMP6アンタゴニストを患者に投与するステップを含む方法に関する。

【0015】

30

別の態様では、本発明は、選択的に、貧血を有する患者をBMP6アンタゴニストで処置する方法であって、

a) 患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、選択的に、治療有効量のBMP9アンタゴニストを患者に投与するステップであって、フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上である、ステップとを含む方法に関する。

【0016】

別の態様では、本発明は、選択的に、貧血を有する患者をBMP6アンタゴニストで処置する方法であって、

a) 患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、 500 ng/mL 以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、BMP6アンタゴニストによる処置のために患者を選択するステップと、
c) その後、治療有効量のBMP9アンタゴニストを患者に投与するステップとを含む方法に関する。

40

【0017】

前述の態様のいずれかを含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、フェリチンタンパク質レベルである。

【0018】

前述の態様のいずれかを含む複数の実施形態では、アッセイするステップは、免疫アッセイ、免疫組織化学、ELISA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、HP

50

ＬＣおよび質量分析からなる群から選択される技法を含む。

【００１９】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、２０００ｎｇ／ｍＬ以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、５００ｎｇ／ｍＬ以上である。

【００２０】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、５００ｎｇ／ｍＬ以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。

10

【００２１】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、

a) 患者は、２０００ｎｇ／ｍＬ以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、ＢＭＰ６アンタゴニストによる処置のために選択されることと、

b) その後、治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、５００ｎｇ／ｍＬ以上である。

20

【００２２】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、

a) 患者は、５００ｎｇ／ｍＬ以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、ＢＭＰ６アンタゴニストによる処置のために選択されることと、

b) その後、治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。

【００２３】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、

a) 患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、

b) 治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、２０００ｎｇ／ｍＬ以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、選択的に患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、５００ｎｇ／ｍＬ以上である。

30

【００２４】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、

a) 患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、

b) 治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、５００ｎｇ／ｍＬ以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、選択的に患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。

40

【００２５】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のためのＢＭＰ６アンタゴニストにおいて、

a) 患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、

b) 患者は、２０００ｎｇ／ｍＬ以下のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、ＢＭＰ６アンタゴニストによる処置のために選択されることと、

c) 治療有効量のＢＭＰ６アンタゴニストは、選択的に患者に投与されることを特徴とする、ＢＭＰ６アンタゴニストに関する。複数の実施形態では、フェリチンレベ

50

ルは、500 ng / mL 以上である。

【0026】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者の処置における使用のための BMP 6 アンタゴニストにおいて、

- a) 患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、
 - b) 患者は、500 ng / mL 以上のフェリチンレベルを有する患者からの生物学的試料に基づき、BMP 6 アンタゴニストによる処置のために選択されることと、
 - c) 治療有効量の BMP 6 アンタゴニストは、選択的に患者に投与されることと
- を特徴とする、BMP 6 アンタゴニストに関する。

【0027】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者が BMP 6 アンタゴニストによる処置に
10 応答する可能性を予測する方法であって、患者からの生物学的試料をフェリチンについてア
ッセイするステップを含み、2000 ng / mL 以下のフェリチンレベルは、患者が BMP
6 アンタゴニストによる処置に
20 応答する上昇した可能性を示す、方法に関する。複数の
実施形態では、フェリチンレベルは、500 ng / mL 以上である。

【0028】

別の態様では、本発明は、貧血を有する患者が BMP 6 アンタゴニストによる処置に
20 応答する可能性を予測する方法であって、患者からの生物学的試料をフェリチンについてア
ッセイするステップを含み、500 ng / mL 以上のフェリチンレベルは、患者が BMP
6 アンタゴニストによる処置に
20 応答する上昇した可能性を示す、方法に関する。

【0029】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、方法また
は使用は、患者から生物学的試料を得るステップをさらに含み、得るステップは、アッセ
イするステップの前に実施される。

【0030】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチ
ンレベルは、フェリチンタンパク質レベルである。

【0031】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、アッセイ
するステップは、イムノアッセイ、免疫組織化学、ELISA、フローサイトメトリー、
ウェスタンブロット、HPLC および質量分析からなる群から選択される技法を含む。

【0032】

別の態様では、本発明は、BMP 6 アンタゴニストによる処置に対する、貧血を有する
患者の応答性を予測するための伝達可能な形態の情報を生成する方法であって、

- a) 患者からの生物学的試料における 2000 ng / mL 以下のフェリチンレベルの存在
に基づき、患者が BMP 6 アンタゴニストによる処置に
40 応答する上昇した可能性を決定す
るステップと、
- b) 決定するステップの結果を、伝達に使用するための有形または無形の媒体形態に記録
するステップと

を含む方法を提供する。複数の実施形態では、フェリチンレベルは、500 ng / mL 以
上である。

【0033】

別の態様では、本発明は、BMP 6 アンタゴニストによる処置に対する、貧血を有する
患者の応答性を予測するための伝達可能な形態の情報を生成する方法であって、

- a) 患者からの生物学的試料における 500 ng / mL 以上のフェリチンレベルの存在に
に基づき、患者が BMP 6 アンタゴニストによる処置に
50 応答する上昇した可能性を決定す
るステップと、
- b) 決定するステップの結果を、伝達に使用するための有形または無形の媒体形態に記録
するステップと

を含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、患者は、貧血を有する。複数の実施形態では、貧血は、慢性疾患に関連する貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患、癌または炎症である。

【 0 0 3 5 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、患者は、赤血球生成刺激剤（E S A）、例えばエリスロポエチン（E P O）で処置されるかまたは処置されている。

【 0 0 3 6 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、貧血は、E P O低応答性貧血である。

10

【 0 0 3 7 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、貧血は、鉄欠乏性貧血、例えば機能的鉄欠乏性貧血である。

【 0 0 3 8 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、患者は、慢性血液透析患者である。

【 0 0 3 9 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、方法または使用は、治療有効量のB M P 6アンタゴニストによる処置の非存在下におけるE P O要求用量および/または鉄要求用量と比べて、患者の鉄要求用量を低減するか、患者のE P O要求用量を低減するか、または患者の鉄要求用量および患者のE P O要求用量の両方を低減するステップをさらに含む。前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、方法または使用は、患者のE S A抵抗性指数（E R I）の低下をさらに含むかまたはそれをもたらす。

20

【 0 0 4 0 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、生物学的試料は、滑液、血液、血清、糞便、血漿、尿、涙液、唾液、脳脊髄液、白血球試料または組織試料である。

【 0 0 4 1 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、生物学的試料は、血清または血液である。

30

【 0 0 4 2 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、生物学的試料は、血清である。

【 0 0 4 3 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、B M P 6アンタゴニストは、B M P 6結合性分子である。

【 0 0 4 4 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、B M P 6アンタゴニストは、抗B M P 6抗体またはその抗原結合性断片、例えば表1または表14に記載されるものである。

40

【 0 0 4 5 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗B M P 6抗体またはその抗原結合性断片は、

（a）それぞれ配列番号69、70および71のH C D R 1配列、H C D R 2配列およびH C D R 3配列、ならびにそれぞれ配列番号79、80および81のL C D R 1配列、L C D R 2配列およびL C D R 3配列、

（b）それぞれ配列番号72、73および74のH C D R 1配列、H C D R 2配列およびH C D R 3配列、ならびにそれぞれ配列番号82、83および84のL C D R 1配列、L

50

C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(c) それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(d) それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

10

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む。

20

【 0 0 4 6 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 7 5 の V H 配列、

(b) 配列番号 3 5 の V H 配列、

(c) 配列番号 5 5 の V H 配列、または

(d) 配列番号 1 5 の V H 配列

を含む。

【 0 0 4 7 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

30

(a) 配列番号 8 5 の V L 配列、

(b) 配列番号 4 5 の V L 配列、

(c) 配列番号 6 5 の V L 配列、または

(d) 配列番号 2 5 の V L 配列

を含む。

【 0 0 4 8 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 7 5 の V H 配列および配列番号 8 5 の V L 配列、

40

(b) 配列番号 3 5 の V H 配列および配列番号 4 5 の V L 配列、

(c) 配列番号 5 5 の V H 配列および配列番号 6 5 の V L 配列、または

(d) 配列番号 1 5 の V H 配列および配列番号 2 5 の V L 配列

を含む。

【 0 0 4 9 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 7 7 の重鎖配列、

(b) 配列番号 3 7 の重鎖配列、

(c) 配列番号 5 7 の重鎖配列、または

50

(d) 配列番号 1 7 の重鎖配列を含む。

【 0 0 5 0 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号 8 7 の軽鎖配列、
- (b) 配列番号 4 7 の軽鎖配列、
- (c) 配列番号 6 7 の軽鎖配列、または
- (d) 配列番号 2 7 の軽鎖配列

を含む。

10

【 0 0 5 1 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号 7 7 の重鎖配列および配列番号 8 7 の軽鎖配列、
- (b) 配列番号 3 7 の重鎖配列および配列番号 4 7 の軽鎖配列、
- (c) 配列番号 5 7 の重鎖配列および配列番号 6 7 の軽鎖配列、または
- (d) 配列番号 1 7 の重鎖配列および配列番号 2 7 の軽鎖配列

を含む。

【 0 0 5 2 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、1 n M 以下の K D でヒト B M P 6 に結合する。

20

【 0 0 5 3 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 1 n M 以下の K D でヒト B M P 6 に結合する。

【 0 0 5 4 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはそれらの抗原結合性断片は、ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 7 の少なくとも約 1 0 0 倍のアフィニティーを有する。

【 0 0 5 5 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはそれらの抗原結合性断片は、ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 2、ヒト B M P 5 またはヒト B M P 7 の少なくとも約 1 0 0 倍のアフィニティーを有する。

30

【 0 0 5 6 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはそれらの抗原結合性断片は、ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 2、ヒト B M P 5 またはヒト B M P 7 の少なくとも約 5 0 0 倍のアフィニティーを有する。

【 0 0 5 7 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、E L I S A においてヒト B M P 2 および / またはヒト B M P 7 に対する検出可能な結合を有しない。

40

【 0 0 5 8 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、I g M および I g G から選択される スクヤフォールドを含む。

【 0 0 5 9 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、I g G 1、I g G 2 および I g G 3 または I g G 4 から選択される I g G である。

【 0 0 6 0 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P

50

6 抗体またはその抗原結合性断片は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F a b および s c F v からなる群から選択される。

【 0 0 6 1 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、免疫コンジュゲートの成分である。

【 0 0 6 2 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、F c 領域の突然変異を通して、改変されたエフェクター機能を有する。

【 0 0 6 3 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、配列 Q T L V H L M N P E Y V P K P (配列番号 9 8) を含む、例えばそれからなるヒト B M P 6 エピトープに結合する。

【 0 0 6 4 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 0 0 1 m g / k g ~ 0 . 1 m g / k g の範囲の用量で投与される。

【 0 0 6 5 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 0 0 6 3 ~ 0 . 1 m g / k g の範囲の用量で投与される。

【 0 0 6 6 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 0 0 1 m g / k g 、 0 . 0 0 1 6 m g / k g 、 0 . 0 0 2 5 m g / k g 、 0 . 0 0 4 0 m g / k g 、 0 . 0 0 6 3 m g / k g 、 0 . 0 1 m g / k g 、 0 . 0 1 6 m g / k g 、 0 . 0 2 5 m g / k g 、 0 . 0 4 0 m g / k g 、 0 . 0 6 3 m g / k g または 0 . 1 m g / k g の用量で投与される。

【 0 0 6 7 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、静脈内または皮下に投与される。

【 0 0 6 8 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、静脈内投与される。

【 0 0 6 9 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、投与は、約 3 0 ~ 約 6 0 分間の期間にわたる注入による。

【 0 0 7 0 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、1 9 0 0 n g / m L 以下、1 8 0 0 n g / m L 以下、1 7 0 0 n g / m L 以下、1 6 0 0 n g / m L 以下、1 5 0 0 n g / m L 以下、1 4 0 0 n g / m L 以下、1 3 0 0 n g / m L 以下、1 2 0 0 n g / m L 以下、1 1 0 0 n g / m L 以下、1 0 0 0 n g / m L 以下、9 0 0 n g / m L 以下、8 0 0 n g / m L 以下、7 0 0 n g / m L 以下、6 0 0 n g / m L 以下または 5 0 0 n g / m L 以下である。

【 0 0 7 1 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、1 5 0 0 n g / m L 以下である。前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、1 0 0 0 n g / m L 以下である。

【 0 0 7 2 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、約 2 0 0 n g / m L 以上、約 2 5 0 n g / m L 以上、約 3 0 0 n g / m L 以上、約 3 5 0 n g / m L 以上、約 4 0 0 n g / m L 以上、約 4 5 0 n g / m L 以上、約 5

10

20

30

40

50

0 0 n g / m L 以上、約 6 0 0 n g / m L 以上、約 7 0 0 n g / m L 以上、約 8 0 0 n g / m L 以上、約 9 0 0 n g / m L 以上、約 1 0 0 0 n g / m L 以上、約 1 1 0 0 n g / m L 以上、約 1 2 0 0 n g / m L 以上、約 1 3 0 0 n g / m L 以上、約 1 4 0 0 n g / m L 以上、約 1 5 0 0 n g / m L 以上、約 1 6 0 0 n g / m L 以上、約 1 7 0 0 n g / m L 以上、約 1 8 0 0 n g / m L 以上または約 1 9 0 0 n g / m L 以上である。

【 0 0 7 3 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、約 5 0 0 n g / m L 以上、約 6 0 0 n g / m L 以上、約 7 0 0 n g / m L 以上、約 8 0 0 n g / m L 以上、約 9 0 0 n g / m L 以上、約 1 0 0 0 n g / m L 以上、約 1 1 0 0 n g / m L 以上、約 1 2 0 0 n g / m L 以上、約 1 3 0 0 n g / m L 以上または約 1 4 0 0 n g / m L 以上である。

10

【 0 0 7 4 】

前述の態様および実施形態のいずれかの実施形態を含む複数の実施形態では、フェリチンレベルは、約 5 0 0 n g / m L 以上である。

【 0 0 7 5 】

定義

別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が関する技術分野の当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用される「BMP 6」は、タンパク質である骨形成タンパク質 6 (BMP 6) または BMP 6 をコードする遺伝子もしくは核酸を意味する。Hahn et al. 1992 Genomics 14:759-62; Sauermann et al. 1993 J. Neurosci. Res. 33:142-7; NCBI Gene ID: 654。BMP 6 は、BMP-6; VGR; VGR1; External ID: OMIM: 112266; MGI: 88182; HomoloGene: 1300; GeneCards: BMP6 Gene としても公知である。オーソログ: 種: ヒト: Entrez: 654; Ensembl: ENSG00000153162; UniProt: P22004; RefSeq (mRNA): NM_001718; RefSeq (タンパク質): NP_001709; 場所 (UCSC): 第 6 染色体: 7.73 ~ 7.88 Mb; 種: マウス: Entrez: 12161; Ensembl: ENSMUSG00000039004; UniProt: P20722; RefSeq (mRNA): NM_007556; RefSeq (タンパク質): NP_031582; 場所 (UCSC): 第 13 染色体: 38.35 ~ 38.5 Mb。本明細書に記載される通り、BMP 6 に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、BMP 6 タンパク質に結合する。

20

30

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される「BMP 2」は、タンパク質である骨形成タンパク質 2 (BMP 2) または BMP 2 をコードする遺伝子もしくは核酸を意味する。BMP 2 は、BDA2; および BMP2A; External ID: OMIM: 112261; MGI: 88177; HomoloGene: 926; GeneCards: BMP2 Gene としても公知である。種: ヒト: Entrez: 650; Ensembl: ENSG00000125845; UniProt: P12643; RefSeq (mRNA): NM_001200; RefSeq (タンパク質): NP_001191; 場所 (UCSC): 第 20 染色体: 6.75 ~ 6.76 Mb。種: マウス: Entrez: 12156; Ensembl: ENSMUSG00000027358; UniProt: P21274; RefSeq (mRNA): NM_007553; RefSeq (タンパク質): NP_031579; 場所 (UCSC): 第 2 染色体: 133.55 ~ 133.56 Mb。本明細書に記載される通り、BMP 2 に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、BMP 2 タンパク質に結合する。

40

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用される「BMP 5」は、タンパク質である骨形成タンパク質 5 (BMP

50

5) または BMP 5 をコードする遺伝子もしくは核酸を意味する。BMP 5 は、MGC 34244; External ID: OMIM: 112265; MGI: 88181; Homologene: 22412; GeneCards: BMP5 Gene としても公知である。種: ヒト: Entrez: 653; Ensembl: ENSG00000112175; UniProt: P22003; RefSeq (mRNA): NM_021073; RefSeq (タンパク質): NP_066551; 場所 (UCSC): 第6染色体: 55.62 ~ 55.74 Mb。種: マウス: Entrez: 12160; Ensembl: ENSMUSG00000032179; UniProt: P49003; RefSeq (mRNA): NM_007555; RefSeq (タンパク質): NP_031581; 場所 (UCSC): 第9染色体: 75.78 ~ 75.9 Mb。本明細書に記載される通り、BMP 5 に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、BMP 5 タンパク質に結合する。

10

【0079】

本明細書で使用される「BMP 7」は、タンパク質である骨形成タンパク質 7 (BMP 7) または BMP 7 をコードする遺伝子もしくは核酸を意味する。BMP 7 は、骨形成タンパク質 - 1 (OP - 1); OP - 1; External ID: OMIM: 112267; MGI: 103302; Homologene: 20410; GeneCards: BMP7 Gene としても公知である。種: ヒト: Entrez: 655; Ensembl: ENSG00000101144; UniProt: P18075; RefSeq (mRNA): NM_001719; RefSeq (タンパク質): NP_001710; 場所 (UCSC): 第20染色体: 55.74 ~ 55.84 Mb。種: マウス: Entrez: 12162; Ensembl: ENSMUSG00000008999; UniProt: P23359; RefSeq (mRNA): NM_007557; RefSeq (タンパク質): NP_031583; 場所 (UCSC): 第2染色体: 172.87 ~ 172.94 Mb。本明細書に記載される通り、BMP 7 に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、BMP 7 タンパク質に結合する。

20

【0080】

「ヘプシジン」は、ペプチドホルモンである遺伝子ヘプシジンまたはタンパク質ヘプシジンを意味する。ヘプシジンは、HAMP (ヘプシジン抗微生物タンパク質またはヘプシジン抗微生物ペプチド); HEPC; HFE2B; LEAP1 (LEAP - 1); PLTR; OMIM: 606464; Homologene: 81623; GeneCards: HAMP Gene; Entrez: 57817; Ensembl: ENSG00000105697; UniProt: P81172; RefSeq (mRNA): NM_021175; RefSeq (タンパク質): NP_066998; 場所 (UCSC): 第19染色体: 35.77 ~ 35.78 Mb としても公知である。Krause et al. FEBS Lett. 480: 147 - 150; および Pigeon et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 7811 - 9。また、Ganz 2003 Blood 102: 783 - 8; Roy et al. 2005 Curr. Opin. Hemat. 12: 107 - 111; Fleming et al. 2006 Semin. Liver Dis. 25: 411 - 9; Park et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 7806 - 10; Majore et al. 2002 Haematologica 87: 221 - 2; Kluver et al. 2002 J. Pept. Res. 59: 241 - 8; Hunter et al. 2002 J. Biol. Chem. 277: 37597 - 603; Weinstein et al. 2003 Blood 100: 3776 - 81; Nemeth et al. 2003 Blood 101: 2461 - 3; Roetto et al. 2003 Nat. Genet. 33: 21 - 2; Strausberg et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899 - 903; Gehrke et al. 2003 Blood 102: 371 - 6; Merryweather - Clarke et al. 2004 Human Mol. Genet. 12: 2241 - 7; Clark et al.

30

40

50

. 2003 Genome Res. 13: 2265 - 70; Roetto et al. 2004 Blood 103: 2407 - 9; Jacolot et al. 2004 Blood 103: 2835 - 40; および Ota et al. 2004 Nat. Genet. 36: 40 - 45 も参照されたい。

【0081】

本明細書で使用される「BMP6 アンタゴニスト」は、(例えば、BMP6 の BMP6 受容体への結合を遮断することにより) BMP6 機能、発現および/またはシグナル伝達に拮抗する(例えば、低減する、阻害する、減少させる、遅延させる)ことができる分子を指す。BMP6 アンタゴニストの非限定的な例には、BMP6 結合性分子および BMP6 受容体結合性分子が含まれる。開示された方法、レジメン、キット、過程、使用および組成物のいくつかの実施形態では、BMP6 アンタゴニストが利用される。

10

【0082】

本明細書で使用される「BMP6 結合性分子」は、単独でまたは他の分子と会合してヒト BMP6 抗原に結合することができる任意の分子を指す。結合反応は、例えば、結合アッセイ、競合アッセイもしくは BMP6 受容体への BMP6 結合の阻害を決定するためのバイオアッセイ、または無関係の特異性を有するが、理想的には同じアイソタイプの抗体が使用される陰性対照試験に関する任意の種類の結合アッセイを含む標準的な方法(定性的アッセイ)によって示され得る。BMP6 結合性分子の非限定的な例には、小分子、BMP6 受容体デコイ、ならびに B 細胞もしくはハイブリドーマによって産生される BMP6 に結合する抗体およびキメラ抗体、CDR グラフト抗体もしくはヒト抗体またはそれらの任意の断片、例えば F(ab')₂ および Fab 断片、ならびに単鎖または単ドメイン抗体が含まれる。好ましくは、BMP6 結合性分子は、BMP6 機能、発現および/またはシグナル伝達に拮抗する(例えば、低減する、阻害する、減少させる、遅延させる)。開示された方法、レジメン、キット、過程、使用および組成物のいくつかの実施形態では、BMP6 結合性分子が利用される。

20

【0083】

「BMP6 受容体結合性分子」は、単独でまたは他の分子と会合してヒト BMP6 受容体に結合することができる任意の分子を意味する。結合反応は、例えば、結合アッセイ、競合アッセイもしくは BMP6 への BMP6 受容体結合の阻害を決定するためのバイオアッセイ、または無関係の特異性を有するが、理想的には同じアイソタイプの抗体が使用される陰性対照試験に関する任意の種類の結合アッセイを含む標準的な方法(定性的アッセイ)によって示され得る。BMP6 受容体結合性分子の非限定的な例には、小分子、BMP6 デコイ、ならびに B 細胞もしくはハイブリドーマによって産生される BMP6 受容体に対する抗体およびキメラ抗体、CDR グラフト抗体もしくはヒト抗体またはそれらの任意の断片、例えば F(ab')₂ および Fab 断片、ならびに単鎖または単ドメイン抗体が含まれる。好ましくは、BMP6 受容体結合性分子は、BMP6 機能、発現および/またはシグナル伝達に拮抗する(例えば、低減する、阻害する、減少させる、遅延させる)。開示された方法、レジメン、キット、過程、使用および組成物のいくつかの実施形態では、BMP6 受容体結合性分子が利用される。

30

【0084】

本明細書で使用される「貧血」は、血液中の赤血球の数の減少またはヘモグロビンもしくは鉄の量の減少を意味し、酸素を搬送する血液の能力の低下を伴う。

40

【0085】

本明細書で互換的に使用される「EPO 抵抗性指数」または「ERI」は、ヘモグロビンレベルの関数としての ESA (例えば、EPO) 用量(体重 1 kg 当たりの単位)の変化を意味する。複数の実施形態では、ESA 用量/ヘモグロビンレベルは、毎週測定される。複数の実施形態では、ESA 用量/ヘモグロビンレベルは、毎月測定される。複数の実施形態では、ESA 用量/ヘモグロビンレベルは、ERI に到達するために複数回の測定にわたって比較される。

【0086】

50

貧血は、非限定的な例として、男性では約 $130 \sim 140 \text{ g/L}$ ($13 \sim 14 \text{ g/dL}$) 未満のヘモグロビンに基づき、女性では約 $120 \sim 130 \text{ g/L}$ ($12 \sim 13 \text{ g/dL}$) 未満のヘモグロビンに基づく方法を含む、当技術分野で公知の任意の方法を使用して診断することができる。Janz et al., 2013 Emerg. Med. Pract. 15: 1 - 15; および Smith 2010 Am. J. Man. Care 16 Supp. S59 - 66。

【0087】

本明細書で使用する「BMP6抗体」、「抗ヒトBMP6抗体」、「BMP6結合性抗体」、「BMP6アンタゴニスト抗体」（およびこれらの抗原結合性断片）などの用語は、タンパク質であるBMP6に結合する抗体（およびそれらの抗原結合性断片）を含む。

10

【0088】

本明細書で使用する「抗体」、「その抗原結合性断片」、「抗原結合性部分」などの用語は、全抗体および任意のその抗原結合性断片（すなわち「抗原結合性部分」）または単鎖を含む。天然の「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重（H）鎖と2つの軽（L）鎖とを含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略記する）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメインであるCH1、CH2およびCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略記する）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメインであるCLを含む。VH領域およびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称するより保存的な領域を散在させた、相補性決定領域（CDR）と称する超可変性の領域へさらに細分することができる。各VHおよび各VLは、アミノ末端からカルボキシ末端へ以下の順序で配置される3つのCDRおよび4つのFR：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4からなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、宿主組織または免疫系の多様な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1の成分（C1q）を含む因子への結合を媒介し得る。

20

【0089】

本明細書で使用する抗体の「抗原結合性断片」、「その抗原結合性断片」、「抗原結合性部分」などの用語は、所与の抗原（例えば、BMP6）に特異的に結合する能力を保持するインタクト抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合性機能は、インタクトな抗体の断片により果たされ得る。抗体の「抗原結合性部分」という用語内に包含される結合性断片の例は、Fab断片、VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインからなる一価断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab)₂断片；VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；抗体の単一のアームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片；VHドメインからなる単ドメイン抗体（dAb）断片（Ward et al., 1989 Nature 341: 544 - 546）；ならびに単離相補性決定領域（CDR）を含む。

30

【0090】

さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLドメインおよびVHドメインは、個別の遺伝子によりコードされるが、組換え法を使用してそれらを単一のタンパク質鎖として作製することを可能にする人工のペプチドリinkerにより付着することができ、この場合、VL領域およびVH領域は、対合して一価分子（単鎖Fv（scFv））として公知であり、例えばBird et al., 1988 Science 242: 423 - 426；およびHouston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879 - 5883を参照されたい）を形成する。このような単鎖抗体は、抗体の1つまたは複数の「抗原結合性部分」を含む。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技法を使用して得られ、断片もインタクトな抗体と同様に有用性についてスクリーニングされる。

40

【0091】

50

抗原結合性部分は、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、 v -NARおよびbis-scFv（例えば、Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136を参照されたい）へ組み込むこともできる。抗体の抗原結合性部分は、III型フィブロネクチン（Fn3）などのポリペプチド（フィブロネクチンポリペプチドモノボディについて記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）に基づくスキャフォールドヘグラフトすることができる。

【0092】

抗原結合性部分は、相補的な軽鎖ポリペプチドと併せて抗原結合性領域の対を形成するタンデムFvセグメント（VH-CH1-VH-CH1）の対を含む単鎖分子へ組み込むことができる（Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10): 1057-1062; および米国特許第5,641,870号明細書）。

10

【0093】

本明細書で使用される「アフィニティー」という用語は、単一の抗原性部位における抗体と抗原との間の相互作用の強度を指す。各抗原性部位内では、抗体「アーム」の可変領域は、多数の部位において、弱い非共有結合的力を介して抗原と相互作用し、相互作用が大きいほどアフィニティーが強くなる。

【0094】

本明細書で使用される「アビディティー」という用語は、抗体-抗原複合体の、全体的な安定性または強度についての有益な尺度を指す。アビディティーは、3つ主要な因子：抗体エピトープのアフィニティー；抗原および抗体の両方の価数；ならびに相互作用部分の構造的配置により制御される。最終的に、これらの因子は、抗体の特異性、すなわち特定の抗体が正確な抗原エピトープに結合する可能性を規定する。

20

【0095】

「アミノ酸」という用語は、自然発生のアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに自然発生のアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体も指す。自然発生のアミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるアミノ酸、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、ガンマ-カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリンでもある。アミノ酸類似体は、自然発生のアミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムに結合したアルファ炭素を有する化合物を指す。このような類似体は、修飾R基（例えば、ノルロイシン）または修飾ペプチド骨格を有するが、自然発生のアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造と異なる構造を有するが、自然発生のアミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

30

【0096】

本明細書で使用される「結合特異性」という用語は、1つの抗原決定基のみと反応する個別の抗原結合部位の能力を指す。抗体の結合性部位は、分子のFab部分内に位置し、重鎖および軽鎖の超可変領域から構築される。抗体の結合アフィニティーは、単一の抗原決定基と、抗体上の単一の結合性部位との反応の強度である。結合特異性は、抗原決定基と、抗体の結合性部位との間に作用する引力および斥力の合計である。

40

【0097】

2つの実体間の特異的結合は、平衡定数（ K_A または K_A ）が少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ または $10^{11} M^{-1}$ である結合を意味する。抗体（例えば、BMP6結合性抗体）に「特異的（または選択的）に結合する」という語句は、タンパク質および他の生物製剤の異質な集団内におけるコグネイト抗原（例えば、ヒトBMP6タンパク質）の存在を決定する結合反応を指す。上記で言及した平衡定数（ K_A ）に加えて、本発明のBMP6結合性抗体は、典型的に、約 $1 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 以下の解離速度定数（ K_d 、または K_D 、または K_D ）も有し、BMP6に、非特異的抗原（例えば、BMP2、BMP5またはBMP7）への結合についての

50

そのアフィニティーの少なくとも 2 倍のアフィニティーで結合する。本明細書では、「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」という語句は、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用する。

【0098】

2 つの実体間の特異的結合は、平衡定数 (K_A) (k_{on}/k_{off}) が少なくとも $10^2 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、少なくとも $10^3 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、少なくとも $10^4 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{15} M^{-1}$ または少なくとも $5 \times 10^{15} M^{-1}$ である結合を意味する。

【0099】

「キメラ抗体」(またはその抗原結合性断片)という用語は、(a) 抗原結合性部位(可変領域)を、クラス、エフェクター機能および/もしくは種が異なるか、またはクラス、エフェクター機能および/もしくは種を改変された定常領域、あるいはキメラ抗体に新たな特性を付与する全く異なる分子、例えば酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などに連結するように定常領域またはその一部を改変するか、置き換えるか、または交換した抗体分子(またはその抗原結合性断片);あるいは(b) 可変領域またはその一部を、抗原特異性が異なるか、または抗原特異性を改変された可変領域により改変するか、置き換えるか、またはそれと交換した抗体分子(またはその抗原結合性断片)を指す。例えば、マウス抗体は、その定常領域をヒト免疫グロブリンに由来する定常領域で置き換えることにより修飾することができる。ヒト定常領域による置き換えに起因して、キメラ抗体は、ヒトにおける抗原性を元のマウス抗体と比較して低減しながら、抗原の認識におけるその特異性を保持し得る。

【0100】

「保存的に修飾された変異体」という用語は、アミノ酸配列および核酸配列のいずれにも適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異体は、同一のアミノ酸配列もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝子コードの縮重性のために、多数の機能的に同一の核酸が所与の任意のタンパク質をコードする。例えば、コドンである G C A、G C C、G C G および G C U のいずれも、アミノ酸であるアラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより指定されるあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを改変せずに、コドンを、記載された対応するコドンのいずれかへ改変することができる。このような核酸変異は、保存的に修飾された変異の 1 種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする本明細書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレント変異についても記載する。当業者は、核酸内の各コドン(通常、メチオニンのみのコドンである A U G および通常、トリプトファンのみのコドンである T G G を除く)を修飾して機能的に同一の分子をもたらし得ることを認識するであろう。したがって、記載される各配列内では、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が含意されている。

【0101】

ポリペプチド配列では、「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸の、化学的に類似するアミノ酸による置換を結果としてもたらし、ポリペプチド配列への個別の置換、欠失または付加を含む。当技術分野では、機能的に類似するアミノ酸を提示する保存的置換表が周知である。このような保存的に修飾された変異体は、本発明の多型変異体、種間相同体および対立遺伝子に追加されるものであり、これらを除外するものではない。以下の 8

つの群：１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；４）アルギニン（Ｒ）、リシン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；７）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；および８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）は、互いに対して保存的置換であるアミノ酸を含有する（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい）。一実施形態では、「保存的配列修飾」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴にそれほど大きい影響を及ぼしたりそれを改変したりしないアミノ酸修飾を指すのに使用する。

【０１０２】

本明細書で使用する「遮断する」という用語は、相互作用または過程を停止させるかまたは阻止すること、例えばリガンド依存的なシグナル伝達またはリガンド非依存的なシグナル伝達を停止させることを指す。

【０１０３】

本明細書で使用する「認識する」という用語は、そのコンフォメーションエピトープを見出し、それと相互作用する（例えば、結合する）抗体、その抗原結合性断片を指す。

【０１０４】

本明細書では、「交差遮断する」、「交差遮断された」、「交差遮断すること」、「競合する」、「交差競合する」という用語および類縁の用語は、標準的な競合的結合アッセイにおいて、他の抗体または結合剤のＢＭＰ６への結合に干渉する抗体または他の結合剤の能力を意味するように互換的に使用される。

【０１０５】

抗体または他の結合剤が、別の抗体または結合性分子のＢＭＰ６への結合に干渉することが可能な能力または程度は、標準的な競合結合アッセイを使用して決定することができ、したがって、本発明に従い、抗体または他の結合剤が交差遮断すると言われ得るかどうか標準的な競合結合アッセイを使用して決定することができる。１つの適切なアッセイは、表面プラズモン共鳴技術を使用して相互作用の程度を測定することができるＢiacore技術の使用を伴う（例えば、BIACORE 3000装置（Biacore、Uppsala、Sweden）を使用することにより）。交差遮断を測定するための別のアッセイは、ＥＬＩＳＡベースの手法を使用する。

【０１０６】

「中和する」という用語は、抗体がその標的に結合すると標的の活性、レベルまたは安定性を低減すること、例えば、ＢＭＰ６抗体が、ＢＭＰ６に結合するとシグナル伝達またはヘプシジンレベルおよび貧血におけるその役割などのＢＭＰ６の活性、レベルまたは安定性を少なくとも部分的に低減することにより、ＢＭＰ６を中和することを意味する。

【０１０７】

「エピトープ」という用語は、抗体への特異的な結合が可能なタンパク質決定基を意味する。エピトープは、通例、アミノ酸または糖側鎖などの化学的に活性な表面分子群からなり、通例、特異的な三次元構造特徴および特異的な電荷特徴も有する。コンフォメーションエピトープと非コンフォメーションエピトープとは、前者への結合が変性溶媒の存在下で失われるが、後者への結合が失われない点で区別される。

【０１０８】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンへの特異的な結合が可能であるか、または分子と他に相互作用することが可能である任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、一般に、アミノ酸であるＢＭＰ６または炭水化物もしくは糖側鎖などの化学的に活性な表面分子群からなり、特異的な三次元構造特徴および特異的な電荷特徴も有し得る。エピトープは、「直鎖状」エピトープの場合もあり、「コンフォメーション」エピトープの場合もある。

【０１０９】

「直鎖状エピトープ」という用語は、タンパク質と、相互作用分子（抗体など）との相

10

20

30

40

50

相互作用点の全てを伴うエピトープが、タンパク質の一次（連続）アミノ酸配列に沿って直鎖状に生じることを指す。

【 0 1 1 0 】

本明細書で使用される I g G 抗体に対する「高アフィニティー」という用語は、標的抗原、例えば B M P 6 に対する K D が 10^{-8} M 以下、 10^{-9} M 以下、または 10^{-10} M、または 10^{-11} M 以下である抗体を指す。しかし、他の抗体アイソタイプに対する「高アフィニティー」結合は、変化し得る。例えば、I g M アイソタイプに対する「高アフィニティー」結合は、K D が 10^{-7} M 以下または 10^{-8} M 以下である抗体を指す。

【 0 1 1 1 】

本明細書で使用される「ヒト抗体」（またはその抗原結合性断片）という用語は、フレームワーク領域および C D R 領域のいずれもが、ヒト由来の配列に由来する可変領域を有する抗体（およびそれらの抗原結合性断片）を含むことを意図する。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域も、このようなヒト配列、例えばヒト生殖細胞系列配列またはヒト生殖細胞系列配列の突然変異させたバージョンに由来する。本発明のヒト抗体およびそれらの抗原結合性断片は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロにおけるランダム突然変異誘発もしくは部位特異的突然変異誘発により導入された突然変異、またはインビボにおける体細胞突然変異により導入された突然変異）を含み得る。

【 0 1 1 2 】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」（またはその抗原結合性断片）という語句は、実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または同じ遺伝子供給源に由来する抗体、抗体断片、二特異性抗体などを含むポリペプチドを指す。この用語は、単一の分子組成による抗体分子の調製物も含む。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性およびアフィニティーを提示する。

【 0 1 1 3 】

「ヒトモノクローナル抗体」（またはその抗原結合性断片）という用語は、単一の結合特異性を提示する抗体（およびそれらの抗原結合性断片）であって、フレームワーク領域および C D R 領域のいずれも、ヒト配列に由来する可変領域を有する、抗体（およびそれらの抗原結合性断片）を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞へ融合させた、ヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックの非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られる B 細胞を含むハイブリドーマにより作製する。

【 0 1 1 4 】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」（またはその抗原結合性断片）という語句は、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルである動物（例えば、マウス）またはそれにより調製されるハイブリドーマから単離される抗体、ヒト抗体を発現させるように形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクターマから単離される抗体、組換えのコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列の全部または一部の他の D N A 配列へのスブライシングを伴う、他の任意の手段により調製されるか、発現させるか、創出されるか、または単離される抗体など、組換え手段により調製されるか、発現させるか、創出されるか、または単離される全てのヒト抗体（およびそれらの抗原結合性断片）を含む。このような組換えヒト抗体は、フレームワーク領域および C D R 領域が、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。一実施形態では、このような組換えヒト抗体は、インビトロの突然変異誘発（またはヒト I g 配列についてトランスジェニックである動物を使用する場合、インビボの体細胞突然変異誘発）にかけることができ、したがって、組換え抗体の V H 領域および V L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列の V H 配列および V L 配列に由来し、これらに関連するが、インビボのヒト抗体の生殖細胞系列レパートリー内で天然に存在しない可能性がある配列である。

10

20

30

40

50

【0115】

本明細書で使用される「ヒト化」抗体（またはその抗原結合性断片）は、ヒトにおける免疫原性が小さいが、非ヒト抗体の反応性を保持する抗体（またはその抗原結合性断片）である。これは、例えば、非ヒトCDR領域を保持し、抗体の残りの部分をそれらのヒト対応物（すなわち可変領域の定常領域およびフレームワーク部分）で置き換えることにより達成することができる。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 - 6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65 - 92, 1988; Verhoeven et al., Science, 239: 1534 - 1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28: 489 - 498, 1991; および Padlan, Molec. Immun., 31: 169 - 217, 1994を参照されたい。ヒト操作技術の他の例は、米国特許第5,766,886号明細書において開示されているXoma技術を含むが、これらに限定されない。

10

【0116】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列に関連して、「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、2つ以上の配列または部分配列が同じであることを指す。以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して、または手作業のアライメントおよび目視により測定される比較域または指定領域にわたって最大の対応性について比較され、配列決定された場合の2つの配列の指定された百分率のアミノ酸残基またはヌクレオチドが同じである場合（すなわち指定される領域にわたるか、または指定されない場合には配列全体にわたる60%の同一性、任意選択で65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有する場合）、2つの配列は、「実質的に同一」である。任意選択で、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド（または10アミノ酸）の長さの領域にわたり、あるいはより好ましくは100～500または1000ヌクレオチド以上（または20、50、200もしくはそれを超えるアミノ酸）の長さの領域にわたり存在する。任意選択で、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド（または10アミノ酸）の長さの領域にわたり、あるいはより好ましくは100～500または1000ヌクレオチド以上（または20、50、200もしくはそれを超えるアミノ酸）の長さの領域にわたり存在する。

20

【0117】

配列比較では、典型的には、1つの配列は、それに照らして被験配列を比較する基準配列としての役割を果たす。配列比較アルゴリズムを使用する場合、被験配列および基準配列をコンピュータへ入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用することもでき、代替的なパラメータを指定することもできる。次いで、配列比較アルゴリズムにより、プログラムパラメータに基づき、被験配列について基準配列と比べた配列同一性パーセントを計算する。

30

【0118】

本明細書で使用される「比較域」は、2つの配列を最適に配列決定した後、配列を同じ数の連続的な位置による基準配列と比較し得る、20～600、通例、約50～約200、より通例では約100～約150からなる群から選択される連続的な位置の数のいずれか1つによるセグメントに対する言及を含む。当技術分野では、比較のための配列アライメント法が周知である。比較のための最適な配列アライメントは、例えば、SmithおよびWaterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482cによる局所相同性アルゴリズムにより行うこともでき、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970による相同性アライメントアルゴリズムにより行うこともでき、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988による類似性検索法により行うこともでき、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Comput

40

50

er Group、575 Science Dr., Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)により行うこともでき、手作業のアライメントおよび目視(例えば、Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringbouded., 2003)を参照されたい)により行うこともできる。

【0119】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するのに適するアルゴリズムの2つの例は、それぞれAltschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977;およびAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990において記載されているBLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムである。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationにより公表されている。このアルゴリズムは、データベース配列内の同じ長さのワードで配列決定したときに、ある正の値の閾値スコアTにマッチするかまたはそれを満たす、クエリー配列内の短いワード長Wを同定することにより、高スコア配列対(HSP)をまず同定することを伴う。Tは、隣接ワードスコア閾値(Altschul et al., 前出)と称される。これらの初期の隣接ワードヒットは、これらを含むより長いHSPを見出す検索を開始するためのシードとしての役割を果たす。累積アライメントスコアが増大し得る限り、ワードヒットは、各配列に沿っていずれの方向にも拡張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列ではパラメータM(マッチする残基の対についてのリワードスコア;常に>0)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア;常に<0)を使用して計算する。アミノ酸配列では、スコアリングマトリックスを使用して累積スコアを計算する。累積アライメントスコアが、達成されたその最大値から量Xだけ低下した場合;1つまたは複数の負スコア残基のアライメントの累積のために、累積スコアがゼロ以下に低下した場合;または配列のいずれかの末端に達した場合、各方向へのワードヒットの拡張を停止させる。BLASTアルゴリズムパラメータであるW、TおよびXにより、アライメントの感度および速度が決定される。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の場合)では、11のワード長(N)、期待値(E)または10、M=5、N=-4をデフォルトとして使用し、両方の鎖の比較を行う。アミノ酸配列のためのBLASTPプログラムでは、3のワード長および10の期待値(E)ならびに50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989を参照されたい)アライメント(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4をデフォルトとして使用し、両方の鎖の比較を行う。

【0120】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性についての統計学的解析(例えば、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993を参照されたい)も実施する。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間のマッチングが偶然に生じる確率の指標をもたらす最小合計確率(P(N))である。例えば、被験核酸を基準核酸に照らして比較したときの最小合計確率が約0.2未満であり、より好ましくは約0.01未満であり、最も好ましくは約0.001未満である場合、核酸は、基準配列と類似すると考えられる。

【0121】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120重み付け残基表、12のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用するALIGNプログラム(バージョン2.0)へ組込まれた、E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988)によるアルゴリズムを使用して決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセント

は、B l o s s o m 62マトリックスまたはP A M 250マトリックスおよび16、14、12、10、8、6または4のギャップ重み付け、ならびに1、2、3、4、5または6の長さ重み付けを使用する、G C Gソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能である)内のG A Pプログラムへ組み込まれた、N e e d l e m a n a n d W u n s c h (J . M o l , B i o l . 48: 444 - 453, 1970)によるアルゴリズムを使用しても決定することができる。

【0122】

上記で言及した配列同一性百分率以外の、2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることの別の指標は、下記で記載される通り、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドに対する抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、例えば2つのペプチドが保存的置換のみによって異なる場合、ポリペプチドは、典型的には、第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、下記で記載される通り、2つの分子またはそれらの相補体が厳密な条件下で互いにハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であることのさらに別の指標は、同じプライマーを使用して配列を増幅し得ることである。

10

【0123】

本明細書で使用される「単離抗体」(またはその抗原結合性断片)という用語は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体(またはその抗原結合性断片)を指す(例えば、B M P 6に特異的に結合する単離抗体は、B M P 6以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。さらに、単離抗体は、他の細胞内物質および/または化学物質を実質的に含まない場合もある。

20

【0124】

「アイソタイプ」という用語は、重鎖定常領域遺伝子によりもたらされる抗体クラス(例えば、I g M、I g E、I g G 1またはI g G 4などのI g G)を指す。アイソタイプは、これらのクラスの1つの修飾バージョンも含み、その修飾は、F c機能を改変する、例えばエフェクター機能またはF c受容体への結合を増強または低減するように施されている。

【0125】

本明細書で使用される「K a s s o c」、または「K a」、または「K A」、または「K_A」という用語は、特定の抗体-抗原間相互作用の会合速度を指すことを意図するのに対し、本明細書で使用される「K d i s」または「K d」という用語は、特定の抗体-抗原間相互作用の解離速度を指すことを意図する。一実施形態では、本明細書で使用される「K_D」という用語は、K dのK aに対する比(すなわちK d / K a)から得られる解離定数を指すことを意図し、モル濃度(M)として表される。抗体のK_D値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体のK_Dを決定する方法は、表面プラズモン共鳴を使用するか、またはB i a c o r e(登録商標)システムなどのバイオセンサーシステムを使用することによる。

30

【0126】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」(もしくはその抗原結合性断片)または「モノクローナル抗体(もしくはその抗原結合性断片)組成物」という用語は、単一の分子組成による抗体分子(またはその抗原結合性断片)の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性およびアフィニティを提示する。

40

【0127】

本明細書では、「核酸」という用語は、「ポリヌクレオチド」という用語と互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらの一本鎖形態または二本鎖形態におけるポリマーを指す。「核酸」という用語は、公知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基もしくは修飾連結を含有する核酸であって、合成の核酸、自然発生の核酸および非自然発生の核酸であり、基準核酸と同様の結合特性を有し、基準ヌクレ

50

オチドと同様に代謝される核酸を包含する。このような類似体の例は、限定なしに述べると、ホスホリチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2 - O - メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸 (PNA) を含む。

【0128】

別段に示されない限り、特定の核酸配列は、保存的に修飾されたその変異体 (例えば、縮重コドン置換) および相補的配列も暗示的に包含し、かつ明示的に示される配列も包含する。とりわけ、下記で詳述される通り、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された (または全ての) コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシノシン残基で置換された配列を作り出すことにより達成することができる (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; および Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994)。

10

【0129】

「作動可能に連結された」という用語は、2つ以上のポリヌクレオチド (例えば、DNA) セグメント間の機能的関係を指す。それは、典型的には、転写調節配列の、転写される配列に対する機能的関係を指す。例えば、プロモーター配列またはエンハンサー配列は、それが適切な宿主細胞内または他の発現系内のコード配列の転写を刺激またはモジュレートするとき、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、転写される配列に作動可能に連結されたプロモーター転写調節配列は、転写される配列と物理的に隣接し、すなわちシス作用型である。しかし、エンハンサーなどの一部の転写調節配列は、その転写をそれらが増強するコード配列に物理的に隣接する必要も近接して配置される必要もない。

20

【0130】

本明細書で使用される「最適化された」という用語は、ヌクレオチド配列を、産生細胞または産生物、一般に真核細胞、例えばピキア (Pichia) 属細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはヒト細胞において好ましいコドンを使用してアミノ酸配列をコードするように改変していることを意味する。最適化されたヌクレオチド配列は、「親」配列としても公知の出発ヌクレオチド配列により本来コードされるアミノ酸配列を完全にまたは可能な限り多く保持するように操作する。本明細書の最適化された配列は、哺乳動物細胞において好ましいコドンを有するように操作されている。しかし、本明細書では、他の真核細胞または原核細胞におけるこれらの配列の最適化された発現も企図される。最適化されたヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列も最適化されていると称する。

30

【0131】

本明細書では、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に使用される。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する自然発生のアミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに自然発生のアミノ酸ポリマーおよび非自然発生のアミノ酸ポリマーにも適用される。別段に示されない限り、特定のポリペプチド配列は、保存的に修飾されたその変異体も暗示的に包含する。

40

【0132】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」 (またはその抗原結合性断片) という用語は、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルである動物 (例えば、マウス) またはそれにより調製されるハイブリドーマから単離される抗体、ヒト抗体を発現させるように形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクターマから単離される抗体、組換えのコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列の全部または一部の他のDNA配列へのスブライシングを伴う、他の任意の手段により調製されるか、発現させるか、創出されるか、または単離される抗体など、組換え手段により調製されるか、発現させるか、創出されるか、または単離される全てのヒト抗体 (およびそれらの抗原結合性断片) を含む。このよ

50

うな組換えヒト抗体は、フレームワーク領域およびCDR領域が、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかし、一実施形態では、このような組換えヒト抗体は、インビトロの突然変異誘発（またはヒトIg配列についてトランスジェニックである動物を使用する場合、インビボの体細胞突然変異誘発）にかけることができ、したがって、組換え抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列のVH配列およびVL配列に由来し、これらに関連するが、インビボのヒト抗体の生殖細胞系列レパトリー内で天然に存在しない可能性がある配列である。

【0133】

「組換え宿主細胞」（または簡単に「宿主細胞」という用語は、組換え発現ベクターを導入した細胞を指す。このような用語は、特定の対象細胞のみを指すことを意図するものではなく、このような細胞の子孫細胞も指すことを意図するものであることを理解されたい。後続する世代では、突然変異または環境的影響に起因してある種の修飾が生じ得るため、このような子孫細胞は、実際には親細胞と同一ではない可能性もあるが、やはり本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

【0134】

「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、非ヒト霊長動物、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類および爬虫類など、全ての脊椎動物（例えば、哺乳動物および非哺乳動物）を含む。特記される場合を除き、本明細書では「患者」または「対象」という用語が互換的に使用される。

【0135】

「処置すること」という用語は、疾患（例えば、貧血）の症候、合併症もしくは生化学的徴標の発症を防止するもしくは遅延させるか、症候を緩和するか、または疾患、状態もしくは障害のさらなる進行を停止させるもしくは阻害する組成物または抗体の投与を含む。処置は、予防的な（疾患の発症を防止するもしくは遅延させるか、またはその臨床症候もしくは亜臨床症候の症状を防止する）場合もあり、疾患の発症後における症候の治療的抑制または緩和の場合もある。

【0136】

「ベクター」という用語は、それが連結された別のポリヌクレオチドを輸送することが可能なポリヌクレオチド分子を指すことを意図する。ベクターの1つの種類は、さらなるDNAセグメントをライゲーションし得る、環状の二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。ベクターの別の種類は、さらなるDNAセグメントをウイルスゲノムヘライゲーションし得るウイルスベクターである。ある種のベクター（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよび哺乳動物のエピソームベクター）は、それらが導入された宿主細胞における自己複製が可能である。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞へ導入すると宿主細胞のゲノムへ組込むことができ、これにより宿主ゲノムと共に複製する。さらに、ある種のベクターは、それらが作動的に連結された遺伝子の発現を方向付けることが可能である。本明細書では、このようなベクターを「組換え発現ベクター」（または簡単に「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA法において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形態であるため、本明細書では「プラスミド」と「ベクター」とを互換的に使用することができる。しかし、本発明は、均等な機能をもたらすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの発現ベクターの他の形態も含むことを意図する。

【0137】

本明細書で使用される「ヘマトクリット(hematocrit)」または「ヘマトクリット(haematocrit)」という用語は、充填細胞体積(PCV)または赤血球体積分率(EVF)としても公知であり、血液中の赤血球の体積(%)である。ヘマトクリットは、男性では約45%が正常であり、女性では約50%が正常である。ヘマトクリットは、ヘモグロビン濃度、白血球数および血小板数と共に人の全血球算定結果の不可欠な部分であると考えられる。一実施形態では、貧血は、ヘマトクリットの異常な上昇で

10

20

30

40

50

ある多血症と対照的に、ヘマトクリットの異常な低下を指す。

【 0 1 3 8 】

「アッセイすること」という用語は、同定、スクリーニング、プロービング、試験測定または決定の行為を指すために使用され、その行為は、任意の従来の手段によって実施され得る。例えば、E L I S A アッセイ、ノーザンブロット、イメージング、血清型分類、細胞型分類、遺伝子配列決定、表現型分類、ハプロタイプ分類、免疫組織化学、ウェスタンブロット、質量分析などを用いることにより、試料を特定の遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーの存在についてアッセイし得る。「検出すること」(など)という用語は、所与の情報源から特定の情報を抽出する行為を意味し、それは、直接的または間接的であり得る。本明細書に開示される予測方法のいくつかの実施形態では、所与のものの存在またはレベル(例えば、タンパク質のレベルなど)は、生物学的試料中で間接的に、例えばデータベースを照会することによって検出される。「アッセイすること」および「決定すること」という用語は、その試料を物理的試験に供することによる、ある状態から別の状態への物質の変換、例えば生物学的試料、例えば血液試料または他の組織試料の変換を企図する。

10

【 0 1 3 9 】

「得る」という用語は、例えば、物理的介入(例えば、生検、採血)または非物理的介入(例えば、サーバを介した情報の伝達)などにより、何らかの所有を獲得することを意味する。

【 0 1 4 0 】

「...生物学的試料をアッセイすること」などの語句は、所与のマーカー(例えば、タンパク質)の存在またはレベルについて試料を(直接的または間接的に)試験し得ることを意味するために使用される。物質のレベルが確率を表す状況では、そのような物質のレベルは、治療上の決定を導くために使用され得ることが理解されるであろう。例えば、定量的または比較的定量的な手段(例えば、他の試料中のレベルと比べたレベル)によってその存在についてアッセイすることにより、患者中のフェリチンのレベルを決定することができる。開示された方法は、とりわけ患者における特定のマーカー、例えばフェリチンのレベルを決定することを伴う。

20

【 0 1 4 1 】

本明細書で使用される、患者に関して「選択すること」および「選択された」は、特定の患者が所定の基準を有する(例えば、患者が、例えば本明細書に記載されるように特定レベルのフェリチンを有する)ことに基づいて(によって)、特定の患者がより大きい群の患者から具体的に選択されることを意味するために使用される。同様に、「選択的に処置すること」は、特定の疾患を有する患者に処置を提供することを指し、その患者は、特定の患者が所定の基準を有するに基づいてより大きい群の患者から具体的に選択され、例えば、貧血患者は、例えば本明細書に記載されるように、患者が特定のフェリチンレベルを有することにより、処置のために具体的に選択される。同様に、「選択的に投与すること」は、特定の患者が所定の基準、例えば特定の遺伝子マーカーまたは他の生物学的マーカー、例えば特定のフェリチンレベル、例えば本明細書に記載されるものを有することに基づいて(によって)より大きいグループの患者から具体的に選択される患者に薬物を投与することを指す。選択すること、選択的に処置することおよび選択的に投与することは、患者が特定の疾患を有することのみに基づいて患者に標準処置レジメンを提供するのではなく、患者の特定の生物学に基づいて患者に個別治療を提供することを意味する。本明細書で使用される処置の方法に関して、選択することは、特定のマーカーを有する患者の偶然の処置を指すのではなく、むしろ患者が特定のマーカー、例えば特定のフェリチンレベル、例えば本明細書に記載されるものを有することに基づいて患者にB M P 6 アンタゴニストを投与するための意図的な選択を指す。したがって、選択的処置は、マーカーの状態にかかわらず、全ての患者に特定の薬物を投与する標準処置と異なる。

30

40

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される「予測すること」は、本明細書に記載される方法が、疾患、例え

50

ば貧血を有する個体がBMP6結合性分子による処置に応答する、またはより好都合に応答する可能性を医療提供者が決定できるようにするための情報を提供することを示す。これは、100%の精度で応答を予測する能力を指すものではない。代わりに、当業者は、それが確率の上昇を指すことを理解するであろう。

【0143】

本明細書で使用される「可能性」および「可能性が高い」は、事象がどの程度の確率で発生するかの尺度である。これは、「確率」と交換可能に使用され得る。可能性は、推測よりも高いが、確実よりも低い確率を指す。したがって、常識、訓練または経験を用いる合理的な人が、状況からみてある事象が起こる確率が高いと結論付ける場合、事象が起こる可能性が高い。いくつかの実施形態では、可能性が確認されたら、患者は、BMP6結合性分子により処置され得る（または処置を継続するかもしれない）か、または患者は、BMP6結合性分子により処置されない（または処置を中止するかもしれない）こともあり得る。

【0144】

「上昇した可能性」という語句は、事象が発生する確率の上昇を指す。例えば、本明細書中のいくつかの方法により、患者がBMP6結合性分子による処置に応答する上昇した可能性、またはマーカー（例えば、本明細書に記載されるフェリチンのレベル）を有しない同一または類似の疾患を有する患者と比較して、BMP6結合性分子による処置によりよく応答する上昇した可能性を示すかどうかを予測できる。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1-1】レポーター遺伝子アッセイにおける、アンタゴニストである抗体5、抗体6および抗体7によるBMP活性の阻害を示す。BMP2、BMP5、BMP6およびBMP7に対する活性が示される。図1Bは、抗体7のヒトBMP6、ヒトBMP7、ヒトBMP5、マウスBMP6、マウスhBaffR、マウスBSAおよびマウスNeuへの結合について調べるELISA結合アッセイを示す。この図および他の多様な図ならびに本明細書の他の箇所では、Ab5 = 抗体5；Ab6 = 抗体6；およびAb7 = 抗体7である。

【図1-2】（上記の通り。）

【図2】単回投与ラットトリアージPK研究についての薬力学プロファイルを示す。抗体5、抗体6および抗体7を使用した。血清ヘプシジンレベルおよび血清鉄レベルは、投与（10mg/kg、IV）の1時間、6時間、1、2、4、8、16日後に測定した。

【図3】BMP6抗体の、鉄代謝についての血清バイオマーカーに対する用量依存的効果を示す。上：表示の用量の抗体6の単回IV注射後における時間経過にわたる血清hIgG濃度である。下：左パネルは、単回の抗体6または対照ヒトIgG注射後における血清ヘプシジン濃度についての定量的解析であるのに対し、右パネルは、血清鉄濃度である。

【図4】ESA抵抗性炎症性貧血マウスモデルにおけるBMP6抗体の治療的処置を示す。上：BA誘導型ESA抵抗性炎症性貧血モデルについて実験のスキームである。下：BA処置の13日後における赤血球生成パラメータである。HGB：ヘモグロビン；HCT：ヘマトクリット；RETA：網状赤血球カウント；RET-HE：網状赤血球ヘモグロビン均等物である。BA+EPO+hIgG1に対し、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001である。

【図5】HDxMS（質量分析とカップリングした水素/重水素交換）による直鎖状エピトープマッピングを示す。抗体7が結合するBMP6のエピトープを示す（ヒトBMP6（QTLVHLMNPEYVPKP（配列番号98））の残基88~102）。HDxMSを使用して、市販のBMP6抗体のヒト化バージョンである抗体676は、ヒトBMP6の残基23~35（VSSASDYNSSELK（配列番号99））からなるエピトープに結合することが見出された。

【図6】BMP6抗体の安全性および有効性について探査する臨床プログラムのパート1のためのプロトコールを示す。

【図7】BMP6抗体の安全性および有効性について探査する臨床プログラムための用量

10

20

30

40

50

調整決定木を示す。

【図 8】BMP 6 抗体の安全性および有効性について探査する臨床プログラムのパート 2 のためのプロトコールを示す。

【図 9】雄ラットにおける単回投与抗体 7 の薬物動態プロファイルを示す。

【図 10】抗体 7 の、ラットにおける鉄代謝についての血清バイオマーカーに対する用量依存的な効果を示す。表示の用量での単回の抗体 7 または対照（ビヒクル）の注射後における血清ヘプシジン濃度についての定量的解析が示される。左パネルは、投与後最初の 24 時間にわたる効果についての拡大図を示す。

【図 11】抗体 7 の、ラットにおける血清鉄に対する用量依存的な効果を示す。表示の用量の単回の抗体 7 または対照（ビヒクル）の注射後における血清鉄についての定量的解析が示される。左パネルは、投与後最初の 24 時間にわたる効果についての拡大図を示す。

10

【図 12】カニクイザルにおける抗体 7（3 mg / kg）の単回投与 IV 注射についての濃度 - 時間プロファイルを示す。総抗体 7 濃度（遊離抗体 7 および BMP 6 に結合した抗体 7 の両方）がプロットされる。

【図 13】3 mg / kg の用量での抗体 7 の単回静脈内注射後の雄カニクイザルにおける血清ヘプシジン濃度および血清 Fe 濃度を示す。3 匹の異なるサルに由来するデータを平均値と併せて示す。

【図 14】処置前（ベースライン）および 0.01 mg / kg の抗体 7（Ab 7）を用いた処置後 3 日間（投与後 3 日間）の血液透析患者のピーク TSAT（鉄飽和度、%）を示す。コホート 1 の患者の全ては、処置前のフェリチンレベルが 500 ng / mL 以下であった。コホート 2 の患者の全ては、処置前のフェリチンレベルが 500 ~ 1000 ng / mL であった。太線は、各群の TSAT レベルの中央値を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0146】

本発明は、BMP 6 の阻害剤により、低減した鉄に関連する状態、例えば貧血を処置する方法を提供する。

【0147】

BMP 6 阻害剤

本発明の方法では、例えば、抗体、融合タンパク質、アドネクチン、アプタマー、アンチカリン、リボカリン、核酸（例えば、RNA 干渉剤およびリボザイムなどの、アンチセンス分子）、免疫コンジュゲート（例えば、治療剤とコンジュゲートした抗体）、低分子、融合タンパク質、BMP 6 由来ペプチド化合物および受容体ベースのアンタゴニスト（例えば、可溶性 BMP 6 受容体ドメイン）などの広範な BMP 6 アンタゴニストを使用することができる。

30

【0148】

核酸 / アンチセンス分子

別の実施形態では、本発明の方法で利用される BMP 6 アンタゴニストは、BMP 6 をコードする遺伝子もしくはその遺伝子の一部と相補的なアンチセンス核酸分子またはアンチセンス核酸分子をコードする組換え発現ベクターである。本明細書で使用される「アンチセンス」核酸は、あるタンパク質をコードする「センス」核酸と相補的な、例えば二本鎖 cDNA 分子のコード鎖と相補的な、mRNA 配列と相補的な、または遺伝子のコード鎖と相補的なヌクレオチド配列を含む。したがって、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。

40

【0149】

細胞における特定のタンパク質の発現をダウンモジュレートするためのアンチセンス核酸の使用は、当技術分野において周知である（例えば、Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1 (1) 1986; Askart, F. K. and McDonnell, W. M. (1996) N. Eng. J. Med. 334: 316 - 318; Ben

50

nett, M. R. and Schwartz, S. M. (1995) Circulation 92: 1981 - 1993; Mercola, D. and Cohen, J. S. (1995) Cancer Gene Ther. 2: 47 - 59; Rossi, J. J. (1995) Br. Med. Bull. 51: 217 - 225; Wagner, R. W. (1994) Nature 372: 333 - 335を参照されたい)。アンチセンス核酸分子は、別の核酸分子（例えばmRNA配列）のコード鎖と相補的なヌクレオチド配列を含み、したがって他の核酸分子のコード鎖と水素結合することが可能である。mRNAの配列と相補的なアンチセンス配列は、mRNAのコード領域、mRNAの5'もしくは3'非翻訳領域またはコード領域と非翻訳領域を結合する領域（例えば5'非翻訳領域とコード領域の接合部）で見られる配列と相補的であり得る。さらに、アンチセンス核酸は、mRNAをコードする遺伝子の制御領域、例えば転写開始配列または制御因子と配列において相補的であり得る。好ましくは、アンチセンス核酸は、コード鎖/またはmRNAの3'非翻訳領域において開始コドンに先行するかまたはそれを橋渡す領域と相補的であるように設計される。

【0150】

アンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickの塩基対則に従って設計できる。アンチセンス核酸分子は、BMP6 mRNAの全コード領域と相補的であり得るが、より好ましくはBMP6 mRNAのコードまたは非コード領域の一部のみとアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、BMP6 mRNAの翻訳開始部位の周囲の領域と相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチド長であり得る。アンチセンス核酸は、当技術分野において既知の方法を用いた化学合成および酵素ライゲーション反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に生じるヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増加させるかもしくはアンチセンスおよびセンス核酸間で形成される二本鎖の物理的安定性を増加させるために多様な修飾ヌクレオチドを用いて化学的に合成することができ、例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用できる。アンチセンス核酸を作製するために使用できる修飾ヌクレオチドの例は、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルキユーオシン、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルキユーオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キユーオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)wおよび2, 6 - ジアミノプリンを含む。代わりに、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローン化されている（すなわち挿入された核酸から転写されるRNAが目的の標的核酸とアンチセンス方向のものであり、以下のサブセクションで詳述される）発現ベクターを用いて生物学的に作製できる。

【0151】

本発明の方法に使用できるアンチセンス核酸分子は、典型的には、それがBMP6をコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズまたは結合して、転写および/または翻訳を阻害することによって発現を阻害するように対象に投与されるか

またはインサイチューで作製される。ハイブリダイゼーションは、安定な二本差を形成するための従来のヌクレオチド相補性によるものであるか、またはDNA二本鎖と結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的相互作用を介し得る。アンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位への直接注射が含まれる。代わりに、アンチセンス核酸分子は、修飾して選択した細胞に標的化し、全身投与され得る。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、選択した細胞表面上で発現される受容体または抗原と特異的に結合するように、例えば分子中のアンチセンス核酸を細胞表面受容体または抗原と結合するペプチドまたは抗体と結合させることにより、修飾され得る。アンチセンス核酸分子はまた、当技術分野において周知であり、例えば米国特許出願公開第2007/0111230号明細書（参照によりその全内容が本明細書に組込まれる）に記載のベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強いp o l I Iまたはp o l I I Iプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が好ましい。

10

【0152】

さらに別の態様では、本発明の方法で利用されるアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子を含み得る。 α -アノマー核酸分子は、通常の β -ユニットと対照的に、鎖が互いに平行に走る相補的RNAと特異的二本鎖ハイブリッドを形成する（Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641）。アンチセンス核酸分子は、2'-O-メチルリボヌクレオチド（Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148）またはキメラRNA-DNA類似体（Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330）も含み得る。

20

【0153】

他の態様では、本発明の方法で用いられるアンチセンス核酸は、RNAiを媒介する化合物である。RNA干渉剤は、BMP6またはその断片と相同なRNA分子を含む核酸分子、「低分子干渉RNA」（siRNA）、「低分子ヘアピン」または「低分子ヘアピンRNA」（shRNA）ならびにRNA干渉（RNAi）によって標的遺伝子の発現と干渉または阻害する低分子を含むが、それらに限定されない。RNA干渉は、二本鎖RNA（dsRNA）を用いてdsRNAと同じ配列を含有するメッセンジャーRNA（mRNA）を分解する転写後標的遺伝子サイレンシング法である（Sharp, P. A. and Zamore, P. D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P. D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999)）。内因性リボヌクレアーゼが、より長いdsRNAをより短い21または22ヌクレオチド長の低分子干渉RNAまたはsiRNAと呼ばれるRNAに切断する場合にこの過程が生じる。小さいRNAセグメントは、標的mRNAの分解を媒介する。RNAiの合成のためのキットは、例えば、New England BiolabsおよびAmbionから市販されている。一実施形態では、アンチセンスRNAにおいて使用するための上記化学の1つまたは複数が利用され得る。

30

【0154】

さらに別の態様では、アンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、相補的領域を有する一本鎖核酸、例えばmRNAを切断できるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。したがって、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591に記載））を用いてBMP6 mRNA転写産物を触媒的に切断し、それによってBMP6 mRNAの翻訳を阻害することができる。

40

【0155】

代わりに、遺伝子発現は、BMP6の制御領域（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）と相補的なヌクレオチド配列を標的化して、BMP6遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般に、Helene, C.

50

, 1991, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C. et al., 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; および Maher, L. J., 1992, Bioassays 14(12): 807-15を参照されたい。

【0156】

融合タンパク質およびBMP6由来ペプチド化合物

別の態様では、本発明の方法で用いられるBMP6アンタゴニストは、BMP6アミノ酸配列に由来する融合タンパク質またはペプチド化合物である。特に、阻害性化合物は、BMP6と融合タンパク質またはペプチド化合物の接触がBMP6と標的分子の相互作用を競合的に阻害するように、BMP6と標的分子の相互作用を媒介するBMP6の融合タンパク質またはその一部（またはその模倣体）を含む。このような融合タンパク質およびペプチド化合物は、当技術分野において既知の標準的な技法を用いて作製され得る。例えば、ペプチド化合物は、標準的なペプチド合成技法を用いた化学合成によって作製でき、次いでペプチドを細胞に導入するための当技術分野において既知の多様な方法（例えばリポソーム等）によって細胞に導入できる。

10

【0157】

本発明の融合タンパク質またはペプチド化合物のインビボでの半減期は、ペプチド修飾、例えばN-結合グリコシル化部位をBMP6ペプチド化合物に付加することまたはBMP6ペプチド化合物を、例えばリシン-モノベグ化を介してポリ（エチレングリコール）（PEG；ベグ化）にコンジュゲートさせることによって改善され得る。そのような技法は、治療用タンパク質薬の半減期を延長するのに有益であることが証明されている。本発明のBMP6ポリペプチドのベグ化は、同様の医薬上の利点をもたらすと予測される。

20

【0158】

さらに、ベグ化は本発明のポリペプチドの任意の部分において、非天然アミノ酸の導入によって達成され得る。ある非天然アミノ酸は、Deiters et al., J Am Chem Soc 125: 11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301: 964-967, 2003; Wang et al., Science 292: 498-500, 2001; Zhang et al., Science 303: 371-373, 2004または米国特許7,083,970号明細書に記載の技術によって導入され得る。簡潔には、これらの発現系のいくつかは、本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームに非センスコドン、例えばアンバーTAGを導入するための部位指定突然変異誘発を伴う。次いで、導入した非センスコドンに特異的なtRNAを利用できる宿主にこのような発現ベクターを導入し、選択した非天然アミノ酸を加える。本発明のポリペプチドにコンジュゲートする分子という目的で有益である具体的な非天然アミノ酸は、アセチレンおよびアジド側鎖を有するものを含む。次いで、これらの新規アミノ酸を含有するBMP6ポリペプチドは、タンパク質のこれらの選択された部位でベグ化され得る。

30

【0159】

受容体ベースのアンタゴニスト

別の実施形態では、本発明の方法で用いるBMP6アンタゴニストは、受容体ベースのアンタゴニストである。受容体ベースのアンタゴニストは、BMP6（またはその部分）とそれぞれ結合し、BMP6の活性および/または機能を破壊する可溶性BMP6受容体を含む。特定の実施形態では、受容体ベースのアンタゴニストは、可溶性ヘモジュベリンまたはBMP I型もしくはII型受容体を含むが、これらに限定されない。可溶性ヘモジュベリンのバージョンには、米国特許出願公開第2010/0136015号明細書に記載されているものが含まれる。

40

【0160】

BMP6抗体およびそれらの抗原結合性断片

本発明は、本明細書に記載される本発明の方法ならびに他の実施形態および態様において有用なBMP6阻害剤として、ヒトBMP6に特異的に結合する抗体およびその抗原結

50

合性断片を提供する。

【 0 1 6 1 】

B M P ファミリー成長因子の分泌型リガンドである B M P 6 は、鉄代謝ホルモンであるヘプシジンの肝臓における発現に対する重要な内因性調節因子として同定されている。いかなる特定の理論にも束縛されないが、本開示は、ヘプシジン降下療法としての B M P 6 アンタゴニスト抗体が、基礎疾患の罹患率を実質的に増加させ、転帰不良の予測因子であることが多い赤血球生成刺激剤（E S A）に対する抵抗性を克服することにより、鉄欠乏性貧血を伴う患者に利益をもたらすと予測されることを示唆する。

【 0 1 6 2 】

このような抗ヒト B M P 6 抗体の例は、その配列が表 1 に列挙される抗体 3、抗体 5、抗体 6 および抗体 7 ならびに表 1 4 に記載される抗ヒト B M P 6 抗体である。

【 0 1 6 3 】

抗体 5、抗体 6 および抗体 7 の全ては、高アフィニティーでヒト B M P 6 に結合し、ヒト B M P 7、ヒト B M P 5 およびヒト B M P 2 に対する選択性を上回る高選択性を伴う（図 1 A を参照されたい）。これらの抗体の全ては、ラットにおける血清ヘプシジンの減少および血清鉄の増大も裏付ける（図 2 を参照されたい）。

【 0 1 6 4 】

抗ヒト B M P 6 抗体のさらなる例は、L Y 3 1 1 3 5 9 3 である（例えば、臨床試験 N C T 0 2 6 0 4 1 6 0 を参照されたい）。抗ヒト B M P 6 抗体のさらなる例は、国際公開第 2 0 1 4 / 0 9 9 3 9 1 号パンフレットに記載されており、その内容は、全体的に本明細書に組込まれる。国際公開第 2 0 1 4 / 0 9 9 3 9 1 号パンフレットの特定の抗ヒト B M P 6 抗体には、表 1 4 に記載の抗体が含まれる。

【 0 1 6 5 】

【表 1】

表14: 抗ヒトBMP6抗体の例

配列名	配列	配列番号
抗体1		
LCDR1	RSSENIYRNLA	1
LCDR2	AATNLAD	2
LCDR3	QGIWGTPLT	3
軽鎖可変領域 (aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSENIYRNLA WYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQGIWGTPLTFGGG TKVEIK	4
軽鎖(aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSENIYRNLA WYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQGIWGTPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	5
HCDR1	GYTFTSYAMH	6
HCDR2	YINPYNDGTYNENFK	7
HCDR3	RPFGNAMD	8
重鎖可変領域 (aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTYNENFKGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRPFGN AMDWGGQGLTVSS	92

【 0 1 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 2】

重鎖(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTKYNENFKGR VTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRPFGN AMDIWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPCCPAPAEAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	93
抗体2		
LCDR1	RSENIYRNLA	1
LCDR2	AATNLAD	2
LCDR3	QGIWGTPLT	3
軽鎖可変領域 (aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSENIYRNLA WYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGIWGTPLTFGGGKVEIK	4
軽鎖(aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSENIYRNLA WYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQGIWGTPLTFGGGKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	5

10

20

【 0 1 6 7 】

【表 3】

HCDR1	GYTFTSYAMH	6
HCDR2	YINPYNRGTKYNENFK	94
HCDR3	RPFGNAMDI	8
重鎖可変領域 (aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNRGTKYNENFKGR VTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRPFGN AMDIWGQGTLLTVSS	95
重鎖(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNRGTKYNENFKGR VTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRPFGN AMDIWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPCCPAPAEAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	96

30

40

【 0 1 6 8 】

この経路を標的とすることにより、機能的な評価項目の改善を付与し得るというさらなる証拠をもたらすために、本発明者らは、BMP6 特異的抗体である抗体 5 ~ 7 が正常マウスおよび正常ラットにおける鉄代謝についての血清バイオマーカーをモジュレートし、炎症性貧血のマウスモデルにおけるESA 抵抗性貧血を転導する能力について調べた。本発明者らは、動物へのBMP6 抗体の単回の注射が、循環ヘプシジンの強力な抑制を伴う血清鉄レベルの持続的増大を結果としてもたらすことを見出した。さらに、炎症誘導性貧血下にあるマウスの治療的処置は、併用のエリスロポエチン処置に応答する赤血球生成パラメータを著明に改善した。

【 0 1 6 9 】

50

本開示では、炎症性貧血のマウスモデルにおける B M P 6 シグナル伝達の阻害により、鉄依存的な赤血球パラメータが実質的に改善された。

【 0 1 7 0 】

本明細書で開示される B M P 6 アンタゴニスト抗体は、エリスロポエチン低応答性を伴う貧血を安全に改善する新規の治療法となる。いかなる特定の理論にも束縛されないが、本開示は、これが、赤血球系コンパートメントからの要求に対する貯蔵鉄の移動およびアベイラビリティを介して生じ得ることを示唆する。

【 0 1 7 1 】

一実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 タンパク質に対して、ヒト B M P 5 タンパク質またはヒト B M P 7 タンパク質のいずれかに対する 1 0 0、5 0 0 または 1 0 0 0 倍のアフィニティーで結合する単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。B M P 6 のノックアウトは、マウスに対して致死性ではないため、B M P 7 への結合を伴わない B M P 6 に対する特異性が重要である。しかし、B M P 7 をノックアウトされたマウスは、腎臓、眼および骨の欠損を伴い、生後に死亡する。一方の遺伝子の個別のノックアウトは、心臓発生を改変しないが、B M P 6 および B M P 7 の二重ノックアウトは、心臓における何らかの欠損および遅延を裏付け、胎仔は、心不全で死亡した。B M P 7 は、線維症と関連する慢性心疾患の進行を阻止するのに重要である。したがって、抗 B M P 6 抗体の B M P 7 との交差反応性は、所望されない。本明細書で提示される抗体は、B M P 7 より B M P 6 に特異的である（例えば、表 4 A を参照されたい）。図 1 B は、ヒト B M P 2、B M P 5 および B M P 7 タンパク質に対する結合特異性を上回る、ヒト B M P 6 に対する結合特異性についての証拠も示す。これに対し、R & D S y s t e m s から市販されている B M P 6 抗体は、例えば、レポーター遺伝子アッセイにおいて B M P 7 に対して強い交差反応性を有し、B M P 6 および B M P 7 の両方を阻害することが明らかにされた。

【 0 1 7 2 】

本発明の抗体は、実施例（下記の 6 節を参照されたい）に記載される通りに単離されたヒトモノクローナル抗体を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 7 3 】

このような抗ヒト B M P 6 抗体の例は、抗体 3、抗体 5、抗体 6 および抗体 7 であり、これらの配列を表 1 に列挙する。

【 0 1 7 4 】

成熟抗体 7 は、親 I g G ヒット N O V 0 4 4 2 (V H 3 __ 3 - 1 5、V L 1 __ 1 e) に由来する生殖細胞系列化 / P T M 除去体である N O V 0 4 4 2 __ V L (Y G Q) に由来する。抗体 7 は、E L I S A 結合アッセイにおいてヒト B M P 6 に高アフィニティーで結合し、ヒト B M P 7 に対する選択性は、5 0 0 倍を超える（すなわちヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 7 に対する 5 0 0 倍を超えるアフィニティー）。この抗体は、ヒト B M P 2 または B M P 5 に対しても検出可能な活性を有しない。親 I g G である N O V 0 4 4 2 および抗体 7 により認識される B M P 6 ペプチドを図 5 に示す。ペプチドは、ヒト B M P 6 のアミノ酸である Q T L V H L M N P E Y V P K P (配列番号 9 8) を含む。I g G N O V 0 4 4 2 および抗体 7 とは対照的に、ヒト化 m A b 5 0 7 (R & D S y s t e m s) は、ヒト B M P 6 の配列 V S S A S D Y N S S E L K (配列番号 9 9) に結合する。したがって、I g G N O V 0 4 4 2 および抗体 7 により認識されるエピトープは、新規の B M P 6 エピトープを表す。抗体 7 は、インビトロにおいて B M P 6 の受容体への結合も阻害する。B M P 6 の、B M P R 1 A への結合は、最大で 5 9 % 阻害され；B M P R 1 B への結合は、最大で 8 5 % 阻害され；R G M - c への結合は、最大で 7 2 % 阻害される。ラットにおける単回の 1 0 m g / k g による処置は、循環ヘプシジンの持続的抑制をもたらした。マウスにおける推定最小有効用量は、0 . 1 m g / k g 以下である。サルにおける 3 m g / k g の単回の抗体投与後に血清鉄も増大を示し、ヘプシジンは、減少を示した。ウシ流産菌 (B r u c e l l a a b o r t u s) 抗原を使用して貧血を刺激したマウスでは、抗体 7 (2 m g / k g) の処置効果は、慢性 E P O 治療に対する臨床的に有意な赤血球生成応答と符合し、ベースラインからのヘモグロビンの段階的な増大は、2 . 0 g

/ d L 超である。

【 0 1 7 5 】

抗体 7 では、L C D R 2 内の N 5 1 Q 突然変異により、潜在的な翻訳後修飾部位を除去して、後続の生成物の均質性を増大させる。V H 3 / ラムダ 1 フレームワークに由来する最も近縁のヒト生殖細胞系列配列にマッチさせるために、V H では V 4 0 A 突然変異により、V L では D 1 Q 突然変異、I 2 S 突然変異により、かつこれらの 2 つの残基が最初に逸失していたフレームワークを修復するアミノ酸 Y 4 9 および G 5 0 の導入により、抗体を操作した。

【 0 1 7 6 】

本研究は、抗体 7 (= N O V 0 9 5 8 = N O V 0 8 0 6 _ _ V H [V 4 0 A] _ _ V L [D 1 Q 、 I 2 S 、 Y 4 9 、 G 5 0 、 N 5 1 Q]) を結果としてもたらした。

10

【 0 1 7 7 】

抗体 3、抗体 5、抗体 6 および抗体 7 の全ては、ヒト B M P 2 タンパク質、ヒト B M P 5 タンパク質またはヒト B M P 7 タンパク質と比較してヒト B M P 6 タンパク質に対する高特異性を示す。これらの全ての抗体のエピトープは、全てがアフィニティー成熟前における単一の親 F a b に由来するため、同じであると予測される。例えば、抗体 3 は、H C D R 2 のアフィニティー成熟前における抗体 5 および抗体 7 の両方と同じ F a b クローンを共有する。抗体 5 は、N O V 0 4 4 2 (V H 3 _ _ 3 - 1 5 、 V I 1 _ _ 1 e) N O V 0 4 4 2 _ _ V L (Y G Q) (H C D R 2 のアフィニティー成熟) 抗体 5 に由来する。抗体 3 は、N O V 0 4 4 2 (V H 3 _ _ 3 - 1 5 、 V I 1 _ _ 1 e) N O V 0 4 4 2 _ _ V L (Y G S) (H C D R 2 のアフィニティー成熟) 抗体 3 に由来する。本明細書に記載される抗体の作出に関するさらなる詳細は、実施例に提示する。

20

【 0 1 7 8 】

本発明は、B M P 6 (例えば、ヒト B M P 6 タンパク質) に特異的に結合する抗体であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H ドメインを含む抗体を提供する。本発明は、B M P 6 タンパク質に特異的に結合する抗体であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H C D R のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する V H C D R を含む抗体も提供する。特に、本発明は、B M P 6 タンパク質に特異的に結合する抗体であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H C D R のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ以上の V H C D R を含む (または代替的にこれらからなる) 抗体を提供する。

30

【 0 1 7 9 】

本発明は、B M P 6 に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H アミノ酸配列を含み (または代替的にこれらからなり)、フレームワーク配列 (例えば、C D R でない配列) 内の約 1 0 以下のアミノ酸を突然変異させた (この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である) 抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。本発明は、B M P 6 に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H アミノ酸配列を含み (または代替的にこれらからなり)、フレームワーク配列 (例えば、C D R でない配列) 内の 1 0 以下のアミノ酸を突然変異させた (この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である) 抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。

40

【 0 1 8 0 】

本発明は、B M P 6 に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H アミノ酸配列を含み (または代替的にこれらからなり)、フレームワーク配列 (例えば、C D R でない配列) 内の約 2 0 以下のアミノ酸を突然変異させた (この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である) 抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。本発明は、B M P 6 に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表 1 および / または表 1 4 に列挙される V H アミノ酸配列を含み (または代替的にこれらからなり)、フレームワー

50

ク配列（例えば、C D Rでない配列）内の20以下のアミノ酸を突然変異させた（この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である）抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。

【0181】

本発明は、B M P 6に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV Lアミノ酸配列を含み（または代替的にこれらからなり）、フレームワーク配列（例えば、C D Rでない配列）内の約10以下のアミノ酸を突然変異させた（この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である）抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。本発明は、B M P 6に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV Lアミノ酸配列を含み（または代替的にこれらからなり）、フレームワーク配列（例えば、C D Rでない配列）内の10以下のアミノ酸を突然変異させた（この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である）抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。

10

【0182】

本発明は、B M P 6に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV Lアミノ酸配列を含み（または代替的にこれらからなり）、フレームワーク配列（例えば、C D Rでない配列）内の約20以下のアミノ酸を突然変異させた（この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である）抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。本発明は、B M P 6に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV Lアミノ酸配列を含み（または代替的にこれらからなり）、フレームワーク配列（例えば、C D Rでない配列）内の20以下のアミノ酸を突然変異させた（この場合、突然変異は、多様な非限定的な例として付加、置換または欠失である）抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。

20

【0183】

本発明は、B M P 6タンパク質に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV Lドメインを含む抗体またはそれらの抗原結合性断片を提供する。本発明は、B M P 6タンパク質に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV L C D Rのいずれか1つのアミノ酸配列を有するV L C D Rを含む抗体またはそれらの抗原結合性断片も提供する。特に、本発明は、B M P 6タンパク質に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片であって、表1および/または表14に列挙されるV L C D Rのいずれか1つのアミノ酸配列を有する、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ以上のV L C D Rを含む（または代替的にこれらからなる）抗体およびそれらの抗原結合性断片を提供する。

30

【0184】

本発明の他の抗体およびそれらの抗原結合性断片は、突然変異させているが、C D R領域内の、表1および/または表14に記載される配列に描示されるC D R領域と少なくとも60、70、80、90または95パーセントの同一性を有するアミノ酸を含む。一実施形態では、本発明の他の抗体およびそれらの抗原結合性断片は、C D R領域内の1、2、3、4または5つ以下のアミノ酸を、表1および/または表14に記載される配列に描示されるC D R領域と比較して突然変異させた突然変異体のアミノ酸配列を含む。

40

【0185】

本発明は、B M P 6タンパク質に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片のV H、V L、全長重鎖および全長軽鎖をコードする核酸配列も提供する。このような核酸配列は、哺乳動物細胞内の発現について最適化することができる（例えば、表1は、抗体3、抗体5、抗体6および抗体7の重鎖および軽鎖の例となる核酸配列を示す）。

【0186】

50

【表 4】

表1.本発明のBMP6抗体の例

抗体 3			配列 番号
Kabat	HCDR1	SYVVH	9
Kabat	HCDR2	RIKDHKQGYTTAYAASVKG	10
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	11
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	12
Chothia	HCDR2	KDHKQGYT	13
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	14
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIKDHK QGYTTAYAASVKGRTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGLTVTVSS	15
	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGT GGCCTGGTGAAACAGGCGGCAGCCTG CGCCTGAGCTGCGCCGCTCCGGATT ACCTTTCTCTTACGTTGTTCATTGGG TGCGCCAGGCCCGGGCAAAGTCTCG AGTGGGTGGGCGGTATCAAAGACCACA AACAGGGCTACACTACTGCTTATGCCG CCTCTGTGAAAGGCCGCTTACCATTA GCCGCGATGATTGAAAAACACCCTGT ATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCG AAGATACGGCGTGTATTATGCGCGC GTGTTGAACGTTCTAAATCTGGTTTCG ATAACTGGGGCCAAGCACCTGGTGA CTGTTAGCTCA	16

10

【 0 1 8 7 】

【表 5】

	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIKDHK QGYTTAYAASVKGRTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV CDKTHITCPPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	17
	DNA 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGT GGCCTGGTGAAACAGGCGGCAGCCTG CGCCTGAGCTGCGCCGCTCCGGATT ACCTTTCTCTTACGTTGTTCATTGGG TGCGCCAGGCCCGGGCAAAGTCTCG AGTGGGTGGGCGGTATCAAAGACCACA AACAGGGCTACACTACTGCTTATGCCG	18

20

30

【 0 1 8 8 】

40

50

【表 6】

		CCTCTGTGAAAGGCCGCTTTACCATTA GCCGCGATGATTGAAAAACACCTGT ATCTGCAAAATGAACAGCCTGAAAACCG AAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGC GTGTTGAACGTTCTAAATCTGGTTTCG ATAACTGGGGCCAAGGCACCTGGTGA CTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGA ACTCAGGCGCCTGACACAGCGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTT CAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAACCTCGGGGGACCGTCA GTCTTCTTCCCCCAAAACCAAG GACACCCTCATGATCTCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGAACGTG AGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG TGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTC CCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC ACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAC TACAAGACCACGCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCA AGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA	
--	--	---	--

10

20

【 0 1 8 9 】

【表 7】

Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	19
Kabat	LCDR2	GSSERPS	20
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	21
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	22
Chothia	LCDR2	GSS	23
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	24
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGSSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYCYQSWDSSQTLVVFGGGKLTIVL	25
	DNA VL	CAGAGCGTGTGACCCAGCCGCCGAGC GTGAGCGGTGCACCGGCCAGCGCGTG ACCATTAGCTGTACCGGCAGCAGCAGC AACATTGGTGTGGTTACTCTGTGCAT TGGTACCAGCAGCTGCCGGCACGGCG CCGAAACTGTGATCTATGGTAGCTCT GAACGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGC TTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGC GCCAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAA GCAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGC CAGTCTTGGGACTCTTCTCAGACTCTG GTTGTGTTGGCGGCGGCACGAAGTTA ACCGTCCTA	26

30

【 0 1 9 0 】

40

50

【表 8】

	軽鎖	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGSSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYQCQSWDSSQTLVVFGGGKTLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	27
	DNA 軽鎖	CAGAGCGTGTGACCCAGCCGCCGAGC GTGAGCGGTGACCCGGGCCAGCGCGTG ACCATTAGCTGTACCGGCAGCAGCAGC AACATTGGTGCTGTTACTCTGTGTCAT TGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCG CCGAAACTGTGATCTATGGTAGCTCT GAACGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGC TTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGC GCCAGCCTGGCGATTACCGGCTGCAA GCAGAAAGACGAAGCGGATTATTACTGC CAGTCTTGGGACTCTTCTCAGACTCTG GTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTA ACCGTCTAGGTACGCCAAGGCTGCC CCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCTCCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA CACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCT ACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCTGGA AGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCG GGAGTGGAGACCACACACCTCCAAA CAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAG CAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCA GTGGAAGTCCACAGAAGTACAGCTG CCAGGTCACGATGAAGGGAGCACCGT GGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAAT GTTCA	28
抗体 5			

10

【0 1 9 1】

20

【表 9】

Kabat	HCDR1	SYVVH	29
Kabat	HCDR2	RIKRESSSYTMYAAPVKG	30
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	31
Chothia	HCDR1	GFTFSY	32
Chothia	HCDR2	KRESSSYT	33
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	34
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHVWRQAPGKGLEWVGRIKRES SSYTTMYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGTILVTVSS	35
	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGTACGTGGTGCACCTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTCCGACGGATTAAGAGAGA GTCCTCTAGCTACACTACTATGTACGC CGCTCCCGTGAAGGGCCGGTTCACAT CTCTAGGGACGACTCTAAGAACACCT GTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAAC CGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGC TAGAGTGGAACGGTCTAAGTACAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGT CACCGTGTCTAGC	36
	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHVWRQAPGKGLEWVGRIKRES SSYTTMYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHITCPPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	37

30

40

【0 1 9 2】

50

【表 1 0】

	DNA 重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCACTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTCGGACGGATTAAGAGAGA GTCCTCTAGCTACACTACTATGTACGC CGCTCCCGTGAAGGGCCGGTTCACTAT CTTAGGGACGACTCTAAGAACACCT GTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAAC CGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGC TAGAGTGGAACCGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGT CACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGG CCCAAGTGTGTTTCCCTGGCCCCAG CAGCAAGTCTACTCCGGCGGAAGTGC TGCCCTGGGTTGCTGGTGAAGGACTA CTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAG CAGCGGCTGTACAGCTGAGCAGCGT GGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC	38
--	--------	---	----

10

【 0 1 9 3】

【表 1 1】

		GACAAGACCCACACCTGCCCCCTGC CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCT TCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG TGTCACACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCAACAACGCCAAGCAAGCCAGAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGAAT ACAAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAG CCCCAGGTGTACACCTGCCCCAGC CGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT CTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA ACTACAAGACCACCCCCAGTGTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGA GCCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	39
Kabat	LCDR2	GQSERPS	40
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	41
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	42
Chothia	LCDR2	GQS	43
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	44
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYVCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	45

20

30

【 0 1 9 4】

40

【表 1 2】

	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTACAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCT AATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCAC TGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCA GAGCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGG TTTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGC GCTAGTCTGGCTATCACCGGCTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGT CAGTCTGGGACTCTAGTCAGACCTTG GTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTG ACCGTGCTG	46
	軽鎖	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERP SGVPDRFSGSKGTSASLAITGLQAEDEA DYQCQSWDSSQTLVVFGGKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	47
	DNA 軽鎖	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTACAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCT AATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCAC TGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCA GAGCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGG TTTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGC GCTAGTCTGGCTATCACCGGCTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGT CAGTCTGGGACTCTAGTCAGACCTTG GTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTG ACCGTGCTGGGTACGCTAAGGCTGCC CCGAGCGTGACCTGTTCCCCCAGC AGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGC CACCTGGTGTGCTGATCAGCGACTT CTACCCAGGCGCGGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGG CCGGCGTGGAGACCAACACCCAGCA AGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAG CAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGC TGCCAGGTGACCCAGGCGGACAGCACC GTGGAAGACCGTGGCCCAACCGA GTGCAGC	48

10

20

【 0 1 9 5】

【表 1 3】

抗体 6			
Kabat	HCDR1	SYVVH	49
Kabat	HCDR2	RTRHSDMGYATSYAAPVKG	50
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	51
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	52
Chothia	HCDR2	RHSDMGYA	53
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	54
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRTRHSD MGYATSYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVVYCARVERSKSGFDN WGQGLTVTVSS	55
	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCAGTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTCGGACGGAAGTACACTCA GATATGGGCTACGCTACTAGCTACGCC GCTCCCGTGAAGGGCCGGTTCATATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCTG TACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACC GAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCT AGAGTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTC GATAACTGGGTCAGGGCACCTGGTC ACCGTGTCTAGC	56

30

40

【 0 1 9 6】

50

【表 1 4】

	重鎖	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHHVVRQAPGKGLEWVGRTRHSD MGYATSYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPELLEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	57
	DNA 重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTTAGCTACGTGGTGCACCTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCTG GAGTGGGTCGGACGACTAGACACTCA GATATGGGCTACGCTACTAGCTACGCC GCTCCCGTGAAGGGCCGGTTCACATATC	58

10

【0 1 9 7】

【表 1 5】

		TCTAGGGACGACTCTAAGAACCCTG TACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACC GAGGACACCGCCGCTCTACTACTGCGCT AGAGTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTC GATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGTC ACCGTGTCTAGCGCTAGCCTAAGGGC CCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCAGC AGCAAGTCTACTCCGGCGGAAGTGTCT GCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTCTGG AACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGC AGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG GTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAAC CACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGTGGC ACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCC CAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTT CCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG TGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCAACAACGCCAAGACCAAGCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAAT ACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAG CCCCAGGTGTACACCTGCCCCCAGC CGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT CTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCAGTGTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTCTGTGACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGA GCCCCGGCAAG	
--	--	--	--

20

30

【0 1 9 8】

40

50

【表 1 6】

Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	59
Kabat	LCDR2	GQSERPS	60
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	61
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	62
Chothia	LCDR2	GQS	63
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	64
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYVCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	65
	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCT AATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCAC TGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCA GAGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGG TTTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGC GCTAGCTGGCTATCACCGGCTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGT CAGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCCTG GTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTG ACCGTGCTG	66

10

【 0 1 9 9 】

【表 1 7】

	軽鎖	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYVCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETITP SKQSNKYAASSYLSTPEQWQSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	67
	DNA 軽鎖	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCT AATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCAC TGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCA GAGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGG TTTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGC GCTAGCTGGCTATCACCGGCTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGT CAGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCCTG GTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTG ACCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGCTGCC CCCAGCGTGACCCGTGTTCCCCCAGC AGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAAGGC CACCTGGTGTGCTGATCAGCGACTT CTACCCAGGCGCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGG CCGGCGTGGAGACCACCAACCCAGCA AGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAG CAGTGGAAGAGCCACAGGTCTACAGC TGCCAGGTGACCCACGAGGCGAGCACC GTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGA GTGCAGC	68

20

30

【 0 2 0 0 】

40

50

【表 1 8】

抗体 7			
Kabat	HCDR1	SYVVH	69
Kabat	HCDR2	RIRLETHGYAAEYAAASVKG	70
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	71
Chothia	HCDR1	GTFSSY	72
Chothia	HCDR2	RLETHGYA	73
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	74
	VH	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHHWVRQAPGKGLEWVGRIRLET HGYYAEYAAASVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGLVTVSS	75
	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCACTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTCTGGACGGATTAGACTGGA AACTCACGGCTACGCCGCCGAGTACGC CGCTAGTGTGAAGGCCGGTTCACATAT CTCTAGGGACGACTCTAAGAACCCT GTACCTGCAGATGAATAGCTGAAAAC CGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGC TAGAGTGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGT CACCGTGCTAGC	76
	重鎖	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHHWVRQAPGKGLEWVGRIRLET HGYYAEYAAASVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLPSSKST SGGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPK CDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPK DTLMISRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSGSEFLYSLKTVDKS RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	77

10

20

【 0 2 0 1】

【表 1 9】

	DNA 重鎖	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCACTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTCTGGACGGATTAGACTGGA AACTCACGGCTACGCCGCCGAGTACGC CGCTAGTGTGAAGGCCGGTTCACATAT CTCTAGGGACGACTCTAAGAACCCT GTACCTGCAGATGAATAGCTGAAAAC CGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGC TAGAGTGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGT CACCGTGCTAGCGCTAGCACTAAGGG CCCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGTCTACTCCGGCGGAAGTGC TGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTA CTTCCCCAGCCCGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGT GCACACCTTCCCGCGCTGCTGCAGAG CAGCGGCTGTACAGCTGAGCAGCGT GGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGG	78
--	--------	---	----

30

【 0 2 0 2】

40

【表 2 0】

		ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCCTGC CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCT TCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCA AGGACACCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACG TGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCA CCAGGACTGGCTGAACGCCAAAGAAT ACAAGTGCAAAGTCTCAAACAAGGCC TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAG CCCAGGTGTACACCTGCCCCAGC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT CTACCCAGCGATATCGCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCAAGTGTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGA GCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSNIGAGYSVH	79
Kabat	LCDR2	GQSERPS	80
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	81
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	82
Chothia	LCDR2	GQS	83
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	84

10

【 0 2 0 3】

【表 2 1】

	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQSWDSSQTLVVFGGGKLTVL	85
	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGTCAAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCT AATATCGGCGCTGGCTATAGCTGCAC TGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCA GAGCGGCTAGCGGCTGCCGATAGG TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGC GCTAGTCTGGCTATCACCAGCTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGT CAGTCTGGGACTCTAGTCAGACCTG GTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTG ACCGTGCTG	86
	軽鎖	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSNI GAGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERP SGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEA DYYCQSWDSSQTLVVFGGGKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSPVKAGVETTP SKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	87

20

30

【 0 2 0 4】

【表 2 2】

	DNA 軽鎖	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGTCAAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCT AATATCGGCGCTGGCTATAGCTGCAC TGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCA GAGCGGCTAGCGGCTGCCGATAGG TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGC GCTAGTCTGGCTATCACCAGCTGCAG GCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGT CAGTCTGGGACTCTAGTCAGACCTG GTGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTG ACCGTGCTGGGTGAGCTAAGGCTGCC CCCAGCGTGACCTGTTCCCCCAGC AGCGAGGAGCTGACGGCCAACAAGGC CACCTGGTGTGCTGATCAGCGACTT CTACCCAGGCGCGTGACCGTGGCGCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCGTGAAGG CCGGCGTGGAGACCAACCCCAAGCA AGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAG CAGTGGAAGGCCACAGGTCTACAGC TGCCAGGTGACCCACGAGGCGAGCACC GTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGA GTGCAGC	88
--	--------	--	----

40

50

【 0 2 0 5 】

本発明の他の抗体およびそれらの抗原結合性断片は、アミノ酸またはアミノ酸をコードする核酸を突然変異させているが、表 1 および / または表 1 4 に記載される配列と少なくとも 6 0、7 0、8 0、9 0 または 9 5 パーセントの同一性を有する抗体およびそれらの抗原結合性断片を含む。一実施形態では、本発明の他の抗体およびそれらの抗原結合性断片は、実質的に同じ治療的活性を保持しながら、可変領域内の 1、2、3、4 または 5 以下のアミノ酸を、表 1 および / または表 1 4 に記載される配列に描示される可変領域と比較して突然変異させた突然変異体のアミノ酸配列を含む。

【 0 2 0 6 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

10

【 0 2 0 7 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 2 0 8 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 2 9、3 0 および 3 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 3 9、4 0 および 4 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

20

【 0 2 0 9 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 3 2、3 3 および 3 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 2 1 0 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

30

【 0 2 1 1 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 2 1 2 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 6 9、7 0 および 7 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 7 9、8 0 および 8 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

40

【 0 2 1 3 】

別の具体的な実施形態では、本発明は、ヒト B M P 6 に結合し、それぞれ配列番号 7 2、7 3 および 7 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 2、8 3 および 8 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列を含む単離抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 2 1 4 】

これらの抗体の各々は、B M P 6 に結合し得るため、V H 配列、V L 配列、全長軽鎖配

50

列および全長重鎖配列（アミノ酸配列およびアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列）を「混合およびマッチさせ」て、本発明の他のBMP6結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片を創出することができる。このような「混合およびマッチさせた」BMP6結合性抗体は、当技術分野で公知の結合アッセイ（例えば、ELISAおよび実施例節に記載される他のアッセイ）を使用して調べることができる。これらの鎖を混合およびマッチさせる場合、特定のVH/VL対合に由来するVH配列を、構造的に類似するVH配列で置き換えるものとする。同様に、特定の全長重鎖/全長軽鎖対合に由来する全長重鎖配列を、構造的に類似する全長重鎖配列で置き換えるものとする。同様に、特定のVH/VL対合に由来するVL配列を、構造的に類似するVL配列で置き換えるものとする。同様に、特定の全長重鎖/全長軽鎖対合に由来する全長軽鎖配列を、構造的に類似する全長軽鎖配列で置き換えるものとする。

10

【0215】

別の態様では、本発明は、表1および/または表14に記載される重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3、ならびに軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3またはこれらの組合せを含むBMP6結合性抗体を提供する。CDR領域は、Kabatシステム（Kabat et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）を使用して、またはChothiaシステム[Chothia et al., 1987 J. Mol. Biol. 196:901-917; およびAl-Lazikani et al., 1997 J. Mol. Biol. 273:927-948]を使用して画定される。

20

【0216】

これらの抗体の各々は、BMP6に結合することが可能であり、抗原結合特異性は、主にCDR1領域、CDR2領域およびCDR3領域によりもたらされることを踏まえると、各抗体は、本発明の他のBMP6結合性結合性分子を創出するのに、VH CDR1配列、VH CDR2配列およびVH CDR3配列、ならびにVL CDR1配列、VL CDR2配列およびVL CDR3配列を「混合およびマッチさせる」ことができる（すなわち異なる抗体に由来するCDRを混合およびマッチさせることができる。但し、VH CDR1、VH CDR2およびVH CDR3、ならびにVL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3を含有しなければならない）。このような「混合およびマッチさせた」BMP6結合性抗体は、当技術分野で公知の結合アッセイおよび実施例に記載される結合アッセイ（例えば、ELISA）を使用して調べることができる。VH CDR配列を混合およびマッチさせる場合、特定のVH配列に由来するCDR1配列、CDR2配列および/またはCDR3配列を、構造的に類似するCDR配列で置き換えるものとする。同様に、VL CDR配列を混合およびマッチさせる場合、特定のVL配列に由来するCDR1配列、CDR2配列および/またはCDR3配列を、構造的に類似するCDR配列で置き換えるものとする。新規のVH配列およびVL配列を、1つまたは複数のVH CDR領域配列および/またはVL CDR領域配列を、本発明のモノクローナル抗体のための、本明細書で示されるCDR配列に由来する構造的に類似する配列で突然変異させることにより創出し得ることが当業者に容易に明らかであろう。

30

40

【0217】

したがって、本発明は、配列番号29、49、69、12、32、52、72または9のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；配列番号10、30、50、70、13、33、53または73のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；配列番号11、31、51、71、14、34、54または74のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；配列番号19、39、59、79、22、42、62または82のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；配列番号20、40、60、80、23、43、63または83のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2

50

；および配列番号 2 1、4 1、6 1、8 1、2 4、4 4、6 4 または 8 4 のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R 3 を含み、抗体が B M P 6 に特異的に結合する、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合領域を提供する。

【0218】

一実施形態では、B M P 6 に特異的に結合する抗体は、表 1 および / または表 1 4 に記載される抗体である。

【0219】

抗体の可変領域または全長鎖が、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる場合、本明細書で使用されるヒト抗体は、特定の生殖細胞系列配列の「産物」であるかまたはそれに「由来する」重鎖もしくは軽鎖可変領域または全長重鎖もしくは軽鎖を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを目的の抗原で免疫化するか、または目的の抗原を伴うファージ上で提示されるヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることを含む。ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列の「産物」であるかまたはそれに「由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、配列がヒト抗体の配列と最も近似する（すなわち同一性が最大である）ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列を選択することにより、それ自体として同定することができる。特定のヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列の「産物」であるかまたはそれに「由来する」ヒト抗体は、例えば、自然発生の体細胞突然変異または部位特異的突然変異の意図的な導入に起因して、生殖細胞系列配列と比較したアミノ酸の差異を含有し得る。しかし、V H フレームワーク領域または V L フレームワーク領域では、選択されたヒト抗体は、典型的には、アミノ酸配列が、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一であり、ヒト抗体を、他の種の生殖細胞系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウス生殖細胞系列配列）と比較した場合、ヒトとして同定するアミノ酸残基を含有する。ある種の場合、ヒト抗体は、アミノ酸配列が、生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % もしくは少なくとも 9 5 %、なおまたは少なくとも 9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % 同一であり得る。組換えヒト抗体は、典型的には、V H フレームワーク領域内または V L フレームワーク領域内のヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と 1 0 アミノ酸以下の差異を提示する。ある種の場合、ヒト抗体は、生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と 5 アミノ酸以下なおまたは 4、3、2 もしくは 1 アミノ酸以下の差異を提示し得る。

【0220】

B M P ファミリーメンバーおよびヘプシジン

一実施形態では、本発明は、B M P 6 に特異的に結合し、抗体である抗体またはその結合性断片を提供する。一実施形態では、抗体またはその結合性断片は、表 1 および / または表 1 4 に記載されている。

【0221】

一実施形態では、抗体またはその結合性断片は、B M P 6 には特異的に結合するが、他の B M P タンパク質（B M P 2、B M P 5 または B M P 7 など）に特異的に結合しない。

【0222】

B M P ファミリー成長因子の分泌型リガンドである B M P 6 は、その成熟活性形態において 3 0 k D a のジスルフィド連結されたホモ二量体である。B M P 6 タンパク質は、T G F - ベータスーパーファミリーのメンバーである。骨形成タンパク質は、骨および軟骨の成長を誘導するそれらの能力について公知である。B M P 6 は、間葉系幹細胞内の全ての骨形成マーカーを誘導することが可能である。

【0223】

骨形成タンパク質（B M P）は、異所性の骨成長を誘導し得る分泌型シグナル伝達分子のファミリーである。B M P は、形質転換成長因子 - ベータ（T G F - ベータ）スーパーファミリーの一部である。B M P は、元来、インビボにおいて、骨外部位の軟骨内骨形成

10

20

30

40

50

を誘導する脱塩骨抽出物の能力により同定された。胚発生初期におけるその発現に基づき、この遺伝子によりコードされる BMP は、初期の発生における役割を提起している。加えて、この BMP が BMP 5 および BMP 7 と近縁であるという事実は、可能な骨誘導活性についての推論をもたらしている。Nature Genetics April ; 4 1 [4] : 3 8 6 - 8 に記載されている通り、BMP 6 のさらなる機能も同定されている。

【 0 2 2 4 】

BMP 6 をノックアウトしたマウスは、生存可能かつ妊娠可能であり、正常な骨発生および軟骨発生を示す。

【 0 2 2 5 】

BMP 6 は、哺乳動物における鉄代謝の主要な調節因子である肝臓により分泌される小型のペプチドであるヘプシジンの重要な調節因子である。ヘプシジンは、十二指腸において吸収される食物中の鉄の量および網内系細胞により放出される鉄の量の両方を制御する。ヘプシジンは、炎症および鉄過負荷を含む様々な刺激により上方調節され、貧血、低酸素症および鉄欠損により下方調節される。

【 0 2 2 6 】

いかなる特定の理論にも束縛されないが、本開示は、ヘプシジン降下療法としての BMP 6 アンタゴニスト抗体が、基礎疾患の罹患率を実質的に増加させ、転帰不良の予測因子となることが多い赤血球生成刺激剤 (ESA) に対する抵抗性を克服することにより、鉄欠乏性貧血を伴う患者に利益をもたらすと予測されることを示唆する。BMP R 1 受容体および BMP R 2 受容体とのその相互作用を介して、これは、受容体の二量体化およびヘプシジンの転写を誘導する。BMP 6 は、肝臓内および筋肉細胞内の HJV 共受容体にも結合する。

【 0 2 2 7 】

したがって、BMP 6 は、ヘプシジンの発現を増大させることが公知である。ヘプシジンは、鉄ホメオスタシスに関与する重要なホルモンであることが公知である。高ヘプシジンレベルは、ACDにおける鉄欠乏赤血球生成と関連する。

【 0 2 2 8 】

国際公開第 2010/056981 号パンフレットは、マウスへの BMP 6 に対する抗体の投与により、ヘプシジンが低下し、鉄が増大することを開示した。

【 0 2 2 9 】

BMP 6 は、当技術分野、例えば Hahn et al. 1992 Genomics 14 : 759 - 62 ; Sauermann et al. 1993 J. Neurosci. Res. 33 : 142 ; Celeste et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 9843 ; Schluesener et al. 1995 Atherosclerosis 113 : 153 ; Gitelman et al. 1994 J. Cell Biol. 126 : 1595 ; Barnes et al. 1997 W. J. Urol. 13 : 337 ; および Hamdy et al. 1997 Cancer Res. 57 : 4427 においてさらに記載されている。

【 0 2 3 0 】

BMP 2 は、他の骨形成タンパク質と同様に、骨および軟骨の発生において重要な役割を果たす。BMP 2 は、ヘッジホッグ経路、TGF-β ータシグナル伝達経路およびサイトカイン-サイトカイン受容体間の相互作用に関与する。BMP 2 は、心筋細胞分化および上皮間葉転換にも関与する。BMP 2 は、Kishimoto et al. 1997 Dev. 124 : 4457 ; Ma et al. 2005 Dev. 132 : 5601 ; Wang et al. Bone 48 : 524 ; および Rosen 2009 Cyt. Growth Fact. Rev. 20 : 475 により言及されている通り、多くの不可欠な役割を有する。したがって、BMP 6 抗体は、BMP 2 に結合しないことが好ましい。

【 0 2 3 1 】

BMP 2 について、とりわけ Sampath et al. 1990 J. Biol. C

10

20

30

40

50

hem. 265:13198; Chen et al. 2004 Growth Factors 22:233; Marie et al. 2002 Histol. Histopath. 17:877; Nickel et al. 2001 J. Bone Joint Surg. 83-A Supp. 1:S7-14; Kirsch et al. 2000 FEBS Lett. 468:215; Kirsch et al. 2000 EMBO J. 19:3314; Gilboa et al. 2000 Mol. Biol. Cell 11:1023においてさらに記載されている。

【0232】

BMP5もTGF-ベータスーパーファミリーのメンバーである。他のBMPと同様に、BMP5も、骨および軟骨の発生を誘導するその能力について公知である。BMP5は、小柱網および視神経頭において発現し、発生および正常な機能において役割を有し得る。BMP5は、肺および肝臓でも発現する。

10

【0233】

BMP5についてのさらなる情報は、当技術分野、例えばHahn et al. 1992 Genomics 14:759; Beck et al. 2003 BMC Neurosci. 2:12; Celeste et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9843; およびSakaue et al. 1996 Biochem. Biophys. Res. Comm. 221:768において公知である。

【0234】

BMP7もTGF-ベータスーパーファミリーのメンバーである。タンパク質のBMPファミリーの他のメンバーと同様に、BMP7は、間葉系細胞の骨および軟骨への形質転換において重要な役割を果たす。BMP7は、SMAD1およびSMAD5のリン酸化を誘導し、これにより多数の骨形成遺伝子の転写を誘導する。

20

【0235】

上記で言及した通り、BMP6をノックアウトしたマウスは、生存可能かつ妊娠可能であり、正常な骨発生および軟骨発生を示す。しかし、BMP7をノックアウトされたマウスは、腎臓、眼および骨の欠損を伴い、生後に死亡する。一方の遺伝子の個別のノックアウトは、心臓発生を改変しないが、BMP6およびBMP7の二重ノックアウトは、心臓における何らかの欠損および遅延を裏付け、胎仔は、心不全で死亡した。BMP7は、線維症と関連する慢性心疾患の進行を阻止するのに重要である。したがって、抗BMP6抗体のBMP7との交差反応性は、所望されない。

30

【0236】

BMP7に関連するさらなる情報は、当技術分野、例えばHahn et al. 1992 Genomics 14:759; Chen et al. 2004 Growth Factors 22:233; Itoh et al. 2001 EMBO J. 20:4132; Zeisberg et al. 2003 Am. J. Physiol. Renal Physiol. 285:F1060; Kallui et al. 2009 J. Clin. Invest. 119:1420; およびWang et al. 2001 J. Am. Soc. Neph. 12:2392において提示されている。

【0237】

ヘプシジンは、HAMP（ヘプシジン抗微生物タンパク質またはペプチド）としても公知のペプチドホルモンである。

40

【0238】

マウス進化における最近の遺伝子複製イベントが、マウスにおける2つの類似するヘプシジン遺伝子であるヘプシジン1およびヘプシジン2の存在をもたらした。Ilyin et al. 2003 FEBS Lett. 542:22-26。マウスヘプシジン2は、哺乳動物ヘプシジンにおいて見出されるいくつかの保存的残基を欠く。Lou et al. 2004 Blood 103:2816-2821。

【0239】

ヘプシジン遺伝子生成物は、鉄ホメオスタシスの維持に関与し、マクロファージ内の鉄

50

保存の調節および腸による鉄吸収に必要である。これらのペプチドは、抗微生物活性を呈する。

【0240】

プレプロタンパク質（またはプレプロホルモンもしくはプレプロヘプシジン）（84アミノ酸）およびプロタンパク質（またはプロホルモンもしくはプロヘプシジン）（60アミノ酸）は、20、22および25アミノ酸の成熟ペプチドにプロセッシングされる。25アミノ酸のペプチドは、肝臓により主に分泌され、鉄代謝の「マスター調節因子」と考えられる。20アミノ酸の代謝物および22アミノ酸の代謝物は、尿中に存在する。ヘプシジンのN末端領域は、機能のために要求され、N末端の5つのアミノ酸の欠失は、機能の喪失を結果としてもたらす。

10

【0241】

活性のヘプシジンペプチドは、それらのベータシート構造を安定化させる分子内結合を形成するシステインに富む。

【0242】

ヘプシジンは、主に肝臓内で合成されるが、少量は、他の組織内でも合成されることが見出されている。Bekri et al. 2006 Gastroent. 131: 788 - 96。

【0243】

25アミノ酸のヘプシジンペプチドは、肝臓により主に分泌され、鉄代謝の「マスター調節因子」と考えられる。ヘプシジンは、消化管の腸細胞の基底外側表面上および網内系細胞（マクロファージ）の細胞膜上に位置する、鉄移出チャネルであるフェロポルチンへの結合により鉄輸送を阻害する。フェロポルチンを阻害することにより、ヘプシジンは、腸の腸細胞が鉄を肝臓内門脈系へ分泌することを防止し、これにより鉄吸収を機能的に低減する。フェロポルチン阻害は、マクロファージからの鉄放出も防止し、したがって、ヘプシジンは、鉄ホメオスタシスを維持する。ヘプシジン活性は、部分的に、炎症性腸疾患、慢性心不全、癌腫、関節リウマチおよび腎不全などの慢性炎症性貧血において見られる鉄隔離の一因ともなる。

20

【0244】

ヘプシジン遺伝子内の突然変異は、心筋症、肝硬変および内分泌不全を結果としてもたらす重度の鉄過負荷により引き起こされる疾患である、若年性ヘモクロマトーシスとしても公知の2B型ヘモクロマトーシスを引き起こす。若年性ヘモクロマトーシス症例の大部分は、ヘプシジン産生の調節因子であるヘモジュベリン内の突然変異に起因する。

30

【0245】

ヘプシジンを過剰発現させるように操作された遺伝子改変マウスは、重度の鉄欠損により生後直ちに死亡することから、鉄調節における中心的かつ非冗長的役割が示唆される。ヘプシジンを炎症性貧血に関連付けた最初の証拠は、研究者らが、鉄補充物質に対して応答しない、重度の小球性貧血を伴う肝臓腫瘍を伴う2例の患者に由来する組織を検討したときに得られた。腫瘍組織がヘプシジンを過剰産生し、手術により腫瘍を除去したところ貧血が治癒した。

【0246】

鉄を十分に吸収できないことが鉄欠損および鉄欠損性貧血に寄与する疾患は多い。ヘプシジンが腸内吸収を遮断する場合、経口処置は、無効となる可能性が高いため、処置は、ヘプシジンレベルに依存する。

40

【0247】

一実施形態では、BMP6に対する抗体またはその結合性断片の投与は、ヘプシジンの活性および/またはレベルを低減するため、貧血のための処置において有用である。一実施形態では、本発明は、ヘプシジンの活性またはレベルの低減を、それを必要とする患者において行う方法であって、BMP6に対する抗体またはその抗原結合性断片を患者に投与するステップを含む方法に関する。一実施形態では、ヘプシジンの活性またはレベルを少なくとも50%低減する。

50

【 0 2 4 8 】

BMP6抗体など、ヘプシジンに対する阻害剤を使用してヘプシジン関連疾患を処置することができる。ヘプシジン関連疾患は、ヘプシジンならびに／または野生型ヘプシジンおよび／もしくは突然変異体ヘプシジンの突然変異および／もしくは過剰発現と関連する任意の疾患、ならびに／あるいはヘプシジンならびに／または野生型ヘプシジンおよび／もしくは突然変異体ヘプシジンの突然変異および／もしくは過剰発現の存在、ならびに／あるいは尿を介するヘプシジンの腎からの消失の低減により疾患の進行が増強されるか、または予後診断が増悪する疾患を含む。ヘプシジン関連疾患の非限定的な例は、貧血、鉄欠損赤血球生成、低鉄血症、食物中の鉄の取込み機能障害、鉄隔離、炎症性貧血（AI）、アテローム性動脈硬化、糖尿病ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病およびフリードライヒ運動失調症などの多発性神経変性障害、心不全、慢性腎疾患、心腎貧血症候群、感染、失血、溶血、ビタミンB12欠損または葉酸塩欠損、副甲状腺機能亢進症、異常ヘモグロビン症および悪性腫瘍、がん、AIDS、手術、発育不全ならびに／または脱毛を含む。一実施形態では、対象は、透析患者である。一実施形態では、ヘプシジン関連疾患は、貧血であり、対象は、透析患者である。慢性血液透析集団内の鉄剤不応性貧血およびESA不応性貧血の有病率が高い。

10

【 0 2 4 9 】

貧血は、とりわけ慢性疾患性貧血（ACD）、慢性腎疾患（CKD）性貧血、がん性貧血、赤血球生成刺激剤（ESA）抵抗性貧血および／または鉄欠乏性貧血を含む。

【 0 2 5 0 】

CKD性貧血は、慢性腎疾患の一般的な初期の合併症である。がん性貧血は、血液悪性腫瘍および一部の充実性腫瘍により引き起こされる。本明細書で規定される通り、この用語は、化学療法剤により引き起こされる貧血である化学療法誘導性貧血も含む。慢性腎疾患における貧血は、糖尿病性神経障害、心血管疾患、網膜症および他の問題を増悪させ得る。がん関連貧血は、死の危険性の増大と関連する。

20

【 0 2 5 1 】

がん、腎疾患および自己免疫障害などの一部の慢性疾患は、貧血をもたらす得る。過剰反応性の炎症性サイトカインは、鉄ホメオスタシスの調節異常、赤血球生成の低減および赤血球の寿命の短縮を引き起こし得る。貧血のための一部の処置は、ESA、エリスロポエチン、鉄（食物中の補充物質としての）の投与または輸血を含む。

30

【 0 2 5 2 】

ヘプシジンは、鉄ホメオスタシスに関与する重要なホルモンである。高レベルのヘプシジンは、ACDにおける鉄欠乏赤血球生成と関連している。BMP6は、ヘプシジンの発現を増大させることが公知である。

【 0 2 5 3 】

BMP6に対する多様な種類の抗体およびそれらの抗原結合性断片について下記で記載する。

【 0 2 5 4 】

相同抗体

さらに別の実施形態では、本発明は、表1および／または表14に記載される配列と相同なアミノ酸配列を含む抗体またはその抗原結合性断片を提供し、前記抗体は、BMP6に結合し、表1および／または表14に記載される抗体の所望の機能的な特性を保持する。

40

【 0 2 5 5 】

例えば、本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域が、配列番号16、36、56または76からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；軽鎖可変領域が、配列番号26、46、66または86からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；抗体がBMP6タンパク質に特異的に結合し、抗体が、当技術分野で公知の溶血アッセイにおいて赤血球溶解を阻害し得る、単離モノクローナル抗体（またはその機能的な抗原結合

50

性断片)を提供する。具体例では、このような抗体は、100 pMのヒトBMP6で再構成されたヒトBMP6枯渇血清を使用する場合、溶血アッセイにおいて20~200 pMのIC₅₀値を有する。

【0256】

一実施形態では、VHアミノ酸配列および/またはVLアミノ酸配列は、表1および/または表14に示される配列と50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。一実施形態では、VHアミノ酸配列および/またはVLアミノ酸配列は、1、2、3、4または5カ所以下のアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を除き同一であり得る。表1および/または表14に記載されている抗体のVH領域およびVL領域と大きい(すなわち80%以上の)同一性を有するVH領域およびVL領域を有する抗体は、配列番号16、36、56または76および配列番号26、46、66または86のそれぞれをコードする核酸分子の突然変異誘発(例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発)後、本明細書に記載される機能アッセイを使用して、コードされる改変抗体を機能の保持について調べることであり得る。

10

【0257】

一実施形態では、全長重鎖アミノ酸配列および/または全長軽鎖アミノ酸配列は、表1および/または表14に示される配列と50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。配列番号18、38、58または78のいずれかの全長重鎖および配列番号28、48、68または88のいずれかの全長軽鎖と大きい(すなわち80%以上の)同一性を有する全長重鎖および全長軽鎖を有する抗体は、このようなポリペプチドをコードする核酸分子の突然変異誘発(例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発)後、本明細書に記載される機能アッセイを使用して、コードされる改変抗体を機能の保持について調べることであり得る。

20

【0258】

一実施形態では、全長重鎖ヌクレオチド配列および/または全長軽鎖ヌクレオチド配列は、表1および/または表14に示される配列と60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。

【0259】

一実施形態では、重鎖ヌクレオチド配列および/または軽鎖ヌクレオチド配列の可変領域は、表1および/または表14に示される配列と60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。

30

【0260】

本明細書で使用される2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮する配列により共有される同一の位置の数の関数(すなわち同一性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100)である。2つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、下記の非限定的な例で記載されている数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0261】

さらにまたは代わりに、本発明のタンパク質配列は、公表されたデータベースに照らして検索を実施する、例えば関連の配列を同定するための「クエリー配列」としてさらに使用することもできる。例えば、このような検索は、Altschulet al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10によるBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して実施することができる。

40

【0262】

保存的修飾を伴う抗体

一実施形態では、本発明の抗体は、CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む重鎖可変領域と、CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域とを有し、これらのCDR配列の1つまたは複数は、本明細書に記載される抗体または

50

その保存的修飾に基づいて指定されたアミノ酸配列を有し、抗体は、本発明のBMP6結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片の所望の機能的特性を保持する。したがって、本発明は、CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む重鎖可変領域と、CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域とからなり、配列番号29、49、69、12、32、52、72もしくは9またはその保存的変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；配列番号10、30、50、70、13、33、53もしくは73またはその保存的変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；配列番号11、31、51、71、14、34、54もしくは74またはその保存的変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；配列番号19、39、59、79、22、42、62もしくは82またはその保存的変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；配列番号20、40、60、80、23、43、63もしくは83またはその保存的変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2；および配列番号21、41、61、81、24、44、64もしくは84またはその保存的変異体のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3；抗体またはその抗原結合性断片がBMP6タンパク質に特異的に結合し、溶血アッセイにおいて赤血球溶解を阻害する、単離モノクローナル抗体またはその機能的な抗原結合性断片を提供する。

10

【0263】

一実施形態では、哺乳動物細胞内の発現のために最適化された本発明の抗体は、全長重鎖配列および全長軽鎖配列を有し、これらの配列の1つまたは複数は、本明細書に記載される抗体またはその保存的修飾に基づいて指定されたアミノ酸配列を有し、抗体は、本発明のBMP6結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片の所望の機能的特性を保持する。したがって、本発明は、哺乳動物細胞内の発現のために最適化された単離モノクローナル抗体であって、全長重鎖および全長軽鎖からなり、全長重鎖が、配列番号18、38、58または78の群から選択されたアミノ酸配列およびこれらの保存的修飾を有し；全長軽鎖が、配列番号28、48、68または88の群から選択されたアミノ酸配列およびこれらの保存的修飾を有し；抗体がBMP6タンパク質に特異的に結合し、抗体が、本明細書に記載される溶血アッセイにおいて赤血球溶解を阻害する、単離モノクローナル抗体を提供する。具体的な実施形態では、このような抗体は、100pMのヒトBMP6で再構成されたヒトBMP6枯渇血清を使用する場合、溶血アッセイにおいて20~200pMのIC₅₀値を有する。

20

30

【0264】

同じエピトープに結合する抗体

本発明は、表1および/または表14に列举されているBMP6結合性抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。抗体7が結合するエピトープを図5に示す。したがって、BMP6結合アッセイにおいて、本発明の他の抗体およびそれらの抗原結合性断片と交差競合する（例えば、本発明の他の抗体およびそれらの抗原結合性断片の結合を統計学的に有意に競合的に阻害する）それらの能力に基づき、さらなる抗体を同定することができる。本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片のBMP6タンパク質への結合を阻害する被験抗体の能力により、被験抗体は、その抗体とBMP6への結合について競合することが可能であり、このような抗体は、非限定的な理論によれば、BMP6上のそれが競合する抗体と同じであるかまたは関連の（例えば、構造的に類似するかまたは空間的に近接した）エピトープに結合し得ることが裏付けられる。ある種の実施形態では、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片と同じBMP6上のエピトープに結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このようなヒトモノクローナル抗体は、本明細書に記載される通りに調製および単離することができる。

40

【0265】

抗原上の所望のエピトープを決定したら、例えば本発明で記載される技法を使用して、そのエピトープに対する抗体を作り出すことが可能である。代わりに、発見過程において

50

、抗体の作出および特徴付けにより、所望のエピトープについての情報を解明することもできる。次いで、この情報から抗体を同じエピトープへの結合について競合的にスクリーニングすることが可能である。これを達成する手法は、互いに競合的に結合する抗体、例えば抗原への結合について競合する抗体を見出す交差競合研究を行うことである。それらの交差競合に基づき、抗体を「ピニング」するハイスループット過程について、国際公開第2003/48731号パンフレットにおいて記載されている。当業者により察知される通り、抗体が特異的に結合し得る事実上いかなるものも、エピトープであり得るであろう。エピトープは、抗体が結合する残基を含み得る。

【0266】

一般に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、タンパク質および/または高分子の複合混合物における標的抗原上のエピトープを優先的に認識するであろう。

【0267】

エピトープを含む所与のポリペプチドの領域は、当技術分野で周知の任意の数のエピトープマッピング法を使用して同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jerseyを参照されたい。例えば、直鎖状エピトープは、例えば、固体支持体上において、タンパク質分子の部分に対応する多数のペプチドを共時的に合成し、ペプチドをなおも支持体へ接合させながら、ペプチドを抗体と反応させることにより決定することができる。当技術分野では、このような技法が公知であり、例えば米国特許第4,708,871号明細書; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182; Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23:709-715において記載されている。同様に、コンフォメーションエピトープは、例えば、水素/重水素交換、x線結晶構造解析および二次元核磁気共鳴などにより、アミノ酸BMP6の空間的コンフォメーションを決定することにより容易に同定される。例えば、Epitope Mapping Protocols、前出を参照されたい。タンパク質の抗原性領域は、例えば、The Oxford Molecular Groupから入手可能なOmigaバージョン1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算されるプロットなど、標準的な抗原性/疎水性プロットを使用して同定することもできる。このコンピュータプログラムは、抗原性プロファイルを決めるためのホップ/ウッズ法、Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828、および疎水性プロットのためのカイト-ドゥーリトル法、Kyte-Doolittle technique, Kyte et al., (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132を利用する。

【0268】

操作抗体および修飾抗体

出発抗体から改変された特性を有し得る修飾抗体を操作する出発材料として、本明細書で示されるVH配列および/またはVL配列の1つまたは複数を有する抗体を使用して本発明の抗体をさらに調製することができる。抗体は、一方または両方の可変領域(すなわちVHおよび/またはVL)内、例えば1つもしくは複数のCDR領域内および/または1つもしくは複数のフレームワーク領域内の1つまたは複数の残基を修飾することにより操作することができる。さらにまたは代わりに、抗体は、定常領域内の残基を修飾して、例えば抗体のエフェクター機能を改変することによっても操作することができる。

【0269】

実施し得る可変領域操作の1つの種類は、CDRグラフトイングである。抗体は、主に6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)内に位置するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。この理由のため、CDR内のアミノ酸配列は、個別の抗体間の多様性がCDRの外部の配列より大きい。CDR配列は、大半の抗体-抗原間相互作用の一因

となるため、異なる特性を伴う異なる抗体に由来するフレームワーク配列へグラフトされた特異的自然発生抗体に由来するCDR配列を含む発現ベクターを構築することにより、特異的自然発生抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である（例えば、Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86:10029-10033; Winterによる米国特許第5,225,539号明細書、ならびにQueenらによる米国特許第5,530,101号明細書；同第5,585,089号明細書；同第5,693,762号明細書；および同第6,180,370号明細書を参照されたい）。

10

【0270】

このようなフレームワーク配列は、ゲルミン抗体遺伝子配列を含む公表されたDNAデータベースまたは公表された参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子のゲルミンDNA配列は、ヒト生殖細胞系列の配列データベースである「VBase」（インターネットのwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで入手可能である）、ならびにそれらの各々の内容が参照により本明細書に明示的に組込まれるKabat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M. et al., 1992 J. mol. Biol. 227:776-798; およびCox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J. Immunol. 24:827-836にも見出すことができる。

20

【0271】

本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片における使用のためのフレームワーク配列の例は、本発明の選択された抗体およびそれらの抗原結合性断片により使用されるフレームワーク配列、例えば本発明のモノクローナル抗体により使用されるコンセンサス配列および/またはフレームワーク配列と構造的に類似するフレームワーク配列である。VH CDR1配列、VH CDR2配列およびVH CDR3配列ならびにVL CDR1配列、VL CDR2配列およびVL CDR3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子内で見出される配列と同一の配列を有するフレームワーク領域へグラフトすることもでき、CDR配列は、生殖細胞系列配列と比較して1つまたは複数の突然変異を含有するフレームワーク領域へグラフトすることもできる。例えば、ある種の場合、フレームワーク領域内の残基を突然変異させて、抗体の抗原結合能力を維持または増強することが有益であると見出されている（例えば、Queenらによる米国特許第5,530,101号明細書；同第5,585,089号明細書；同第5,693,762号明細書；および同第6,180,370号明細書を参照されたい）。

30

【0272】

可変領域修飾の別の種類は、「アフィニティー成熟」として公知である、VH CDR1領域内、VH CDR2領域内および/もしくはVH CDR3領域内ならびに/またはVL CDR1領域内、VL CDR2領域内および/もしくはVL CDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させて、これにより目的の抗体の1つまたは複数の結合特性（例えば、アフィニティー）を改善することである。部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発を実施して突然変異を導入することができ、本明細書に記載され、実施例でも提示されるインビトロアッセイまたはインビボアッセイにおいて抗体結合性または他の目的の機能的特性に対する効果を査定することができる。保存的修飾（上記で論じた）を導入することができる。突然変異は、アミノ酸の置換の場合もあり、付加の場合もあり、欠失の場合もある。さらに、CDR領域内の典型的には1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ以下の残基も改変する。

40

【0273】

50

抗原結合性ドメインの代替的なフレームワークまたはスキャフォールドへのグラフティング

結果として得られるポリペプチドが、BMP6に特異的に結合する少なくとも1つの結合性領域を含む限り、多様な抗体/免疫グロブリンのフレームワークまたはスキャフォールドを利用することができる。このようなフレームワークまたはスキャフォールドは、ヒト免疫グロブリン、それらの抗原結合性断片の5つの主要なイデオタイプを含み、好ましくはヒト化側面を有する他の動物種の免疫グロブリンを含む。この点で、ラクダ科動物において同定される単一重鎖抗体などの単一重鎖抗体は、特に興味深い。当業者により、新規のフレームワーク、スキャフォールドおよび断片が発見および開発され続けている。

【0274】

一態様では、本発明は、本発明のCDRをグラフトし得る非免疫グロブリンスキャフォールドを使用して非免疫グロブリンベースの抗体を作り出す方法に関する。それらが標的のBMP6タンパク質に特異的な結合性領域を含む限り、公知または将来の非免疫グロブリンフレームワークおよび非免疫グロブリンスキャフォールドを利用することができる。公知の非免疫グロブリンフレームワークまたは非免疫グロブリンスキャフォールドは、フィブロネクチン(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.), アンキリン(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、ドメイン抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, Mass.; およびAblynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、リボカリン(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、低分子モジュラー免疫医薬(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.), マキシボディ(Avidia, Inc., Mountain View, Calif.), プロテインA(Affibody AG, Sweden)およびアフィリン(ガンマ-クリスタリンまたはユビキチン)(Sci Proteins GmbH, Halle, Germany)を含むが、これらに限定されない。

【0275】

フィブロネクチンスキャフォールドは、III型フィブロネクチンドメイン(例えば、III型フィブロネクチンの第10モジュール(10Fn3ドメイン))に基づく。III型フィブロネクチンドメインは、それら自体が互いに対してパックされてタンパク質のコアを形成し、ベータ鎖を互いに接続し、溶媒へ露出されるループもさらに含有する(CDRと類似する)、2つのベータシート間に分配された7つまたは8つのベータ鎖を有する。ベータシートサンドイッチの各エッジには、少なくとも3つのこのようなループがあり、エッジは、ベータ鎖の方向に対して垂直なタンパク質の境界である(米国特許第6,818,418号明細書を参照されたい)。全体的なフォールドは、ラクダおよびラマIgG内の抗原認識単位全体を含む最小の機能的抗体断片である重鎖可変領域のフォールドと密接に関連するが、これらのフィブロネクチンベースのスキャフォールドは、免疫グロブリンではない。この構造のために、非免疫グロブリン抗体は、性質およびアフィニティーが抗体の性質およびアフィニティーと類似する抗原結合特性を模倣する。これらのスキャフォールドは、インビボにおける抗体のアフィニティー成熟の工程と類似する、インビトロにおけるループのランダム化戦略およびシャフリング戦略において使用することができる。これらのフィブロネクチンベースの分子は、標準的なクローニング法を使用して、分子のループ領域を本発明のCDRで置き換え得るスキャフォールドとして使用することができる。

【0276】

アンキリン技術は、アンキリンに由来するリピートモジュールを伴うタンパク質を、異なる標的への結合に使用し得る可変領域を保有するスキャフォールドとして使用することに基づく。アンキリンリピートモジュールは、2つのアンチパラレルのアルファ-ヘリックスおよびベータ-ターンからなる33アミノ酸のポリペプチドである。可変領域の結合は、リボソームディスプレイを使用することにより大部分が最適化される。

【0277】

アビマーは、LRP-1などの天然のAドメイン含有タンパク質に由来する。これらのドメインは、本来、タンパク質間相互作用に使用され、ヒトでは250を超えるタンパク質が構造的にAドメインに基づく。アビマーは、アミノ酸リンカーを介して連結された多数の(2つ~10の)異なる「Aドメイン」単量体からなる。標的抗原に結合し得るアビマーは、例えば、米国特許出願公開第20040175756号明細書；同第20050053973号明細書；同第20050048512号明細書；および同第20060008844号明細書において記載されている方法を使用して創出することができる。

【0278】

アフィニティリガンドであるアフィボディは、プロテインAのIgG結合性ドメインの1つのスキヤフォールドに基づく3ヘリックスバンドルからなる低分子の単純なタンパク質である。プロテインAは、細菌である黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)に由来する表面タンパク質である。このスキヤフォールドドメインは、それらの13が多数のリガンド変異体を伴うアフィボディライブラリーを作り出すランダム化されている58アミノ酸からなる(例えば、米国特許第5,831,012号明細書を参照されたい)。アフィボディ分子は、抗体を模倣し、150kDaである抗体の分子量と比較して分子量が6kDaである。その小サイズにもかかわらず、アフィボディ分子の結合部位は、抗体の結合部位と同様である。

【0279】

アンチカリンは、Pieris ProteoLab AG社により開発された生成物である。アンチカリンは、通例、化学的に感受性の化合物または不溶性の化合物の生理学的輸送または貯蔵に関与する、広範にわたる低分子の頑健なタンパク質群であるリボカリンに由来する。いくつかの天然リボカリンは、ヒト組織内またはヒト体液中で生じる。タンパク質のアーキテクチャーは、リジッドフレームワークの上部の超可変ループを伴う免疫グロブリンを連想させる。しかし、抗体またはそれらの組換え断片とは対照的に、リボカリンは、単一の免疫グロブリンドメインよりかろうじて大きい160~180アミノ酸残基を伴う単一のポリペプチド鎖からなる。結合性ポケットを構成する4つのループのセットは、顕著な構造可塑性を示し、様々な側鎖を許容する。したがって、異なる形状の規定の標的分子を高度なアフィニティおよび特異性で認識するために、結合性部位を独自の工程で再形成することができる。4つのループのセットを突然変異誘発することによりアンチカリンを開発するのには、リボカリンファミリーの1つのタンパク質であるオオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)のピリン結合性タンパク質(BBP)が使用されている。アンチカリンについて記載する特許出願の1つの例は、国際公開第199916873号パンフレットにある。

【0280】

アフィリン分子は、タンパク質および低分子に対する特異的なアフィニティのために設計された低分子非免疫グロブリンタンパク質である。新たなアフィリン分子は、それらの各々が異なるヒト由来のスキヤフォールドタンパク質に基づく2つのライブラリーから非常に迅速に選択することができる。アフィリン分子は、免疫グロブリンタンパク質に対するいかなる構造相同性も示さない。現在、2つのアフィリンスキヤフォールドが利用されており、それらの一方は、ヒト水晶体の構造タンパク質であるガンマクリスタリンであり、他方は、「ユビキチン」スーパーファミリータンパク質である。いずれのヒトスキヤフォールドも非常に小型であり、高度な熱安定性を示し、pH変化および変性剤に対してほぼ耐性である。この高度な安定性は、主にタンパク質のベータシート構造の展開に起因する。ガンマクリスタリンに由来するタンパク質の例は、国際公開第200104144号パンフレットにおいて記載されており、「ユビキチン様」タンパク質の例は、国際公開第2004106368号パンフレットにおいて記載されている。

【0281】

タンパク質エピトープ模倣体(PEM)は、タンパク質間相互作用に関与する主要な二次構造である、タンパク質のベータ-ヘアピン二次構造を模倣する中程度のサイズの環状ペプチド様分子(分子量:1~2kDa)である。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 2 】

ヒト B M P 6 結合性抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して作り出すことができる。例えば、非ヒト抗体を操作ヒト抗体へ転換するのに使用されるヒト化技術である。米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 0 8 6 2 5 号明細書は、非ヒト抗体の結合特徴と比べて同じ結合特徴または良好な結合特徴を維持しながら、抗体内の非ヒト抗体の可変領域をヒト可変領域で置き換えるためのインビボ法について記載している。方法は、非ヒト基準抗体の可変領域の、完全ヒト抗体によるエピトープ誘導型置換に依拠する。結果として得られるヒト抗体は、一般に、基準非ヒト抗体と構造的に非類縁であるが、基準抗体と同じ抗原上の同じエピトープに結合する。略述すると、逐次的エピトープ誘導型相補性置換法は、被験抗体の抗原への結合に応答するレポーター系の存在下において、限られた量の抗原への結合について、「競合体」と、基準抗体の多様なハイブリッド体のライブラリー（「被験抗体」）との細胞内の競合を準備することにより可能となる。競合体は、単鎖 F v 断片などの基準抗体またはその誘導体であり得る。競合体は、基準抗体と同じエピトープに結合する抗原の天然リガンドまたは人工リガンドでもあり得る。競合体の唯一の要件は、それが基準抗体と同じエピトープに結合し、基準抗体と抗原結合について競合することである。被験抗体は、非ヒト基準抗体に由来する 1 つの共通の抗原結合性 V 領域と、ヒト抗体のレパートリーライブラリーなどの多様な供給源からランダムに選択される他の V 領域とを有する。基準抗体に由来する共通の V 領域は、選択に対して、基準抗体に対する最高の抗原結合性忠実度へのバイアスをかけるように、被験抗体を抗原上の同じエピトープに同じ配向性で配置するガイドとして用いられる。

10

20

【 0 2 8 3 】

多くの種類のレポーター系を使用して、被験抗体と抗原との所望の相互作用を検出することができる。例えば、相補的レポーター断片は、断片の相補性によるレポーターの活性化が、被験抗体が抗原に結合する場合に限り生じるように抗原および被験抗体のそれぞれに連結することができる。被験抗体 - レポーター断片と抗原 - レポーター断片との融合体を競合体と共発現させる場合、レポーターの活性化は、被験抗体が競合体と競合する能力であって、被験抗体の抗原に対するアフィニティーと比例する能力に依存する。使用し得る他のレポーター系は、米国特許出願第 1 0 / 2 0 8 , 7 3 0 号明細書（公開第 2 0 0 3 0 1 9 8 9 7 1 号）において開示されている自己阻害レポーター再活性化の再活性化因子（R A I R 系）または米国特許出願第 1 0 / 0 7 6 , 8 4 5 号明細書（公開第 2 0 0 3 0 1 5 7 5 7 9 号）において開示されている競合活性化系を含む。

30

【 0 2 8 4 】

逐次的エピトープ誘導型相補性置換系では、単一の被験抗体を、競合体、抗原およびレポーター成分と共に発現する細胞を同定するように選択を行う。これらの細胞内では、各被験抗体は、限られた量の抗原への結合について競合体と一対一で競合する。レポーターの活性は、被験抗体に結合した抗原の量に比例し、被験抗体に結合した抗原の量は、被験抗体の抗原に対するアフィニティーおよび被験抗体の安定性と比例する。被験抗体はまず、被験抗体として発現させる場合の基準抗体の活性と比べたそれらの活性に基づいて選択する。選択の第 1 ラウンドの結果は、それらの各々が基準抗体に由来する同じ非ヒト V 領域と、ライブラリーに由来するヒト V 領域とから構成され、それらの各々が抗原上の基準抗体と同じエピトープに結合する「ハイブリッド」抗体のセットである。第 1 ラウンドで選択されるハイブリッド抗体の 1 つまたは複数は、抗原に対して、基準抗体のアフィニティー以上のアフィニティーを有するであろう。

40

【 0 2 8 5 】

第 2 の V 領域置き換えステップでは、第 1 のステップで選択されたヒト V 領域を、残りの非ヒト基準抗体 V 領域のコグネイトヒト V 領域の多様なライブラリーによるヒト置換体を選択するためのガイドとして使用する。第 1 ラウンドで選択されたハイブリッド抗体は、選択の第 2 ラウンドのための競合体としても使用することができる。選択の第 2 ラウンドの結果は、基準抗体と構造的に異なるが、同じ抗原への結合について基準抗体と競合する完全ヒト抗体のセットである。選択されたヒト抗体の一部は、基準抗体と同じ抗原上の

50

同じエピトープに結合する。これらの選択されたヒト抗体のうち、1つまたは複数は、同じエピトープに対し、基準抗体のアフィニティーと同等以上のアフィニティーで結合する。

【0286】

上記で記載したマウスBMP6結合性抗体またはキメラBMP6結合性抗体の1つを基準抗体として使用するこの方法は、ヒトBMP6に同じまたはより良好な結合特異性および同じまたはより良好な結合アフィニティーで結合するヒト抗体を作り出すのに容易に利用することができる。加えて、このようなヒトBMP6結合性抗体は、ヒト抗体をカスタムで作製する企業、例えばKalobios, Inc. (Mountain View, Calif.) から購入することもできる。

【0287】

ラクダ科動物抗体

ラマ種(アルパカ(Lama paccos)、ラマ(Lama glama)およびビクーニャ(Lama vicugna))などの新世界メンバー含む、ラクダおよびヒトコブラクダ(dromedary)(フタコブラクダ(Camelus bactrianus)およびヒトコブラクダ(Calaelus dromaderius))ファミリーのメンバーから得られる抗体タンパク質は、サイズ、構造的複雑性およびヒト対象に対する抗原性に関して特徴付けられている。天然で見出されるこのファミリーの哺乳動物に由来するある種のIgG抗体は、軽鎖を欠き、したがって他の動物に由来する抗体の場合の2つの重鎖および2つの軽鎖を有する典型的な4つの鎖の四次構造と構造的に異なる。PCT/欧州特許第93/02214号明細書(1994年3月3日に公表された国際公開第94/04678号パンフレット)を参照されたい。

【0288】

VHHとして同定される小型の単一の可変ドメインであるラクダ科動物抗体の領域は、標的に対して高いアフィニティーを有する低分子タンパク質をもたらすことから、「ラクダ科動物ナノボディ」として公知の低分子量抗体由来タンパク質を結果としてもたらす遺伝子操作により得ることができる。1998年6月2日に取得された米国特許第5,759,808号明細書を参照されたい。また、Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279:1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424:783-788; Pleschberger, M. et al., 2003 Bioconjugate Chem 14:440-448; Cortez-Retamozo, V. et al., 2002 Int J Cancer 89:456-62; および Lauwereys, M. et al., 1998 EMBO J 17:3512-3520も参照されたい。ラクダ科動物抗体および抗体断片の操作ライブラリーは、例えば、Ablynx, Ghent, Belgiumから市販されている。非ヒト由来の他の抗体および抗原結合性断片と同様に、ラクダ科動物抗体のアミノ酸配列は、ヒト配列により酷似する配列を得るように組換えにより改変することができ、すなわちナノボディは、「ヒト化」することができる。したがって、ヒトに対するラクダ科動物抗体の天然の小さい抗原性をさらに低減することができる。

【0289】

ラクダ科動物ナノボディの分子量は、ヒトIgG分子の分子量の約10分の1であり、タンパク質の物理的直径は、数ナノメートルに過ぎない。サイズが小さいことの1つの帰結は、大型の抗体タンパク質には機能的に不可視である抗原性部位に結合するラクダ科動物ナノボディの能力であり、すなわち、ラクダ科動物ナノボディは、古典的な免疫学的技法を使用する他には隠蔽されたままの抗原を検出する試薬として有用であり、可能な治療剤として有用である。したがって、サイズが小さいことのさらに別の帰結は、ラクダ科動物ナノボディが標的タンパク質のグループ内または狭小なクレフト内の特異的部位に結合することの結果として、標的タンパク質を阻害することが可能であり、したがって、古典的な抗体の機能よりも、古典的な低分子量の薬物の機能により酷似する能力において用いられ得ることである。

【0290】

10

20

30

40

50

低分子量およびコンパクトなサイズは、熱安定性が極めて大きく、極端な pH およびタンパク質分解性消化に対して安定的であり、抗原性が小さいラクダ科動物ナノボディを結果としてさらにもたらす。別の帰結は、ラクダ科動物ナノボディが循環系から組織へ容易に移動し、血液脳関門もなお越え、神経組織に影響を及ぼす障害も処置し得ることである。ナノボディは、血液脳関門を越える薬物輸送もさらに容易にし得る。2004年8月19日に公表された米国特許出願公開第20040161738号明細書を参照されたい。これらの特色を、ヒトに対する抗原性が小さいことと組み合わせることにより、大きい治療的可能性が示される。さらに、これらの分子は、大腸菌(E. coli)などの原核細胞内で完全に発現させることができ、バクテリオファージとの融合タンパク質として発現させ、機能的である。

10

【0291】

したがって、本発明の特色は、BMP6に対して高いアフィニティーを有するラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディである。本明細書の一実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディは、天然ではラクダ科動物において産生される、すなわち他の抗体について本明細書に記載される技法を使用する、BMP6またはそのペプチド断片による免疫化後にラクダ科動物により産生される。代わりに、BMP6結合性ラクダ科動物ナノボディは、操作もされる、すなわち例えば本明細書の実施例において記載されている、標的としてのBMP6を伴うパニング手順を使用する適切に突然変異誘発されたラクダ科動物ナノボディタンパク質を提示するファージライブラリーからの選択によっても作製される。操作されたナノボディは、遺伝子操作により、レシピエント対象における半減期が45分間~2週間となるようにさらにカスタマイズすることもできる。具体的な実施形態では、ラクダ科動物抗体またはラクダ科動物ナノボディを、例えばPCT/欧州特許第93/02214号明細書において記載されている通り、本発明のヒト抗体の重鎖または軽鎖のCDR配列をナノボディまたは単一ドメイン抗体フレームワーク配列へグラフトすることにより得る。

20

【0292】

二特異性分子および多価抗体

別の態様では、本発明は、本発明のBMP6結合性抗体またはその断片を含む二特異性分子または多特異性分子を特色とする。本発明の抗体またはその抗原結合性領域は、少なくとも2つの異なる結合性部位または標的分子に結合する二特異性分子を作り出すように誘導体化することもでき、別の機能的分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質(例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド)に連結することもできる。本発明の抗体は、実際に、3つ以上の異なる結合性部位および/または標的分子に結合する多特異性分子を作り出すように誘導体化することもでき、他の2つ以上の機能的分子に連結することもでき、このような多特異性分子は、本明細書で使用される「二特異性分子」という用語により包含されることも意図される。本発明の二特異性分子を創出するには、本発明の抗体を、二特異性分子が結果として得られるように別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合性模倣体などの1つまたは複数の他の結合性分子へ機能的に連結する(例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合により、または他の方法で)ことができる。

30

【0293】

したがって、本発明は、BMP6に対する少なくとも1つの第1の結合特異性および第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二特異性分子を含む。例えば、第2の標的エピトープは、第1の標的エピトープと異なるBMP6の別のエピトープである。

40

【0294】

さらに、二特異性分子が多特異性である本発明では、分子は、第1の標的エピトープおよび第2の標的エピトープに加えて、第3の結合特異性もさらに含み得る。

【0295】

一実施形態では、本発明の二特異性分子は、結合特異性として、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fvまたは単鎖Fvを含む少なくとも1つの抗体またはその抗体断片を含む。抗体は、軽鎖もしくは重鎖の二量体、またはLadnerら、米国特許第4,94

50

6, 778号明細書において記載されているFvもしくは単鎖構築物など、その任意の最小断片でもあり得る。

【0296】

ダイアボディは、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能とするには短すぎるリンカーにより接続されたVHドメインおよびVLドメインを単一のポリペプチド鎖上で発現させた二価の二特異性分子である。VHドメインおよびVLドメインは、別の鎖の相補的なドメインと対合し、これにより2つの抗原結合性部位を創出する(例えば、Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poijak et al., 1994 Structure 2: 1121-1123を参照されたい)。ダイアボディは、VHA-VLBおよびVHB-VLA構造(VH-VL立体配置)またはVLA-VHBおよびVLB-VHA構造(VL-VH立体配置)を伴う2つのポリペプチド鎖を同じ細胞内で発現させることにより作製することができる。ダイアボディの大半は、細菌内の可溶性形態で発現させることができる。単鎖ダイアボディ(scdB)は、2つのダイアボディ形成ポリペプチド鎖を約15アミノ酸残基のリンカーで接続することにより作製する(Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4): 128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1): 21-36を参照されたい)。scdBは、細菌内の可溶性で活性の単量体形態で発現させることができる(Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34): 128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1): 21-36; Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway et al., 1996 Protein Eng., 9(7): 617-21を参照されたい)。ダイアボディをFcへ融合させて「ジダイアボディ」を作り出すことができる(Lu et al., 2004 J. Biol. Chem., 279(4): 2856-65を参照されたい)。

【0297】

本発明の二特異性分子内で利用し得る他の抗体は、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体である。

【0298】

本発明の二特異性分子は、当技術分野で公知の方法を使用して、構成要素である結合特異性をコンジュゲートさせることにより調製することができる。例えば、二特異性分子の各結合特異性は、個別に作り出し、次いで互いにコンジュゲートさせることができる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、様々なカップリング剤または架橋剤を共有結合的コンジュゲーションに使用することができる。架橋剤の例は、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-5-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)を含む(例えば、Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648を参照されたい)。他の方法は、Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229: 81-83; およびGlennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375において記載されている方法を含む。コンジュゲート剤は、SATAおよびスルホ-SMCCであり、いずれもPierce Chemical Co. (Rockford, Ill)から入手可能である。

【0299】

結合特異性が抗体である場合、それらは、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域をスルフヒド

リル結合させることによりコンジュゲートさせることができる。特定の実施形態では、コンジュゲーション前に、奇数のスルフヒドリル残基、例えば1つのスルフヒドリル残基を含有するようにヒンジ領域を修飾する。

【0300】

代わりに、いずれの結合特異性も、同じベクター内でコードさせ、同じ宿主細胞内で発現およびアセンブルさせることができる。この方法は、二特異性分子が $m A b \times m A b$ 融合タンパク質、 $m A b \times F a b$ 融合タンパク質、 $F a b \times F (a b')$ 2融合タンパク質またはリガンド $\times F a b$ 融合タンパク質である場合に特に有用である。本発明の二特異性分子は、1つの単鎖抗体および結合決定基を含む単鎖分子の場合もあり、2つの結合決定基を含む単鎖二特異性分子の場合もある。二特異性分子は、少なくとも2つの単鎖分子を含み得る。二特異性分子を調製する方法について、例えば米国特許第5,260,203号明細書；米国特許第5,455,030号明細書；米国特許第4,881,175号明細書；米国特許第5,132,405号明細書；米国特許第5,091,513号明細書；米国特許第5,476,786号明細書；米国特許第5,013,653号明細書；米国特許第5,258,498号明細書；および米国特許第5,482,858号明細書において記載されている。

10

【0301】

それらの特異的な標的に対する二特異性分子の結合は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R E A)、F A C S 解析、バイオアッセイ (例えば、成長阻害アッセイ) またはウェスタンブロットアッセイにより確認することができる。これらのアッセイの各々では、一般に、目的の複合体に特異的な標識された試薬 (例えば、抗体) を利用することにより、特に目的となるタンパク質 - 抗体複合体の存在が検出される。

20

【0302】

別の態様では、本発明は、B M P 6 に結合する本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の少なくとも2つの同一であるかまたは異なる抗原結合性部分を含む多価化合物を提供する。抗原結合性部分は、タンパク質の融合または共有結合的連結もしくは非共有結合的連結を介して互いに連結することができる。代わりに、二特異性分子のための連結法も記載されている。四価化合物は、例えば、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の定常領域に結合する抗体または抗原結合性断片、例えばF c 領域またはヒンジ領域と架橋することにより得ることができる。

30

【0303】

三量体化ドメインについて、例えばB o r e a n による特許である欧州特許第1012280B1号明細書において記載されている。五量体化モジュールについて、例えばP C T / 欧州特許第97/05897号明細書において記載されている。

【0304】

半減期を延長した抗体

本発明は、B M P 6 に特異的に結合する抗体であって、インビボにおける半減期を延長した抗体を提供する。

【0305】

多くの因子がインビボにおけるタンパク質の半減期に影響を及ぼし得る。例えば、腎臓における濾過、肝臓における代謝、タンパク質分解性酵素 (プロテアーゼ) による分解および免疫原性応答 (例えば、抗体によるタンパク質の中和ならびにマクロファージおよび樹状細胞による取込み) である。様々な戦略を使用して、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の半減期を延長することができる。例えば、ポリエチレングリコール (P E G)、r e C O D E P E G、抗体スキャフォールド、ポリシアル酸 (P S A)、ヒドロキシエチルデンプン (H E S)、アルブミン結合性リガンドおよび炭水化物シールドとの化学的連結により；アルブミン、I g G、F c R n およびトランスフェリンなどの血清タンパク質に結合するタンパク質との遺伝子融合により；ナノボディ、F a b、D A R P i n、アビマー、アフィボディおよびアンチカリンなど、血清タンパク質に結合する他の結

40

50

合部分とカップリングする（遺伝子的または化学的に）ことにより；r P E G、アルブミン、アルブミンのドメイン、アルブミン結合性タンパク質およびFcとの遺伝子融合により；またはナノ担体、徐放製剤もしくは医療デバイスへの組込みにより、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の半減期を延長することができる。

【0306】

インビボにおける抗体の血清中循環を延長するため、高分子量のP E Gなどの不活性のポリマー分子を、P E Gの抗体のN末端もしくはC末端への部位特異的コンジュゲーションを介してまたはリシン残基上に存在するイプシロン-アミノ基を介して、多官能性リンカーを伴うかまたは多官能性リンカーを伴わない抗体またはそれらの断片に付着することができる。抗体をペグ化するには、典型的には、抗体、その抗原結合性断片をP E Gの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（P E G）と、1つまたは複数のP E G基が抗体または抗体断片に付着する条件下で反応させる。ペグ化は、反応性P E G分子（または類似する反応性の水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応により実行することができる。本明細書で使用される「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C1～C10）アルコキシ-ポリエチレングリコールもしくはアリールオキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドなど、他のタンパク質を誘導体化するのに使用されているP E Gの形態のいずれかを包含することを意図するものである。一実施形態では、ペグ化される抗体は、脱グリコシル化抗体である。直鎖状ポリマーまたは分枝状ポリマーの誘導体化であって、生物学的活性の喪失を結果として最小とする誘導体化が使用されるであろう。コンジュゲーションの程度をSDS-PAGEおよび質量分析により緊密にモニタリングして、P E G分子の抗体への適正なコンジュゲーションを確認することができる。反応しなかったP E Gは、サイズ除外クロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーにより、抗体-P E Gコンジュゲートから分離することができる。P E G誘導体化抗体は、当業者に周知の方法を使用して、例えば本明細書に記載されるイムノアッセイにより、結合活性ならびにインビボにおける有効性について調べることができる。当技術分野では、タンパク質をペグ化する方法が公知であり、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片に適用することができる。例えば、Nishimuraらによる欧州特許第0154316号明細書およびIshikawaらによる欧州特許第0401384号明細書を参照されたい。

【0307】

他の改変されたペグ化技術は、tRNAシンセターゼおよびtRNAを含む再構成系を介して、化学的に特定された側鎖を生合成タンパク質へ組込む再構成化学的直交性直接操作技術（ReCODE PEG）を含む。この技術は、30を超える新たなアミノ酸の大腸菌（E. coli）細胞内、酵母細胞内および哺乳動物細胞内の生合成タンパク質への組込みを可能とする。tRNAは、規範的なアミノ酸を、アンバーコドンが配置される任意の位置へ組込み、終止コドンから化学的に特定されたアミノ酸の組込みをシグナル伝達するコドンへ転換する。

【0308】

組換えペグ化技術（r P E G）は、血清半減期の延長にも使用することができる。この技術は、300～600アミノ酸の非構造化タンパク質テールを既存の医薬用タンパク質へ遺伝子融合させることを伴う。このような非構造化タンパク質鎖の見かけの分子量は、その実際の分子量の約15倍であるため、タンパク質の血清半減期は、大きく増大する。化学的コンジュゲーションおよび再精製を要求する従来のP E G化とは対照的に、製造工程は、大きく簡略化され、生成物は、均質である。

【0309】

ポリシアル化は、天然のポリマーであるポリシアル酸（PSA）を使用して活性寿命を延長し、治療用ペプチドおよび治療用タンパク質の安定性を改善する別の技術である。PSAは、シアル酸（糖）のポリマーである。タンパク質および治療用ペプチドの薬物送達に使用される場合、コンジュゲーション時、ポリシアル酸は、保護的微小環境をもたらす。これは、循環内の治療用タンパク質の活性寿命を延長し、それが免疫系により認識さ

れることを防止する。P S Aポリマーは、天然ではヒト体内で見出される。P S Aは、数百万年にわたり、それらの壁をP S Aでコーティングするように進化したある種の細菌により採用された。次いで、これらの天然でポリシアリル化した細菌は、分子的模倣により、体内の防御系を失効化することが可能となった。自然の究極のステルス技術であるP S Aは、このような細菌から、大量にかつ所定の物理的特徴を伴って容易に作製することができる。細菌P S Aは、ヒト体内ではP S Aと化学的に同一であるため、タンパク質にカップリングさせた場合でもなお完全に非免疫原性である。

【 0 3 1 0 】

別の技術は、抗体に連結されたヒドロキシエチルデンブun (「H E S」) 誘導体の使用を含む。H E Sは、蠟状トウモロコシデンブunに由来する修飾された天然ポリマーであり、体内の酵素により代謝され得る。H E S溶液は、通例、血液量不足を補い、血液のレオロギー特性を改善するために投与される。抗体のH E S化は、分子の安定性を上昇させることおよび腎クリアランスを低減することによっても循環半減期の延長を可能とし、上昇した生物学的活性を結果としてもたらす。H E Sの分子量など、異なるパラメータを改変することにより、広範にわたるH E S抗体コンジュゲートをカスタマイズすることができる。

10

【 0 3 1 1 】

インビボにおける半減期を延長した抗体は、1つまたは複数のアミノ酸修飾（すなわち置換、挿入または欠失）をI g G定常ドメインまたはそのF c R n結合性断片（好ましくはF cドメイン断片またはヒンジF cドメイン断片）へ導入しても作り出すことができる。例えば、国際公開第9 8 / 2 3 2 8 9号号パンフレット、国際公開第9 7 / 3 4 6 3 1号パンフレット；および米国特許第6 , 2 7 7 , 3 7 5号明細書を参照されたい。

20

【 0 3 1 2 】

さらに、抗体または抗体断片をインビボにおいてより安定的とするか、またはインビボにおける半減期を延長するために、抗体をアルブミンにコンジュゲートさせることもできる。当技術分野では、技法が周知であり、例えば国際公開第9 3 / 1 5 1 9 9号パンフレット、同第9 3 / 1 5 2 0 0号パンフレットおよび同0 1 / 7 7 1 3 7号パンフレット；ならびに欧州特許第4 1 3 , 6 2 2号明細書を参照されたい。

【 0 3 1 3 】

半減期を延長するための戦略は、インビボにおける半減期の延長が所望されるナノボディ、フィブロンネクチンベースの結合剤および他の抗体またはタンパク質においてとりわけ有用である。

30

【 0 3 1 4 】

抗体コンジュゲート

本発明は、融合タンパク質を作り出すように、異種タンパク質または異種ポリペプチドへ（またはその抗原結合性断片、好ましくは少なくとも1 0、少なくとも2 0、少なくとも3 0、少なくとも4 0、少なくとも5 0、少なくとも6 0、少なくとも7 0、少なくとも8 0、少なくとも9 0または少なくとも1 0 0アミノ酸のポリペプチドへ）組換えにより融合させるかまたは化学的にコンジュゲートさせた（共有結合的コンジュゲーションおよび非共有結合的コンジュゲーションの両方を含む）、B M P 6に特異的に結合する抗体またはそれらの抗原結合性断片を提供する。特に、本発明は、本明細書に記載される抗体の抗原結合性断片（例えば、F a b断片、F d断片、F v断片、F (a b)₂断片、V Hドメイン、V H C D R、V LドメインまたはV L C D R）と、異種タンパク質、異種ポリペプチドまたは異種ペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。当技術分野では、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを抗体または抗体断片と融合またはコンジュゲートさせる方法が知られている。例えば、米国特許第5 , 3 3 6 , 6 0 3号明細書、同第5 , 6 2 2 , 9 2 9号明細書、同第5 , 3 5 9 , 0 4 6号明細書、同第5 , 3 4 9 , 0 5 3号明細書、同第5 , 4 4 7 , 8 5 1号明細書および同第5 , 1 1 2 , 9 4 6号明細書；欧州特許第3 0 7 , 4 3 4号明細書および同第3 6 7 , 1 6 6号明細書；国際公開第9 6 / 0 4 3 8 8号パンフレットおよび同第9 1 / 0 6 5 7 0号パンフレット；A s h k e n a

40

50

z i e t a l . , 1 9 9 1 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 1 0 5 3 5 - 1 0 5 3 9 ; Z h e n g e t a l . , 1 9 9 5 , J . I m m u n o l . 1 5 4 : 5 5 9 0 - 5 6 0 0 ; および V i l e t a l . , 1 9 9 2 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 1 1 3 3 7 - 1 1 3 4 1 を参照されたい。

【 0 3 1 5 】

さらなる融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリングおよび/またはコドンシャフリング(まとめて「DNAシャフリング」と称する)の技法を介して作り出すことができる。DNAシャフリングを利用して、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の活性を改変する(例えば、アフィニティーが大きく、解離速度が小さい抗体およびそれらの抗原結合性断片)ことができる。一般に、米国特許第5,605,793号明細書、同第5,811,238号明細書、同第5,830,721号明細書、同第5,834,252号明細書および同第5,837,458号明細書; P a t t e n e t a l . , 1 9 9 7 , C u r r . O p i n i o n B i o t e c h n o l . 8 : 7 2 4 - 3 3 ; H a r a y a m a , 1 9 9 8 , T r e n d s B i o t e c h n o l . 1 6 (2) : 7 6 - 8 2 ; H a n s s o n , e t a l . , 1 9 9 9 , J . M o l . B i o l . 2 8 7 : 2 6 5 - 7 6 ; および L o r e n z o a n d B l a s c o , 1 9 9 8 , B i o t e c h n i q u e s 2 4 (2) : 3 0 8 - 3 1 3 (これらの特許および刊行物の各々は、参照により全体的に本明細書に組込まれる)を参照されたい。抗体およびそれらの抗原結合性断片またはコードされた抗体およびそれらの抗原結合性断片は、組換え前にエラーブローンPCRによるランダム突然変異誘発、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法にかけることにより改変することができる。BMP6に特異的に結合する抗体、その抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチドは、1つまたは複数の異種分子の1つまたは複数の成分、モチーフ、区間、一部、ドメイン、断片などで組換えることができる。

【 0 3 1 6 】

さらに、抗体およびそれらの抗原結合性断片は、精製を容易にするペプチドなどのマーカー配列へ融合させることもできる。一実施形態では、マーカーのアミノ酸配列は、それらの多くが市販されているなかでもとりわけpQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)において提供されているタグなどのヘキサヒスチジンペプチド(配列番号97)である。G e n t z e t a l . , 1 9 8 9 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 8 2 1 - 8 2 4 において記載されている通り、例えば、ヘキサヒスチジン(配列番号97)は、融合タンパク質の簡便な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエプトープ(Wilson et al., 1984, Cell 37: 767)に対応するヘマグルチニン(「HA」)タグおよび「フラッグ」タグを含むが、これらに限定されない。

【 0 3 1 7 】

一実施形態では、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を診断剤または検出用薬剤にコンジュゲートさせる。このような抗体は、疾患または障害の発生、発症、進行および/または重症度を、特定の治療の有効性を決定することなど、臨床検査手順の一部としてモニタリングまたは予後診断するのに有用であり得る。このような診断および検出は、抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼなどであるが、これらに限定されない多様な酵素; ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどであるが、これらに限定されない補欠分子族; ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンなどであるが、これらに限定されない蛍光材料; ルミノールなどであるが、これらに限定されない発光材料; ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンなどであるが、これらに限定されない生物発光材料; ヨウ素(131I、125I、123Iおよび121I)、炭素(14C)、硫黄(35S)、トリチウム(3H)、インジ

ウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In および ^{111}In)、テクネシウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn および ^{117}Tl などであるが、これらに限定されない放射性材料；ならびに多様なポジトロン断層法を使用するポジトロン放出金属および非放射性の常磁性金属イオンを含むが、これらに限定されない検出可能な物質にカップリングすることにより達成することができる。

10

【0318】

本発明は、治療用部分にコンジュゲートさせた抗体およびそれらの抗原結合性断片の使用もさらに包含する。抗体およびその抗原結合性断片は、細胞毒素、例えば細胞増殖抑制剤または殺細胞剤、治療剤または放射性金属イオン、例えばアルファ放射体などの治療用部分にコンジュゲートさせることができる。細胞毒素または細胞傷害剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。

【0319】

さらに、抗体、その抗原結合性断片は、所与の生物学的応答を修飾する治療用部分または薬物部分にコンジュゲートさせることもできる。治療用部分または薬物部分は、古典的薬学的治療剤に限定されるとは見なされないものとする。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス属外毒素、コレラ毒素またはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、アルファ-インターフェロン、ベータ-インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、アポトーシス剤、抗血管新生剤；または例えばリンホカインなどの生体応答修飾剤などのタンパク質を含み得る。

20

【0320】

さらに、抗体は、 ^{213}Bi などのアルファ放射体などの放射性金属イオン、 ^{131}In 、 ^{131}Lu 、 ^{131}Y 、 ^{131}Ho 、 ^{131}Sm を含むが、これらに限定されない放射性金属イオンを、ポリペプチドにコンジュゲートするのに有用な大環状キレート化剤などの治療用部分にコンジュゲートさせることもできる。一実施形態では、大環状キレート化剤は、リンカー分子を介して抗体に付着させ得る1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸(DOTA)である。当技術分野では、このようなリンカー分子が一般に公知であり、各々が参照により全体的に組込まれる Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; および Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50 において記載されている。

30

【0321】

治療用部分を、抗体にコンジュゲートさせるための技法は周知であり、例えば Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (ed), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies 84:Biolog

40

50

ical And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985); および Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119 - 58 を参照されたい。

【0322】

抗体は、特にイムノアッセイまたは標的抗原の精製に有用な固体支持体に付着させることもできる。このような固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンを含むが、これらに限定されない。

【0323】

本発明の抗体を作製する方法

抗体をコードする核酸

本発明は、上記で記載した BMP 6 結合性抗体鎖のセグメントまたはドメインを含むポリペプチドをコードする実質的に精製された核酸分子を提供する。本発明の核酸のいくつかは、配列番号 16、36、56 もしくは 76 のいずれかに示される重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列、および / または配列番号 26、46、66 もしくは 86 のいずれかに示される軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。具体的な実施形態では、核酸分子は、表 1 において同定される核酸分子である。本発明の他のいくつかの核酸分子は、表 1 において同定される核酸分子のヌクレオチド配列と実質的に（例えば、少なくとも 65、80%、95% または 99%）同一のヌクレオチド配列を含む。適切な発現ベクターから発現させるとき、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、BMP 6 抗原結合能を呈示することが可能である。

【0324】

本発明では、表 1 および / または表 14 で示した BMP 6 結合性抗体の重鎖または軽鎖に由来する少なくとも 1 つの CDR 領域および通例 3 つ全ての CDR 領域をコードするポリヌクレオチドも提供される。他のいくつかのポリヌクレオチドは、表 1 および / または表 14 で示した BMP 6 結合性抗体の重鎖および / または軽鎖の可変領域配列の全てまたは実質的に全てをコードする。コードの縮重性のために、様々な核酸配列は、免疫グロブリンアミノ酸配列の各々をコードするであろう。

【0325】

本発明の核酸分子は、抗体の可変領域および定常領域の両方をコードし得る。本発明の核酸配列のいくつかは、配列番号 16、36、56 または 76 のいずれかに示される成熟重鎖可変領域配列と実質的に（例えば、少なくとも 80%、90% または 99%）同一の成熟重鎖可変領域配列をコードするヌクレオチドを含む。他のいくつかの核酸配列は、配列番号 26、46、66 または 86 のいずれかに示される成熟軽鎖可変領域配列と実質的に（例えば、少なくとも 80%、90% または 99%）同一の成熟軽鎖可変領域配列をコードするヌクレオチドを含む。

【0326】

ポリヌクレオチド配列は、デノボの固相 DNA 合成もしくは BMP 6 結合性抗体またはその結合性断片をコードする既存の配列（例えば、下記の実施例で記載される配列）に対する PCR による突然変異誘発により作製することができる。核酸の直接的な化学合成は、Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68: 90 によるホスホトリエステル法; Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979 によるホスホジエステル法; Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981 によるジエチルホスホルアミダイト法; および

10

20

30

40

50

米国特許第4,458,066号明細書による固体支持体法など、当技術分野で公知の方法により達成することができる。PCRによる、突然変異のポリヌクレオチド配列への導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila et al., Nucleic Acid Res. 19:967, 1991; および Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991において記載されている通りに実施することができる。

10

【0327】

本発明では、上記で記載したBMP6結合性抗体を作製するための発現ベクターおよび宿主細胞も提供される。多様な発現ベクターを利用して、BMP6結合性抗体鎖または結合性断片をコードするポリヌクレオチドを発現させることができる。ウイルスベースの発現ベクターおよび非ウイルス発現ベクターのいずれを使用しても哺乳動物宿主細胞内で抗体を作製することができる。非ウイルスベクターおよび非ウイルス系は、プラスミド、典型的にタンパク質またはRNAを発現させるための発現カセットを伴うエピソームベクターおよびヒト人工染色体を含む(例えば、Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997を参照されたい)。例えば、哺乳動物(例えば、ヒト)細胞内のBMP6結合性ポリヌクレオチドおよびBMP6結合性ポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターは、pThioHis A、pThioHis BおよびpThioHis C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、pEBVHis BおよびpEBVHis C(Invitrogen、San Diego、Calif.)、MPSVベクターならびに他のタンパク質を発現させるための当技術分野で公知の他の多数のベクターを含む。有用なウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40に基づくベクター、パピローマウイルス、HBPEプスタインバーウイルス、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林熱ウイルス(SFV)を含む。Brent et al., 前出; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; および Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992を参照されたい。

20

30

【0328】

発現ベクターの選択は、その中でベクターを発現させる意図される宿主細胞に依存する。発現ベクターは、典型的には、BMP6結合性の抗体鎖の抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターおよび他の調節配列(例えば、エンハンサー)を含有する。一実施形態では、誘導条件下を除き、挿入された配列の発現を防止するのに誘導的プロモーターが利用される。誘導的プロモーターは、例えば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーターまたは熱ショックプロモーターを含む。形質転換された生物の培養物は、それらの発現産物が宿主細胞により良好に許容されるコード配列の集団にバイアスをかけずに非誘導条件下で増殖させることができる。プロモーターに加えて、他の調節的エレメントも、BMP6結合性の抗体鎖の抗原結合性断片の効率的な発現に要求または所望される可能性がある。これらのエレメントは、ATG開始コドンおよび隣接のリボソーム結合性部位または他の配列を典型的に含む。加えて、発現の効率は、使用される細胞系に適するエンハンサーを組入れることにより増強することもできる(例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; および Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987を参照されたい)。例えば、SV40エンハンサーまたはCMVエンハンサーを使用して哺乳動物宿主細胞内の発現を増大させることができる。

40

【0329】

50

発現ベクターはまた、挿入されたBMP6結合性抗体配列によりコードされるポリペプチドとの融合タンパク質を形成するように分泌シグナル配列の位置をもたらし得る。挿入されたBMP6結合性抗体配列は、ベクター内に組入れる前にシグナル配列に連結することが多い。BMP6結合性抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードする配列を受容するのに使用されるベクターはまた、場合により定常領域またはそれらの一部もコードする。このようなベクターは、定常領域との融合タンパク質としての可変領域の発現を可能とし、これによりインタクトな抗体およびそれらの抗原結合性断片の作製をもたらし得る。このような定常領域は、典型的には、ヒト定常領域である。

【0330】

BMP6結合性抗体鎖を保有し、これを発現させるための宿主細胞は、原核細胞の場合もあり、真核細胞の場合もある。大腸菌(*E. coli*)は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングし、発現させるのに有用な1つの原核生物宿主である。使用に適する他の微生物宿主は、枯草菌(*Bacillus subtilis*)などの桿菌およびサルモネラ(*Salmonella*)属種、セラチア(*Serratia*)属種ならびに多様なシュードモナス(*Pseudomonas*)属種など、他の腸内細菌科を含む。これらの原核生物宿主内では、典型的に、宿主細胞と適合性の発現制御配列(例えば、複製起点)を含有する発現ベクターも作製することができる。加えて、ラクトースプロモーター系、トリプトファン(*trp*)プロモーター系、ベータ-ラクタマーゼプロモーター系またはファージラムダに由来するプロモーター系など、任意の数の様々な周知のプロモーターも存在する。プロモーターは、典型的には、任意選択でオペレーター配列により発現を制御するが、転写および翻訳を開始して終結させるためのリボソーム結合性部位配列なども有する。本発明のBMP6結合性ポリペプチドを発現させるのに酵母などの他の微生物も利用することができる。また、バキュロウイルスベクターと組合わせた昆虫細胞も使用することができる。

【0331】

一実施形態では、本発明のBMP6結合性ポリペプチドを発現させ、作製するのに哺乳動物宿主細胞を使用する。例えば、哺乳動物宿主細胞は、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現させるハイブリドーマ細胞系(例えば、実施例で記載される1D6、C9骨髓腫ハイブリドーマクローン)の場合もあり、外因性発現ベクターを保有する哺乳動物細胞系(例えば、下記で例示されるSP2/O骨髓腫細胞)の場合もある。哺乳動物宿主細胞は、任意の正常非不死化動物細胞または正常不死化動物細胞もしくは非正常不死化動物細胞またはヒト細胞を含む。例えば、CHO細胞系、多様なCos細胞系、HeLa細胞、骨髓腫細胞系、形質転換B細胞およびハイブリドーマを含む、インタクトな免疫グロブリンを分泌することが可能な多数の適切な宿主細胞系が開発されている。ポリペプチドを発現させるための哺乳動物組織細胞培養物の使用について、例えば、Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987において一般に論じられている。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーターおよびエンハンサーなどの発現制御配列(例えば、Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986を参照されたい)ならびにリボソーム結合性部位、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報部位を含み得る。これらの発現ベクターは、通例、哺乳動物遺伝子に由来するプロモーターまたは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含有する。適切なプロモーターは、構成的プロモーター、細胞型特異的プロモーター、段階特異的プロモーターおよび/またはモジュレート可能プロモーターもしくは調節可能プロモーターであり得る。有用なプロモーターは、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP pol IIIIプロモーター、構成的MPSVプロモーター、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター(ヒト即初期CMVプロモーターなど)、構成的CMVプロモーターおよび当技術分野で公知のプロモーター-エンハンサーの組合せを含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 3 3 2 】

目的のポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入する方法は、細胞宿主の種類に応じて変化する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが一般に原核細胞に活用されるのに対し、リン酸カルシウム処理または電気穿孔は、他の細胞宿主に使用することができる。(一般に、Sambrook et al., 前出を参照されたい)。他の方法は、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム処理、リポソーム媒介型形質転換、注射およびマイクロインジェクション、遺伝子銃法、ウィロソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質であるVP22との融合体(Elliott and O'Hare, Cell 88: 223, 1997)、DNAの薬剤増強型取込みおよびエキスピボにおける形質導入を含む。組換えタンパク質の長期にわたる高収率作製のために安定的発現が所望されることが多い。例えば、BMP6結合性抗体鎖または結合性断片を安定的に発現させる細胞系は、ウイルス複製起点または内因性発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を含有する本発明の発現ベクターを使用して調製することができる。ベクターを導入した後、細胞は、強化培地中で1~2日間にわたり成長させてから選択培地へ切り替えることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与し、その存在により細胞の成長を可能とし、これにより、導入された配列を選択培地中で発現させることに成功することである。耐性で安定的にトランスフェクトされた細胞は、細胞型に適する組織培養法を使用して増殖させることができる。

【 0 3 3 3 】

本発明のモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体(mAb)は、従来のモノクローナル抗体法、例えばKohler and Milstein, 1975 Nature 256: 495による標準的な体細胞ハイブリダイゼーション法を含む様々な技法により作製することができる。例えば、Bリンパ球のウイルス性形質転換または発がん性形質転換など、モノクローナル抗体を作製するための多くの技法を利用することができる。

【 0 3 3 4 】

ハイブリドーマを調製するための動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマの作製は、十分に確立された手順である。当技術分野では、融合体のための免疫化された脾臓細胞を単離するための免疫化プロトコールおよび免疫化法が公知である。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)および融合手順も公知である。

【 0 3 3 5 】

本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体およびそれらの抗原結合性断片は、上記で記載した通りに調製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的のマウスハイブリドーマから得、標準的な分子生物学の技法を使用して、非マウス(例えば、ヒト)免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を創出するには、当技術分野で公知の方法(例えば、Cabillyらによる米国特許第4,816,567号明細書を参照されたい)を使用してマウス可変領域をヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を創出するには、当技術分野で公知の方法を使用してマウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる。例えば、Winterによる米国特許第5,225,539号明細書;ならびにQueenらによる米国特許第5,530,101号明細書;同第5,585,089号明細書;同第5,693,762号明細書;および同第6,180,370号明細書を参照されたい。

【 0 3 3 6 】

ある種の実施形態では、本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。BMP6を指向するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなく、ヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを使用して作り出すことができる。これらのトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウスは、本明細書では、それぞれHuMAbマウスおよびKMマウスと称するマウスを含み

、本明細書ではまとめて「ヒトIgマウス」と称する。

【0337】

HuMAbマウス(登録商標)(Medarex, Inc.)は、内因性ミュー鎖遺伝子座および内因性カッパ鎖遺伝子座を不活化する標的化突然変異と併せて、再配列されていないヒト重(ミューおよびガンマ)鎖免疫グロブリン配列およびカッパ鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座を含有する(例えば、Lonberg et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859を参照されたい)。したがって、マウスは、マウスIgMまたはKの発現の低減を呈示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランス遺伝子は、クラススイッチングおよび体細胞突然変異を経て高アフィニティーのヒトIgG-カッパモノクローナル抗体を作り出す(Lonberg, N. et al., 1994前出; Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101において総説される; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93; ならびにHarding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546)。HuMAbマウスの調製および使用、ならびにこのようなマウスにより保有されるゲノムの修飾は、それらの全ての内容が参照により全体的に本明細書に具体的に組込まれるTaylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; ならびにFishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851においてさらに記載されている。さらに、全てがLonbergおよびKayによる米国特許第5,545,806号明細書; 同第5,569,825号明細書; 同第5,625,126号明細書; 同第5,633,425号明細書; 同第5,789,650号明細書; 同第5,877,397号明細書; 同第5,661,016号明細書; 同第5,814,318号明細書; 同第5,874,299号明細書; および同第5,770,429号明細書; Suraniらによる米国特許第5,545,807号明細書; 全てがLonbergおよびKayによるPCT公開国際公開第92103918号パンフレット、同93/12227号パンフレット、同94/25585号パンフレット、同97113852号パンフレット、同98/24884号パンフレットおよび同99/45962号パンフレット; ならびにKormanらによるPCT公開国際公開第01/14424号パンフレットも参照されたい。

【0338】

別の実施形態では、本発明のヒト抗体は、ヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランスクロモソームを保有するマウスなど、トランス遺伝子上およびトランスクロモソーム上にヒト免疫グロブリン配列を保有するマウスを使用してもたらしすることができる。本明細書で「KMマウス」と称するこのようなマウスは、IshidaらによるPCT公開国際公開第02/43478号パンフレットにおいて詳細に記載されている。

【0339】

当技術分野では、なおさらにヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させる代替的なトランスジェニック動物系も入手可能であり、本発明のBMP6結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片をもたらすのに使用することができる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と称する代替的なトランスジェニック系を使用することができる。このようなマウスは、例えば、Kucherlapatiらによる米国特許第5,939,

598号明細書；同第6,075,181号明細書；同第6,114,598号明細書；同第6,150,584号明細書；および同第6,162,963号明細書において記載されている。

【0340】

当技術分野では、さらにヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させる代替的なトランスクロモソーム動物系も入手可能であり、本発明のBMP6結合性抗体をもたらすのに使用することができる。例えば、「TCマウス」と称する、ヒト重鎖トランスクロモソームおよびヒト軽鎖トランスクロモソームの両方を保有するマウスを使用することができるが、このようなマウスは、Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727において記載されている。当技術分野では、さらにヒト重鎖および軽鎖トランスクロモソームを保有するウシも記載されており（Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894）、本発明のBMP6結合性抗体をもたらすのに使用することができる。

10

【0341】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製することもできる。当技術分野では、ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法が確立されているか、または下記の実施例で記載する。例えば、Ladnerらによる米国特許第5,223,409号明細書；同第5,403,484号明細書；および同第5,571,698号明細書；Dowerらによる米国特許第5,427,908号明細書；および同第5,580,717号明細書；McCaffertyらによる米国特許第5,969,108号明細書；および同第6,172,197号明細書；ならびにGriffithsらによる米国特許第5,885,793号明細書；同第6,521,404号明細書；同第6,544,731号明細書；同第6,555,313号明細書；同第6,582,915号明細書；および同第6,593,081号明細書を参照されたい。

20

【0342】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、免疫化するとヒト抗体応答を作り出し得るようにヒト免疫細胞を再構成したSCIDマウスを使用して調製することもできる。このようなマウスは、例えば、Wilsonらによる米国特許第5,476,996号明細書；および同第5,698,767号明細書において記載されている。

30

【0343】

フレームワークまたはFcの操作

本発明の操作抗体およびそれらの抗原結合性断片は、例えば、抗体の特性を改善するように、VH内および/またはVL内のフレームワーク残基に修飾が施された抗体およびそれらの抗原結合性断片を含む。このようなフレームワーク修飾は、典型的には、抗体の免疫原性を低下させるように施す。例えば、1つの手法は、1つまたは複数のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系列配列へ「復帰突然変異させる」ことである。より具体的には、体細胞突然変異を経た抗体は、抗体が由来する生殖細胞系列配列と異なるフレームワーク残基を含有し得る。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖細胞系列配列と比較することにより同定することができる。フレームワーク領域配列をそれらの生殖細胞系列の立体配置へ戻すには、例えば部位特異的突然変異誘発により、体細胞突然変異を生殖細胞系列配列へ「復帰突然変異させる」ことができる。このような「復帰突然変異させた」抗体も本発明により包含されることを意図する。

40

【0344】

フレームワーク修飾の別の種類は、1つもしくは複数のフレームワーク領域内の残基なおまたは1つもしくは複数のCDR領域内の残基を突然変異させてT細胞エпитープを除去して、これにより抗体の潜在的な免疫原性を低減することを伴う。この手法は、「脱免疫化」とも称され、Carrollらによる米国特許出願公開第20030153043号明細書においてさらに詳細に記載されている。

50

【 0 3 4 5 】

フレームワーク内またはC D R領域内に施された修飾に加えてまたはその代わりに、本発明の抗体は、F c領域内の修飾を含んで、典型的に、血清半減期、補体の結合、F c受容体の結合および/または抗原依存性細胞性細胞傷害など、抗体の1つまたは複数の機能的特性を改変するように操作することもできる。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾することもでき(例えば、1つまたは複数の化学的部分を抗体に付着することができる)、そのグリコシル化を改変して、ここでもまた抗体の1つまたは複数の機能的特性を改変するように修飾することもできる。これらの実施形態の各々について下記でさらに詳細に記載する。F c領域内の残基の番号付けは、K a b a tによるE Uインデックスである。

【 0 3 4 6 】

一実施形態では、ヒンジ領域内のシステイン残基の数を改変する、例えば増大または減少させるようにC H 1のヒンジ領域を修飾する。この手法は、B o d m e rらによる米国特許第5, 6 7 7, 4 2 5号明細書においてさらに記載されている。C H 1のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖のアセンプリーを容易にするか、または抗体の安定性を増大もしくは低下させるように改変する。

【 0 3 4 7 】

別の実施形態では、抗体のF cヒンジ領域を突然変異させて抗体の生物学的半減期を短縮する。より具体的には、抗体のブドウ球菌属プロテインA (S p A) への結合が天然F c - ヒンジドメインのS p Aへの結合と比べて損なわれるように、1つまたは複数のアミノ酸突然変異をF c - ヒンジ断片のC H 2ドメイン - C H 3ドメイン間界面領域へ導入する。この手法は、W a r dらによる米国特許第6, 1 6 5, 7 4 5号明細書においてさらに詳細に記載されている。

【 0 3 4 8 】

別の実施形態では、抗体は、その生物学的半減期を延長するように修飾する。多様な手法が可能である。例えば、以下の突然変異：米国特許第6, 2 7 7, 3 7 5号明細書において記載されているT 2 5 2 L、T 2 5 4 S、T 2 5 6 Fの1つまたは複数をW a r dに導入することができる。代わりに、生物学的半減期を延長するために、抗体を、P r e s t aらによる米国特許第5, 8 6 9, 0 4 6号明細書；および同第6, 1 2 1, 0 2 2号明細書において記載されているI g GのF c領域のC H 2ドメインの2つのループから採取されたサルベージ受容体結合性エピトープを含有するようにC H 1領域内またはC L領域内で改変することもできる。

【 0 3 4 9 】

一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸残基を、抗体のエフェクター機能を改変する異なるアミノ酸残基で置き換えることによりF c領域を改変する。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対するアフィニティーを改変しているが、親抗体の抗原結合能を保持するように、1つまたは複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。それに対するアフィニティーを改変するエフェクターリガンドは、例えば、F c受容体または補体のC 1成分であり得る。この手法は、両方ともW i n t e rらによる米国特許第5, 6 2 4, 8 2 1号明細書；および同第5, 6 4 8, 2 6 0号明細書においてさらに詳細に記載されている。

【 0 3 5 0 】

別の実施形態では、抗体がC 1 qへの結合を改変し、かつ/または補体依存性細胞傷害作用(C D C)を低減もしくは消失させるように、アミノ酸残基から選択される1つまたは複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。この手法は、I d u s s o g i eらによる米国特許第6, 1 9 4, 5 5 1号明細書においてさらに詳細に記載されている。

【 0 3 5 1 】

別の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸残基を改変して、これにより補体を固定する抗体の能力を改変する。この手法は、B o d m e rらによる国際公開第9 4 / 2 9 3 5 1号パンフレットにおいてさらに記載されている。

10

20

30

40

50

【0352】

さらに別の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸を修飾することにより、抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）を媒介する抗体の能力を増大させ、かつ/またはFc-ガンマ受容体に対する抗体のアフィニティを増大させるようにFc領域を修飾する。この手法は、Prestaによる国際公開第00/42072号パンフレットにおいてさらに記載されている。さらに、ヒトIgG1上のFc-ガンマリ、Fc-ガンマリI、Fc-ガンマリIIおよびFcRnに対する結合性部位もマップされており、結合を改善させた変異体も記載されている（Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276: 6591 - 6604を参照されたい）。

【0353】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化を修飾する。例えば、脱グリコシル化抗体（すなわち抗体がグリコシル化を欠く）を作製することができる。グリコシル化は、例えば、「抗原」に対する抗体のアフィニティを増大させるように改変することができる。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を改変することにより達成することができる。例えば、1つまたは複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の消失を結果としてもたらす1つまたは複数のアミノ酸置換を作製して、これにより、その部位におけるグリコシル化を消失させることができる。このような脱グリコシル化により、抗原に対する抗体のアフィニティを増大させることができる。このような手法は、Coraによる米国特許第5,714,350号明細書；および同第6,350,861号明細書においてさらに詳細に記載されている。

【0354】

さらにまたは代わりに、フコシル残基の量を低減した低フコシル化抗体または二分枝型GlcNac構造を増大させた抗体など、グリコシル化の種類を改変した抗体を作製することもできる。このようなグリコシル化パターンの改変は、抗体のADCC能を増大させることが裏付けられている。このような炭水化物修飾は、例えば、グリコシル化機構を改変した宿主細胞内で抗体を発現させることにより達成することができる。当技術分野では、グリコシル化機構を改変した細胞が記載されており、本発明の組換え抗体を発現させ、これにより、グリコシル化を改変した抗体を産生するための宿主細胞として使用することができる。例えば、Hangらによる欧州特許第1,176,195号明細書は、このような細胞系内で発現させた抗体が、低フコシル化を呈示するように、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を機能的に破壊した細胞系について記載している。Prestaによる国際公開第03/035835号パンフレットは、フコースをAsn(297)連結された炭水化物に付着する能力を低減し、またその宿主細胞内で発現させた抗体の低フコシル化も結果としてもたらす変異体のCHO細胞系であるLecl3細胞について記載している（また、Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733 - 26740も参照されたい）。Umanaらによる国際公開第99/54342号パンフレットは、操作細胞系内で発現させた抗体が、抗体のADCC活性の増大を結果としてもたらす二分枝型GlcNac構造の増大を呈示するように、糖タンパク質を修飾するグリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ(1,4)-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現させるように操作された細胞系について記載している（また、Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176 - 180も参照されたい）。

【0355】

改変抗体を操作する方法

上記で論じた通り、本明細書で示されるVH配列およびVL配列または全長重鎖および全長軽鎖配列を有するBMP6結合性抗体は、全長重鎖配列および/もしくは全長軽鎖配列、VH配列および/もしくはVL配列またはこれらに付着された定常領域を修飾することにより、新たなBMP6結合性抗体を創出するのに使用することができる。したがって、本発明の別の態様では、本発明のBMP6結合性抗体の構造的特徴を使用して、構造的に類縁のBMP6結合性抗体であって、ヒトBMP6に結合し、またBMP6の1つまた

10

20

30

40

50

は複数の機能的特性も阻害すること（例えば、溶血アッセイにおいて赤血球溶解を阻害する）など、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の少なくとも1つの機能的特性を保持するBMP6結合性抗体を創出する。

【0356】

例えば、本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の1つもしくは複数のCDR領域またはそれらの突然変異を公知のフレームワーク領域および/または他のCDRと組換えにより組合わせて、上記で論じた通り、さらなる組換えにより操作された本発明のBMP6結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片を創出することができる。他の種類の修飾は、前出の節で記載した修飾を含む。操作法のための出発材料は、本明細書で提示されるVH配列および/もしくはVL配列の1つもしくは複数またはそれらの1つもしくは複数のCDR領域である。操作抗体を創出するのに、本明細書で提示されるVH配列および/もしくはVL配列の1つもしくは複数またはそれらの1つもしくは複数のCDR領域を有する抗体を実際に調製する（すなわちタンパク質として発現させる）ことは必要でない。むしろ、配列内に含有される情報を、元の配列に由来する「第2世代の」配列を創出するための出発材料として使用し、次いで「第2世代の」配列をタンパク質として調製し、発現させる。

【0357】

改変抗体配列は、CDR3配列、または米国特許出願公開第2005025552号明細書において記載されている、最小限の不可欠な結合決定基を固定し、CDR1配列およびCDR2配列に多様性を持たせた抗体ライブラリーをスクリーニングすることによっても調製することができる。スクリーニングは、ファージディスプレイ技術など、抗体を抗体ライブラリーからスクリーニングするのに適切な任意のスクリーニング技術に従って実施することができる。

【0358】

標準的な分子生物学の技法を使用して改変抗体配列を調製し、発現させることができる。改変抗体配列によりコードされる抗体は、本明細書に記載されるBMP6結合性抗体の機能的特性であって、ヒトBMP6タンパク質に特異的に結合することを含むが、これらに限定されない機能的特性の1つ、一部または全部を保持する抗体であり、溶血アッセイにおいて赤血球溶解を阻害する。

【0359】

改変抗体の機能的特性は、実施例において示されるアッセイ（例えば、ELISA）など、当技術分野において利用可能であり、かつ/または本明細書に記載される標準的なアッセイを使用して評価することができる。

【0360】

本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を操作する方法についての一実施形態では、突然変異を、BMP6結合性抗体をコードする配列の全部または一部に沿ってランダムにまたは選択的に導入することができ、結果として得られる修飾BMP6結合性抗体を、本明細書に記載される結合活性および/または他の機能的特性についてスクリーニングすることができる。当技術分野では、突然変異法が記載されている。例えば、Shortによる国際公開第02/092780号パンフレットは、飽和突然変異誘発、合成ライゲーションアセンブリーまたはこれらの組合せを使用して抗体の突然変異を創出し、スクリーニングする方法について記載している。代わりに、Lazarらによる国際公開第03/074679号パンフレットは、コンピュータによるスクリーニング法を使用して抗体の生理化学的特性を最適化する方法について記載している。

【0361】

本発明の抗体の特徴付け

本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片は、多様な機能的アッセイにより特徴付けることができる。例えば、それらは、BMP6を阻害するそれらの能力により特徴付けることができる。

【0362】

BMP 6 に結合する抗体の能力は、目的の抗体を標識することにより、直接的に検出することもでき、抗体を標識せずに、当技術分野で公知の多様なサンドイッチアッセイフォーマットを使用して結合を間接的に検出することもできる。

【0363】

一実施形態では、本発明の BMP 6 結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片は、基準 BMP 6 結合性抗体の BMP 6 ポリペプチドへの結合を遮断するかまたはそれと競合する。これらは、上記で記載した完全ヒト BMP 6 結合性抗体であり得る。それらは、基準抗体と同じエピトープに結合する他のマウス BMP 6 結合性抗体、キメラ BMP 6 結合性抗体またはヒト化 BMP 6 結合性抗体でもあり得る。基準抗体の結合を遮断するかまたはそれと競合する能力は、被験下の BMP 6 結合性抗体が、基準抗体により規定されるエピトープと同じであるかもしくは類似のエピトープまたは基準 BMP 6 結合性抗体が結合するエピトープと十分に近位のエピトープに結合することを示す。このような抗体は、とりわけ、基準抗体について同定される有利な特性を共有する可能性が高い。基準抗体を遮断するかまたはそれと競合する能力は、例えば、競合的結合アッセイにより決定することができる。競合的結合アッセイでは、被験下の抗体を、基準抗体の、BMP 6 ポリペプチドなどの共通の抗原への特異的結合を阻害する能力について検討する。過剰量の被験抗体が基準抗体の結合を実質的に阻害する場合、被験抗体は、抗原への特異的結合について基準抗体と競合する。実質的な阻害は、被験抗体が基準抗体の特異的結合を、通例、少なくとも 10%、25%、50%、75% または 90% 低減することを意味する。

【0364】

抗体の特定のタンパク質、この場合には BMP 6 への結合についての基準抗体との競合について評価するのに使用し得る多数の公知の競合的結合アッセイが存在する。これらは、例えば、直接的固相イムノアッセイまたは間接的ラジオイムノアッセイ (RIA)、直接的固相イムノアッセイまたは間接的固相イムノアッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9: 242 - 253, 1983 を参照されたい) ; 直接的固相ビオチン - アビジン EIA (Kirkland et al., *J. Immunol.* 137: 3614 - 3619, 1986 を参照されたい) ; 直接的固相標識アッセイ、直接的固相標識サンドイッチアッセイ (Harlow & Lane、前出を参照されたい) ; I - 125 標識を使用する直接的固相標識 RIA (Morel et al., *Molec. Immunol.* 25: 7 - 15, 1988 を参照されたい) ; 直接的固相ビオチン - アビジン EIA (Cheung et al., *Virology* 176: 546 - 552, 1990) ; および直接的標識 RIA (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32: 77 - 82, 1990) を含む。このようなアッセイは、典型的には、非標識化被験 BMP 6 結合性抗体および標識化基準抗体のいずれかを保有する固体表面または細胞に結合させた精製抗原の使用を伴う。競合的阻害は、被験抗体の存在下において、固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定する。通例、被験抗体は、過剰に存在する。競合アッセイ (競合抗体) により同定される抗体は、基準抗体と同じエピトープに結合する抗体と、基準抗体が結合するエピトープと、立体障害が生じる程度に十分に近位の隣接エピトープに結合する抗体とを含む。

【0365】

選択された BMP 6 結合性モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するために、市販の試薬 (例えば、Pierce、Rockford、ILL 製の試薬) を使用して各抗体をビオチニル化することができる。非標識化モノクローナル抗体およびビオチニル化モノクローナル抗体を使用する競合研究は、BMP 6 ポリペプチドでコーティングした ELISA プレートを使用して実施することができる。ビオチニル化 MAbs の結合は、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼプロープにより検出することができる。精製 BMP 6 結合抗体のアイソタイプを決定するためにアイソタイプ ELISA を実施することができる。例えば、マイクロ滴定プレートのウェルを 4 で一晚、1 g/ml の抗ヒト IgG によりコーティングすることができる。1% の BSA によるブ

10

20

30

40

50

ロッキング後、プレートに 1 g / ml 以下の BMP 6 結合性モノクローナル抗体または精製アイソタイプ対照と雰囲気温度で 1 ~ 2 時間にわたり反応させる。次いで、ウェルをヒト Ig G 1 またはヒト Ig M 特異的アルカリホスファターゼコンジュゲートプローブと反応させることができる。次いで、精製抗体のアイソタイプを決定し得るようにプレートを現像および解析する。

【 0 3 6 6 】

BMP 6 結合性モノクローナル抗体の、BMP 6 ポリペプチドを発現する生細胞への結合を裏付けるためにフローサイトメトリーを使用することができる。略述すると、BMP 6 を発現する細胞株（標準的な成長条件下で成長させた）を、0.1%のBSAおよび10%のウシ胎仔血清を含有するPBS中に多様な濃度のBMP 6 結合性抗体と共に混合し、37 で1時間にわたりインキュベートすることができる。洗浄後、細胞を一次抗体染色と同じ条件下でフルオレセイン標識化抗ヒトIg G 抗体と反応させる。試料は、単一の細胞にゲートをかけるように光特性および側方散乱特性を使用するFACSscan装置により解析することができる。蛍光顕微鏡法を使用する代替的なアッセイをフローサイトメトリーアッセイ（それに加えてまたはその代わりに）使用することができる。細胞は、上記で記載した通りに正確に染色し、蛍光顕微鏡法により検討することができる。この方法は、個々の細胞の視覚化を可能とするが、抗原の密度に応じて感度が低下する場合がある。

【 0 3 6 7 】

本発明のBMP 6 結合性抗体およびそれらの抗原結合性断片は、ウェスタンブロット法により、BMP 6 ポリペプチドまたはBMP 6 抗原性断片との反応性についてさらに調べることができる。略述すると、精製BMP 6 ポリペプチドもしくは融合タンパク質またはBMP 6 を発現する細胞に由来する細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロース膜へ移し、10%のウシ胎仔血清でブロッキングし、被験モノクローナル抗体でプローブする。抗ヒトIg G アルカリホスファターゼを使用してヒトIg G 結合を検出し、BCIP/NBT基質タブレット（Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.）で現像することができる。

【 0 3 6 8 】

機能的アッセイの例は、下記の実施例節でも記載する。

【 0 3 6 9 】

予防的使用および治療的使用

本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、BMP 6 活性の増大と関連する疾患または障害を処置する方法を提供する。具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、貧血を処置する方法を提供する。

【 0 3 7 0 】

本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を使用して、とりわけ貧血の進行を防止することができる。本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片は、貧血患者の処置のための他の療法と組合わせて使用することもできる。

【 0 3 7 1 】

一実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、BMP 6 関連疾患またはBMP 6 関連障害を処置する方法を提供する。公知のBMP 6 関連疾患またはBMP 6 関連障害の例は、非限定的な例として、慢性疾患性貧血（ACD）、慢性腎疾患（CKD）性（例えば、CKDと関連する）貧血、がん性貧血、炎症性貧血、赤血球生成刺激剤（ESA）抵抗性貧血（例えば、エリスロポエチン（EPO）抵抗性貧血）、ESA低応答性貧血（例えば、EPO低応答性貧血）、機能的鉄欠損性貧血および/または鉄欠乏性貧血を含む貧血を含む。

【 0 3 7 2 】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断

10

20

30

40

50

片を、それを必要とする対象に投与することにより、BMP6関連疾患またはBMP6関連障害を処置する方法であって、前記疾患または障害は、貧血である、方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患性貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患である。一実施形態では、慢性疾患は、がんである。一実施形態では、慢性疾患は、炎症である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、鉄欠乏性貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

10

【0373】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、BMP6関連疾患またはBMP6関連障害を処置する方法であって、前記疾患または障害は、機能的鉄欠損性貧血である、方法を提供する。一実施形態では、対象は、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。一実施形態では、対象は、慢性腎疾患を伴う、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。

【0374】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、貧血を処置する方法を提供する。具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、貧血を処置する方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性腎疾患性貧血である。一実施形態では、貧血は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血は、鉄欠乏性貧血である。一実施形態では、貧血は、腎疾患、例えば慢性腎疾患と関連する貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

20

【0375】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、BMP6関連疾患またはBMP6関連障害を処置する方法であって、前記疾患または障害は、機能的鉄欠損性貧血である、方法を提供する。一実施形態では、対象は、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。一実施形態では、対象は、慢性腎疾患を伴う、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。

30

【0376】

具体的な実施形態では、本発明は、貧血を処置する方法を提供する。

【0377】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体またはその抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、対象のESA（例えば、EPO）の投与の必要を低減する方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患性貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患である。一実施形態では、慢性疾患は、がんである。一実施形態では、慢性疾患は、炎症である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、鉄欠乏性貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

40

【0378】

複数の実施形態では、本発明の方法および使用は、患者のESA抵抗性指数（ERI）

50

の低下をもたらす。

【0379】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体またはその抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、対象のESA（例えば、EPO）の投与の必要を低減する方法であって、前記対象は、機能的鉄欠損性貧血を有する、方法を提供する。一実施形態では、対象は、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。一実施形態では、対象は、慢性腎疾患を伴う、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。

【0380】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、対象のESA（例えば、EPO）の投与の必要を低減する方法を提供する。一実施形態では、対象は、貧血を有する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患性貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患である。一実施形態では、慢性疾患は、がんである。一実施形態では、慢性疾患は、炎症である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、鉄欠乏性貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

【0381】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、対象のESA（例えば、EPO）の投与の必要を低減する方法であって、前記対象は、機能的鉄欠損性貧血を有する、方法を提供する。一実施形態では、対象は、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。一実施形態では、対象は、慢性腎疾患を伴う、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。

【0382】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、対象の鉄（例えば、IV鉄）必要投与量を低減する方法を提供する。一実施形態では、対象は、貧血を有する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患性貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患である。一実施形態では、慢性疾患は、がんである。一実施形態では、慢性疾患は、炎症である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、鉄欠乏性貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

【0383】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、対象の鉄（例えば、IV鉄）必要投与量を低減する方法であって、前記対象は、機能的鉄欠損性貧血を有する、方法を提供する。一実施形態では、対象は、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。一実施形態では、対象は、慢性腎疾患を伴う、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。

【0384】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、対象の鉄（例えば、IV鉄）必要投与量を低減する方法を提供する。一実施形態では、対象は、貧血を有する。一実施形態では、貧血は、慢性

10

20

30

40

50

疾患性貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患である。一実施形態では、慢性疾患は、がんである。一実施形態では、慢性疾患は、炎症である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、鉄欠乏性貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

【0385】

具体的な実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、対象の鉄（例えば、IV鉄）必要投与量を低減する方法であって、前記対象は、機能的鉄欠損性貧血を有する、方法を提供する。一実施形態では、対象は、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。一実施形態では、対象は、慢性腎疾患を伴う、ESA（例えば、EPO）で処置されている慢性血液透析患者である。

10

【0386】

具体的な実施形態では、本発明は、対象の鉄（例えば、IV鉄）必要投与量を低減し、対象のESA（例えば、EPO）の投与の必要を低減する方法であって、本発明の抗体もしくは抗原結合性断片または前記抗体もしくは抗原結合性断片を含む組成物を投与するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患性貧血である。一実施形態では、慢性疾患は、慢性腎疾患である。一実施形態では、慢性疾患は、がんである。一実施形態では、対象は、貧血を有する。一実施形態では、慢性疾患は、炎症である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）抵抗性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、ESA（例えば、EPO）低応答性貧血である。一実施形態では、貧血（例えば、慢性疾患性貧血）は、鉄欠乏性貧血である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、慢性血液透析（HD）対象である。上記の実施形態のいずれかを含む複数の実施形態では、対象は、腎疾患、例えば末期腎疾患を有する。

20

【0387】

一実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与することにより、隔離された鉄を移動させる方法を提供する。

30

【0388】

一実施形態では、本発明は、有効量の本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、隔離された鉄を移動させる方法を提供する。

【0389】

一実施形態では、本発明は、エリスロポエチンおよび/または鉄（例えば、IV鉄）の投与に対する必要を軽減しながら、貧血を伴う対象におけるヘモグロビンのレベルを改善する（例えば、上昇させる）方法であって、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患に関連する貧血である。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、その内容が全体的に本明細書に組込まれる臨床実務ガイドライン、例えばKidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 279-335により指定されるレベルへのレベルの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも約11.0 g/dL、例えば約11.0 g/dL ~ 約12.5 g/dLへの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも11.0 g/dL、例えば11.0 g/dL ~ 12.5 g/dLへの改善を含む。

40

50

【0390】

一実施形態では、本発明は、エリスロポエチンおよび/または鉄（例えば、IV鉄）の投与に対する必要を低減しながら、貧血を伴う対象におけるヘモグロビンのレベルを改善する（例えば、上昇させる）方法であって、本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患に関連する貧血である。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、その内容が全体的に本明細書に組込まれる臨床実務ガイドライン、例えばKidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 279 - 335により指定されるレベルへのレベルの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも約11.0 g/dL、例えば約11.0 g/dL ~ 約12.5 g/dLへの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも11.0 g/dL、例えば11.0 g/dL ~ 12.5 g/dLへの改善を含む。

10

【0391】

一実施形態では、本発明は、エリスロポエチンおよび/または鉄（例えば、IV鉄）の投与に対する必要を低減しながら、貧血を伴う対象におけるヘモグロビンのレベルを維持する方法であって、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患に関連する貧血である。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、その内容が全体的に本明細書に組込まれる臨床実務ガイドライン、例えばKidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 279 - 335により指定されるレベルへのレベルの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも約11.0 g/dL、例えば約11.0 g/dL ~ 約12.5 g/dLへの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも11.0 g/dL、例えば11.0 g/dL ~ 12.5 g/dLへの改善を含む。

20

30

【0392】

一実施形態では、本発明は、エリスロポエチンおよび/または鉄（例えば、IV鉄）の投与に対する必要を低減しながら、貧血を伴う対象におけるヘモグロビンのレベルを維持する方法であって、本発明の抗体を含む組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法を提供する。一実施形態では、貧血は、慢性疾患に関連する貧血である。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、その内容が全体的に本明細書に組込まれる臨床実務ガイドライン、例えばKidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 279 - 335により指定されるレベルへのレベルの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも約11.0 g/dL、例えば約11.0 g/dL ~ 約12.5 g/dLへの改善を含む。一実施形態では、ヘモグロビンのレベルの改善は、ヘモグロビンのレベルの少なくとも11.0 g/dL、例えば11.0 g/dL ~ 12.5 g/dLへの改善を含む。

40

【0393】

一実施形態では、表1および/または表14に記載される単離抗体またはその抗原結合性断片を、それを必要とする患者に、本明細書に記載されているかまたは当技術分野で公

50

知の治療法または手順などの治療法または手順と共に投与することができる。このような方法または手順は、非限定的な例として、治療有効量のESA（例えば、EPO）、エリスロポエチンまたは鉄の投与および輸血を含む。処置は、典型的には、1週間、1カ月間、3カ月間、6カ月間または1年間にわたり、ある間隔で継続する。一部の患者では、処置を最長で患者の余命にわたり投与する。

【0394】

本発明の治療剤を別の薬剤と併せて投与する場合、2つをいずれかの順序で逐次的に投与することもでき、同時に投与することもできる。一部の態様では、本発明の抗体を、第2の薬剤または方法（例えば、ESA、エリスロポエチン、鉄、輸血）による治療も施される対象に投与する。他の態様では、結合性分子を手術による処置と共に投与する。

10

【0395】

BMP6結合性抗体による組合せ処置に適する薬剤は、当技術分野で公知の薬剤であって、BMP6の発現、レベル、安定性および/または活性を阻害するかまたは低減する薬剤を含む。このような薬剤は、BMP6に対する抗体、siRNAおよび低分子を含む。

【0396】

当技術分野では、BMP6に対する多様な抗体であって、とりわけAndriopoulos et al. 2009 Nat. Genet. 41:482-487; Arndt et al. 2010 Gastroent. 138:372-382; Bames et al. 1995 World J. Urol. 13:337-343; Camaschella et al. 2009 Nat. Genet. 41:386-388; Celeme et al. 1999 Int. J. Cancer 80:250-256; Corradini et al. 2011 Hepatol. 54:273-284; Crews et al. 2010 J. Neuro. 30:12252-12262; Dai et al. 2005 Cancer Res. 65:8274; Darby et al. 2007 J. Pathol. 214:394-404; Hadziahmetovic et al. 2011 179:335-348; Hamdy et al. 1997 Cancer Res. 57:4427; Haudenschield et al. 2004 Cancer Res. 64:8276; Hee et al. 2008 J. Orth. Res. 27:162-168; Herrera et al. 2009 BMC Cell Biol. 10:20; Inagaki et al. 2005 Endocrin. 147:2681-2689; Jung et al. 2008 Stem Cells 26:2042-2051; Kaiser et al. 1998 J. Invest. Derm. 111:1145-1152; Kautz et al. 2011 Haematol. 96:199-203; Khalaf et al. 2012 Eur. J. Endocrin. 168:437-444; Kochanowska et al. 2002 Exp. Biol. Med. 227:57-62; Li et al. 2006 Int. J. Med. Sci. 3:97-105; Meynard et al. 2011 Blood 118:747-756; Pederson et al. 2008 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:20764-69; Plant et al. 2002 J. Bone Min. Res. 17:782-790; Schluesener et al. 1994 Atheroscl. 113:153-156; Schluesener et al. 2004 GLIA 12:161-164; Shi et al. 2009 Fert. Steril. 92:1794-1798; Varley et al. 1996 Exp. Neur. 140:84-94; Wang et al. 2007 Mol. Cell. Neurosci. 34:653-661; およびZhang et al. 2006 Neurosci. 138:47-53; 米国特許第8,795,665号明細書; ならびに国際公開第2010/056981号パンフレットにおいて記載されている抗体を含む抗体が公知である。当技術分野では、BMP6に対するさらなる抗体も公知であり、多くが市販されている。

20

30

40

【0397】

50

当技術分野では、BMP6に対する多様なsiRNAであって、とりわけHe et al. 2003 Cell. Signal. 25: 1372 - 1378; Ikeda et al. 2012 PLoS 0040465; Kautz et al. 2008 Blood 112: 1503; Mi et al. 2011 J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137: 245; Xia et al. 2007 J. Biol. Chem. 282: 18129 - 18140; Xia et al. 2008 Blood 111: 5195; およびYang et al. 2009 Int. J. Bioch. Cell Biol. 41: 853 - 861において記載されているsiRNAを含むsiRNAが公知である。

【0398】

10

BMP6のさらなる阻害剤も公知である。これらのいずれかを、本明細書で開示される任意の抗体またはその抗原結合性断片と組合わせて使用することができる。

【0399】

組合せ療法レジメンは、相加的結果をもたらす場合もあり、相乗結果（例えば、BMP6活性の低減であって、2つの薬剤の組合せ使用について予測される低減を超える低減）をもたらす場合もある。一実施形態では、本発明は、貧血または上記で記載した別のBMP6関連疾患を、本発明のBMP6結合性抗体と、ESA、エリスロポエチン、鉄または輸血などの抗貧血剤または方法とにより阻止および／または処置するための組合せ療法を提供する。

【0400】

20

診断的使用

一態様では、本発明は、生物学的試料（例えば、血液、血清、細胞、組織）に関連して、BMP6および／または核酸発現ならびにBMP6機能を決定するための診断アッセイ、あるいは個体が貧血と関連する疾患もしくは障害に罹患しているかどうか、または貧血と関連する障害を発症する危険性があるかどうかを決定するための診断アッセイを包含する。

【0401】

競合アッセイなどの診断アッセイは、共通の結合パートナー上の限定的な数の結合部位について被験試料解析物と競合する標識化類似体（「トレーサー」）の能力に依拠する。一般に、結合パートナーを競合前または後に不溶化させ、次いで結合パートナーに結合したトレーサーおよび解析物を、結合しなかったトレーサーおよび解析物から分離する。この分離は、デカントすること（結合パートナーをあらかじめ不溶化させた場合）または遠心分離すること（結合パートナーを競合反応後に沈殿させた場合）により達せられる。被験試料解析物の量は、マーカー物質の量により測定される結合したトレーサーの量に反比例する。被験試料中に存在する解析物の量を定量的に決定するために、既知量の解析物による用量反応曲線を調製し、試験結果と比較する。酵素を検出可能マーカーとして使用する場合、これらのアッセイをELISA系と呼ぶ。この形態のアッセイでは、抗体とBMP6結合性抗体との競合的結合は、血清試料中の抗体、最も特に血清試料中の中和抗体についての尺度である結合したBMP6、好ましくは結合した本発明のBMP6エピトープを結果としてもたらす。

30

40

【0402】

アッセイの著明な利点は、測定を中和抗体（すなわちBMP6、具体的にはエピトープの結合に干渉するもの）について直接行うことである。特に、ELISA試験の形態におけるこのようなアッセイは、臨床環境およびルーチンの血液スクリーニングにおいて無視できない適用を有する。

【0403】

貧血と関連する障害を伴う患者についての臨床診断またはモニタリングでは、正常対象に由来する対応する生物学的試料中のレベルと比較したBMP6タンパク質の検出は、貧血と関連する障害を伴う患者を示す。

【0404】

50

インビボにおける診断法またはイメージングは、米国特許出願公開第2006/0067935号明細書において記載されている。略述すると、これらの方法は、一般に、検出可能なマーカーまたは標識へ作動可能に接合させた診断的有効量のBMP6結合性分子を非侵襲的方法により患者に投与または導入するステップを含む。抗体-マーカーコンジュゲートに局在化し、BMP6に結合するのに十分な時間を与える。次いで、患者を検出デバイスへ曝露して検出可能マーカーを同定し、これにより患者の組織内のBMP6結合性分子の画像を形成する。BMP6結合性抗体またはその抗原結合性断片の存在は、抗体-マーカーが組織の構成要素に結合するかどうかを決定することにより検出する。貧血を伴わない正常個体と比較したBMP6タンパク質またはタンパク質の組合せのレベルの上昇の検出は、貧血と関連する障害に対する素因および/またはこれらの発症を示す。本発明のこれらの態様は、組織イメージング法および診断法と処置法との組合せにおける使用のための態様でもある。

10

【0405】

本発明は、診断アッセイ、予後診断アッセイ、薬理遺伝学および臨床試験のモニタリングを予後診断（予測）の目的で使用して、これにより個体を予防的に処置する予測医学の分野にも関する。

【0406】

本発明は、個体が、BMP6経路活性の調節異常と関連する障害を発症する危険性があるかどうかを決定するための予後診断（または予測）アッセイも提供する。例えば、BMP6遺伝子内の突然変異について生物学的試料中でアッセイすることができる。このようなアッセイを予後診断または予測の目的で使用して、これによりBMP6、核酸の発現または活性を特徴とするか、またはこれらと関連する障害が発症する前に個体を予防的に処置することができる。

20

【0407】

本発明の別の態様は、個体におけるBMP6核酸の発現またはBMP6の活性を決定し、これによりその個体に適切な治療剤または予防剤を選択する方法（本明細書では「薬理遺伝学」と称する）を提供する。薬理遺伝学は、個体の遺伝子型（例えば、特定の薬剤に応答する個体の能力を決定するのに検討される個体の遺伝子型）に基づく個体の治療的処置または予防的処置のための薬剤（例えば、薬物）の選択を可能とする。

【0408】

本発明のさらに別の態様は、薬剤（例えば、薬物）のBMP6の発現または活性に対する影響を臨床試験においてモニタリングする方法を提供する。

30

【0409】

医薬組成物

本発明は、薬学的に許容される担体と併せて製剤化されたBMP6結合性抗体またはその結合性断片を含む医薬組成物を提供する。組成物は、BMP6関連疾患（例えば、貧血）の処置または防止に適する1つまたは複数の他の治療剤もさらに含有し得る。薬学的な担体は、組成物を増強するかもしくは安定化させるか、または組成物の調製を容易にする。薬学的に許容される担体は、生理学的に適合性の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。

40

【0410】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で公知の様々な方法により投与することができる。投与経路および/または投与方式は、所望される結果に応じて変化する。投与は、静脈内投与、筋内投与、腹腔内投与もしくは皮下投与であるか、または標的部に近接して投与することができる。薬学的に許容される担体は、静脈内投与、筋内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与または表皮投与（例えば、注射または注入による）に適するものとする。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち二特異性分子および多特異性分子である抗体は、化合物を、化合物を不活化し得る酸および他の天然の状態の作用から保護する材料でコーティングすることができる。

【0411】

50

組成物は、滅菌でありかつ流体であるものとする。適正な流体性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することにより維持することができ、分散液の場合、要求される粒子サイズを維持し、界面活性剤を使用することにより維持することができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖、マンニトールまたはソルビトールなどの多価アルコールおよび塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の長時間吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを組成物中に組入れることによりもたすことができる。

【0412】

本発明の医薬組成物は、当技術分野において周知であり、日常的に実施されている方法に従って調製することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; および Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 を参照されたい。医薬組成物は、GMP 条件下で製造することが好ましい。典型的には、本発明の医薬組成物中では、BMP 6 結合性抗体の治療的に有効な用量または治療的に効果的な用量が利用される。BMP 6 結合性抗体は、当業者に公知の従来の方法により、薬学的に許容される剤形へ製剤化する。投与レジメンは、所望される最適応答（例えば、治療的応答）をもたすように調整する。例えば、単一のボラスを投与することもでき、複数に分割された用量をある期間にわたり投与することもでき、治療状況の要件により示されるのに応じて用量を比例的に低減するかまたは増大させることもできる。投与の容易さおよび投与量の均一性のために、非経口組成物を投与量単位形態で製剤化することがとりわけ有利である。本明細書で使用される投与量単位形態は、処置される対象のための単位投与量として適する物理的に個別の単位を指す。各単位は、要求される医薬担体との関連で、所望の治療効果をもたすように計算された所定量の活性化化合物を含有する。

【0413】

本発明の医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、患者に毒性とならずに、特定の患者、組成物および投与方式に所望される治療的応答を達成するのに有効な量の有効成分を得るように変化させることができる。選択される投与量レベルは、利用される本発明の特定の組成物またはそれらのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時期、利用される特定の化合物の排出速度、処置の持続期間、利用される特定の組成物と合わせて使用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全般的健康および医療既往歴などの因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。

【0414】

医師または獣医師は、医薬組成物中で利用される本発明の抗体およびそれらの抗原結合性断片の投与を、所望の治療効果を達成するのに要求されるレベル未満のレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投与量を漸増させることができる。一般に、本明細書に記載されるアレルギー性の炎症性障害を処置するために有効な本発明の組成物の用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、または投与される他の薬物および処置が予防的であるか治療的であるかを含む、多くの異なる因子に応じて変化する。処置投与量は、安全性および有効性を最適化するように滴定することが必要である。抗体の全身投与では、投与量は、宿主の体重 1 kg 当たり約 0.0001 ~ 100 mg の範囲であり、より通例では宿主の体重 1 kg 当たり 0.001 ~ 15 mg の範囲である。例示的な処置レジメンは、1 回あるいは投与スケジュール（例えば、反復投与）で 2 回以上、例えば 2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回もしくは毎月 1 回または 3 ~ 6 カ月ごとに 1 回の全身投与（例えば、静脈内または皮下）を伴う。抗体の硝子体内投与では、投与量は、約 0.0001 mg ~ 約 10 mg の範囲である。例示的な処置レジメンは、2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回もしくは毎月 1 回または 3 ~ 6 カ月ごとに 1 回の全身投与を伴う。

【 0 4 1 5 】

抗体は、通例、複数回投与する。単回の投与間の間隔は、毎週、毎月または毎年であり得る。間隔は、患者におけるBMP6結合性抗体の血中レベルを測定することにより示される通り不規則でもあり得る。全身投与のいくつかの方法では、投与量は、抗体の血漿中濃度1~1000 g/mlを達成するように調整し、いくつかの方法では25~500 g/mlを達成するように調整する。代わりに、抗体は、持続放出製剤として投与することもでき、この場合、低頻度の投与が要求される。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変化する。一般に、ヒト化抗体は、キメラ抗体および非ヒト抗体の半減期より長い半減期を示す。投与量および投与頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて変化し得る。予防的適用では、比較的低い投与量を比較的低い頻度の間隔で長期にわたり投与する。一部の患者には患者の余生にわたり処置を施し続ける。治療的適用では、場合により、比較的高い投与量が、疾患の進行が軽減されるか終結するまで比較的小さい間隔で要求され、好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで要求される。その後、患者には予防的レジメンを投与することができる。

10

【 0 4 1 6 】

具体的な実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片を含む組成物を0.001 mg/kg~0.1 mg/kgの用量（抗体またはその抗原結合性断片）で投与する。具体的な実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片を含む組成物を約0.001 mg/kg~約0.1 mg/kgの用量で投与する。具体的な実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片を含む組成物を0.001 mg/kg、0.0016 mg/kg、0.0025 mg/kg、0.0040 mg/kg、0.0063 mg/kg、0.01 mg/kg、0.016 mg/kg、0.025 mg/kg、0.040 mg/kg、0.063 mg/kgまたは0.1 mg/kgの用量で投与する。具体的な実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片を含む組成物を約0.001 mg/kg、約0.0016 mg/kg、約0.0025 mg/kg、約0.0040 mg/kg、約0.0063 mg/kg、約0.01 mg/kg、約0.016 mg/kg、約0.025 mg/kg、約0.040 mg/kg、約0.063 mg/kgまたは約0.1 mg/kgの用量で投与する。一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片を含む組成物を、例えば上記で列挙した用量のいずれかを含む用量で静脈内投与する。複数の実施形態では、静脈内投与は、静脈内注入である。複数の実施形態では、注入を30~60分間にわたり行う。複数の実施形態では、注入を約30~60分間にわたり行う。

20

30

【 0 4 1 7 】

フェリチンのレベル

開示された方法は、生物学的試料（例えば、血液または血清）からのフェリチンのレベルの決定を含み得、複数の実施形態では、患者（例えば、本明細書に記載される疾患、例えば貧血を有する患者）は、BMP6アンタゴニストによる処置のために選択される（例えば、本明細書に記載されるもの、例えばBMP6抗体、例えば抗体7、例えば表1に記載されるもの）か、またはフェリチンのレベルに基づくBMP6アンタゴニスト治療に対して応答を有すると予測される。

【 0 4 1 8 】

複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答（例えば、応答の増大）を予測するフェリチンのレベルは、約1500 ng/mL以下である。複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答（例えば、応答の増大）を予測するフェリチンのレベルは、1500 ng/mL以下である。複数の実施形態では、フェリチンのレベルは、1500 ng/mL未満である。複数の実施形態では、フェリチンのレベルは、約2000 ng/mL以下である。複数の実施形態では、フェリチンのレベルは、2000 ng/mL以下である。複数の実施形態では、フェリチンのレベルは、約2000 ng/mL未満である。

40

【 0 4 1 9 】

複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答（

50

【 0 4 2 0 】

10

20

30

40

10

40

50

20

30

50

10

20

30

40

50

【 0 4 2 8 】

【 0 4 2 9 】

複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えば B M P 6 による処置に対する応答 (

50

20

30

50

10

20

30

40

50

20

50

例えば、応答の増大)を予測するフェリチンのレベルは、1300 ng/mL ~ 2000 ng/mLである。複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答(例えば、応答の増大)を予測するフェリチンのレベルは、1400 ng/mL ~ 2000 ng/mLである。複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答(例えば、応答の増大)を予測するフェリチンのレベルは、1500 ng/mL ~ 2000 ng/mLである。複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答(例えば、応答の増大)を予測するフェリチンのレベルは、1600 ng/mL ~ 2000 ng/mLである。複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答(例えば、応答の増大)を予測するフェリチンのレベルは、1700 ng/mL ~ 2000 ng/mLである。複数の実施形態では、フェリチンのレベル、例えばBMP6による処置に対する応答(例えば、応答の増大)を予測するフェリチンのレベルは、1800 ng/mL ~ 2000 ng/mLである。好ましい複数の実施形態では、全ての範囲は、列挙された終点値を含む。

10

【0435】

複数の実施形態では、上記のフェリチンのレベルは、血液および血清から選択される生物学的試料から測定される。複数の実施形態では、上記のフェリチンのレベルは、血清から測定される。

【0436】

アッセイの技術、診断方法および伝達可能な形態の情報を生成する方法

20

開示された方法は、低い鉄レベルに関連する疾患、例えば本明細書に記載される疾患、例えば貧血の治療、予防または改善、ならびに疾患を有する患者のBMP6アンタゴニスト、例えば抗体7(例えば、表1に記載されるもの)による処置に対する応答可能性の予測に有用である。これらの方法は、とりわけ、患者からの試料中において、例えば本明細書に記載されるように、患者が特定のレベルのフェリチンを有するかどうかを決定することを利用する。

【0437】

患者からの生物学的試料は、任意の適用可能な従来の手段によってフェリチンのレベルについてアッセイされ得る。

【0438】

30

マーカー(例えば、タンパク質)の存在、遺伝子またはタンパク質の発現のレベルおよびタンパク質の活性を同定するために、多くの生物学的試料、例えば血液、滑液、パフィーコート、血清、血漿、リンパ、糞便、尿、涙液、唾液、脳脊髄液、口腔粘膜検体、痰または組織が用いられ得る。生物学的試料内の多様な供給源が、開示される方法において使用され得、例えばフェリチンのレベルについて患者からの生物学的試料、例えば血液または血清をアッセイし得る。

【0439】

本発明者らは、フェリチンのレベルが、BMP9アンタゴニストによる治療に対する応答を決定または予測するのに有用なバイオマーカーであり得ることを決定した。したがって、当業者は、フェリチンのレベルについて患者からの生物学的試料、例えば血液または血清をアッセイすることにより、対象が所与のレベルのフェリチンを有するかどうかを同定し得ることを理解するであろう。好ましい複数の実施形態では、患者の血清を分析して、対象が特定のレベルのフェリチンを有するかどうかを決定する。他の好ましい複数の実施形態では、患者の血液を分析して、対象が特定のレベルのフェリチンを有するかどうかを決定する。

40

【0440】

本明細書に記載されるように、本発明は、フェリチンのレベルが貧血または本明細書に記載される他の疾患に対するBMP6拮抗作用(例えば、表1に記載される抗体7)に対する応答の改善を予測するのに有用であり得るという結論に部分的に基づく。フェリチンの検出は、免疫細胞化学染色、ELISA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット

50

、分光光度法、HPLCおよび質量分析を含むが、これらに限定されない当技術分野で公知の任意の方法を用いて実施することができる。試料中のポリペプチド産物を検出する1つの方法は、マーカータンパク質と特異的に相互作用することができる結合性タンパク質（例えば、フェリチンタンパク質に結合することができる抗体）であるプローブによる方法である。好ましくは、標識抗体、その結合性部分または他の結合パートナーを用いることができる。抗体は、起源がモノクローナルまたはポリクローナルであり得、または生合成により産生され得る。結合パートナーも天然に存在する分子であり得、または合成により産生され得る。複合タンパク質の量は、当技術分野で記載される標準的なタンパク質検出法を用いて決定される。免疫学的アッセイの設計、理論およびプロトコルの詳細なレビューは、*Practical Immunology*, Buttt, W. R., ed., Marcel Dekker, New York, 1984を含む当技術分野における多くのテキストに見出すことができる。標識抗体によりタンパク質を検出するための多様なアッセイが利用可能である。直接標識は、抗体に結合させた蛍光または発光タグ、金属、染料、放射性核種などを含む。間接標識は、アルカリホスファターゼ、水素ペルオキシダーゼなどのような当技術分野で周知の多様な酵素を含む。1段階アッセイでは、ポリペプチド産物は、存在する場合、固定化し、標識抗体と共にインキュベートする。標識抗体は、固定化標的分子に結合する。洗浄して非結合分子を除去した後、試料を標識についてアッセイする。

【0441】

タンパク質またはポリペプチドに対して特異的な固定化抗体の使用も本開示により企図される。抗体は、磁性またはクロマトグラマトリックス粒子、アッセイ場所（マイクロタイターウエルなど）の表面、固体基質材料（プラスチック、ナイロン、紙など）の断片等などの様々な固体支持体上に固定化することができる。アッセイストリップは、アレイにおける抗体または複数の抗体を固体担体上にコーティングすることによって調製することができる。次いで、このストリップを試験試料中に浸し、洗浄および検出ステップにより速やかに処理して、着色スポットなどの測定可能なシグナルを発生させることができる。

【0442】

2段階アッセイでは、固定化マーカー（例えば、フェリチン）を非標識抗体と共にインキュベートすることができる。非標識抗体複合体は、存在する場合、非標識抗体に対して特異的である第2の標識抗体に結合させる。試料を洗浄し、標識の存在についてアッセイする。抗体を標識するのに用いるマーカーの選択は、用途によって異なる。しかし、当業者にとってマーカーの選択は容易に決定可能である。抗体は、放射性原子、酵素、発色団もしくは蛍光部分または比色タグにより標識され得る。タギング標識の選択も所望の検出限界に依存する。酵素アッセイ（ELISA）は、典型的には、酵素タグ複合体と酵素基質との相互作用により形成される着色生成物の検出を可能にする。放射性原子のいくつかの例には、³²P、¹²⁵I、³Hおよび¹⁴Pが含まれる。酵素のいくつかの例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼが含まれる。発色団部分のいくつかの例には、フルオレセインおよびローダミンが含まれる。抗体は、当技術分野で公知の方法によりこれらの標識にコンジュゲートされ得る。例えば、酵素および発色団分子をジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミドなどのカップリング剤により抗体にコンジュゲートさせ得る。代わりに、コンジュゲーションは、リガンド-受容体対により発生し得る。いくつかの適切なリガンド-受容体対は、例えば、ビオチン-アビジンまたは-ストレプトアビジンおよび抗体-抗原を含む。

【0443】

一態様では、本開示は、生物学的試料中のポリペプチド産物を検出するためのサンドイッチ法の使用を企図する。この技法は、目的のタンパク質に結合する能力がある2つの抗体、例えば固体担体上に固定化されたもの、および溶液中で遊離であるが、ある種の容易に検出できる化合物で標識されたものを必要とする。第2の抗体に用いることができる化学標識の例は、放射性同位体、蛍光化合物および反応物または酵素基質に曝露した場合に

10

20

30

40

50

着色または電気化学的に活性な生成物を生ずる酵素または他の分子を含むが、これらに限定されない。ポリペプチド産物を含有する試料をこの系に入れた場合、ポリペプチド産物は、固定化抗体および標識抗体の両方に結合する。その結果が担体表面上の「サンドイッチ」免疫複合体である。複合タンパク質は、非結合試料成分および過剰な標識抗体を洗い流し、担体の表面上のタンパク質と複合した標識抗体の量を測定することによって検出する。良好な検出限界を有する標識が使用されていれば、サンドイッチイムノアッセイは、高度に特異的であり、非常に高感度である。

【0444】

好ましくは、試料中のポリペプチド産物の存在は、ラジオイムノアッセイもしくは酵素結合イムノアッセイ、競合的結合性酵素結合イムノアッセイ、ドットプロット、ウェスタンプロット、クロマトグラフィー、好ましくは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または当技術分野で公知の他のアッセイにより検出する。タンパク質またはポリペプチドへの抗体の特異的免疫学的結合は、直接的または間接的に検出することができる。

【0445】

ドットプロットリングは、抗体をプローブとして使用して所望のタンパク質を検出するために当業者によって日常的に実施されている（Promega Protocols and Applications Guide, Second Edition, 1991, Page 263, Promega Corporation）。試料は、ドットプロット装置を用いて膜に塗布される。標識プローブを膜とインキュベートし、タンパク質の存在を検出する。

【0446】

ウェスタンプロット分析は、当業者に周知である（Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Vol. 3, Chapter 18, Cold Spring Harbor Laboratory）。ウェスタンプロットでは、試料はSDS-PAGEで分離される。ゲルは、膜に転移させる。所望のタンパク質を検出するために膜を標識抗体とインキュベートする。

【0447】

上記のアッセイは、免疫プロットリング、免疫拡散、免疫電気泳動または免疫沈降のなどのステップを伴うが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、自動分析装置を使用してフェリチンの存在および/またはレベルを決定する。

【0448】

フェリチン活性のレベルは、例えば、Kochan et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A. 108 (19): 7745 - 50に記載の方法を介して、当技術分野において開示される多様な方法によってアッセイされ得る。

【0449】

比較の目的で、患者からのフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性のレベルは、対照からのフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性のレベルと比較され得る。対照は、場合により、BMP6アンタゴニスト（例えば、表1に記載の抗体7）による処置によく応答することが知られている対象（例えば、貧血患者）またはBMP6アンタゴニスト（例えば、表1に記載の抗体7）による処置への応答が不十分であることが知られている対象から得たフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性の参照レベルであり得る。発現の対照レベルは、参照対象（すなわちBMP6アンタゴニスト（例えば、表1に記載の抗体7）による処置によく応答することが知られている貧血患者またはBMP6アンタゴニスト（例えば、表1に記載の抗体7）による処置への応答が不十分であることが知られている対象）由来の生物学的試料から得たものであり得、または以前に参照対象から得た数値標準（例えば、平均値、中央値、範囲、[+/-標準偏差]）であり得る。いくつかの実施形態では、対照は、BMP6アンタゴニストによる処置への応答が不十分であることが知られている対象から得られるフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性の参照レベルであり、患者から

10

20

30

40

50

のフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性（場合により）のレベルがこの対照と比較される。他の実施形態では、対照は、BMP6アンタゴニストによる処置によく応答することが知られている対象から得られるフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性の参照レベルであり、処置される患者からのフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性のレベルがこの対照と比較され、ここで、（対照と比較して）患者における類似した（例えば、統計的に類似した）レベルのフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性は、患者がBMP6アンタゴニスト（例えば、表7に記載の抗体7）による処置に応答する上昇した可能性を有するであろうという指標を提供する。

【0450】

フェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性の存在またはレベルを決定することを必要とする本明細書に記載される方法のいずれかを実施することにおいて、患者が目的のマーカー（またはマーカーのレベル）を有するかどうかを判断するための患者の組成に関する十分な情報を含むデータリポジトリを調べることにより、そのような決定が行われ得る。好ましくは、データリポジトリは、個体における目的のマーカーおよびマーカーのレベルを収載している。データリポジトリは、適切な情報または遺伝データを保存することができるコンピュータまたは他の電子または非電子媒体によりアクセスできる個々の患者記録、医療データカード、ファイル（例えば、フラットASCIIファイル）を含み得る。本明細書で使用される医療データカードは、磁気データカード、オンボード処理ユニットを有しドイツ、ミュンヘンのSiemensなどの製造供給元により販売されているスマートカードまたはフラッシュメモ리카ードなどの携帯型保存デバイスである。データリポジトリがコンピュータによりアクセスできるファイルである場合、そのようなファイルは、サーバ、クライアント、ハードディスク、CD、DVD、スマートフォンなどの携帯情報端末、Palm Pilot、テーブルコーダ、ジップディスク、コンピュータの内部ROM（読み出し専用メモリ）またはインターネットもしくはワールドワイドウェブを含む多様な媒体に格納され得る。コンピュータによりアクセスできるファイルの保存用の他の媒体は、当業者に明らかである。

【0451】

典型的には、フェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性のレベルが決定されると、医師または遺伝カウンセラーまたは患者または他の研究者は、その結果を知らされ得る。具体的には、結果は、他の研究者もしくは医師または遺伝カウンセラーもしくは患者に知らせるかもしくは伝達できる伝達可能な形態の情報として投入することができる。そのような形態は、変化し得るものであり、有形または無形であり得る。試験を受けた個体における結果は、説明的陳述、図表、写真、チャート、画像または他の視覚形態として具体化することができる。例えば、ゲル電気泳動または捕捉アッセイの画像は、結果を説明するのに用いることができる。フェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性のレベルに関する記述も試験結果を示すのに有用である。これらの陳述および視覚形態は、紙、コンピュータ可読媒体（フロッピーディスク、コンパクトディスクなど）などの有形媒体または無形媒体、例えばインターネットもしくはイントラネット上の電子メールもしくはウェブサイトの形態の電子媒体に記録することができる。さらに、試験を受けた個体における結果は、音声形態で記録し、電話、ファクシミリ、無線携帯電話、インターネット電話などにより、適切な任意の媒体、例えばアナログまたはデジタルケーブル回線、光ファイバーケーブルなどを通じて伝達することもできる。そのような全ての形態（有形および無形）は、「伝達可能な形態の情報」を構成することとなる。したがって、試験結果に関する情報およびデータは、世界のあらゆる場所で生成し、異なる場所に伝達することができる。伝達可能な形態の試験結果は、そのようにして米国に輸入することができる。したがって、本開示は、個体におけるフェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性のレベルを含む伝達可能な形態の情報を生成する方法も包含する。この形態の情報は、本明細書に記載される疾患、例えば貧血を有する患者のBMP6アンタゴニストによる応答性を予測し、その情報に基づいて処置過程を選択し、そ

10

20

30

40

50

の情報に基づいて患者を選択的に処置するのに有用である。

【0452】

本明細書には、フェリチンタンパク質のレベルを有する患者がBMP6アンタゴニストによる処置に応答する（例えば、同じまたは類似の疾患に罹患している患者の一般集団と比べて高い有効性で応答する）可能性を予測する方法であって、患者からの生物学的試料中のフェリチンのレベルを検出するステップを含み、本明細書に記載されるフェリチンのレベル、例えば1500 ng/mL以下は、患者がBMP6アンタゴニストによる処置に応答する上昇した可能性を示す、方法が開示される。

【0453】

いくつかの実施形態では、方法は、患者から生物学的試料を得るステップをさらに含み、得るステップは、アッセイするステップの前に実施される。

10

【0454】

いくつかの実施形態では、生物学的試料は、滑液、血液、血清、糞便、血漿、尿、涙液、唾液、脳脊髄液、白血球試料および組織試料からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、血液または血清である。

【0455】

いくつかの実施形態では、フェリチン発現、フェリチンタンパク質またはフェリチン活性の存在および/またはレベルは、イムノアッセイ、免疫組織化学、ELISA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、HPLCおよび質量分析からなる群から選択される技法によって検出される。

20

【0456】

開示された方法および使用のいくつかの実施形態では、BMP6アンタゴニストは、BMP6結合性分子またはBMP6受容体結合性分子である。いくつかの実施形態では、BMP6結合性分子またはBMP6受容体結合性分子は、BMP6結合性分子である。いくつかの実施形態では、BMP6結合性分子は、BMP6抗体またはその抗原結合性部分である。

【0457】

開示された方法および使用のいくつかの実施形態では、BMP6抗体は、例えば、表1に記載される抗体7である。

【0458】

30

処置方法およびBMP6アンタゴニストの使用

開示された方法は、臨床医が本明細書に記載される疾患に罹患している患者、例えば貧血患者のための個別治療を提供することを可能にし、すなわち、開示された方法は、患者をBMP6アンタゴニスト（例えば、抗体7、例えば表1に記載されるもの）により選択的に処置するかどうかを決定することを可能にする。このようにして、臨床医は、本明細書に記載される疾患、例えば貧血を患っている患者の全集団において、BMP6拮抗作用の利益を最大化し、リスクを最小化することができる。BMP6アンタゴニスト、例えばBMP6結合性分子（例えば、BMP6抗体またはその抗原結合性部分、例えば抗体7、例えば表1に記載されるもの）またはBMP6受容体結合性分子（例えば、BMP6受容体抗体またはその抗原結合性部分）は、特に本明細書に記載されるフェリチンのレベルを有する患者において、本明細書に記載される疾患、例えば本明細書に開示される貧血（例えば、徴候および症状など）の処置、予防または改善に有用であることが理解されるであろう。

40

【実施例】

【0459】

以下の実施例は、本発明をさらに例示するために提示されるものであり、その範囲を限定するために提示されるものではない。本発明の他の変形形態は、当業者に容易に明らかとなり、付属の特許請求の範囲によって包含される。

【0460】

実施例1 - 抗BMP6抗体のインビトロ活性およびインビボ活性ならびにPK/PD

50

材料

被験化合物は、50 mMのクエン酸緩衝液、pH 7.0、150 mMのNaCl中に約8 mg/mlの濃度の抗体5、抗体6および抗体7（表8）であり、動物投与前にPBS中で希釈した。雄C56BL/6マウスまたは雄Sprague Dawleyラットを使用した（表9）。

【0461】

【表23】

表 8. BMP6 アンタゴニスト抗体の特性

抗体 ID	フレームワーク	KD(nM) BMP6	IC50(ug/ml) BMP6 レポーター
抗体 5	VH3_15, VH1	0.1	0.06
抗体 6	VH3_15, VH1	<0.1	0.08
抗体 7	VH3_15, VH1	0.1	0.07

10

【0462】

【表24】

表 9. 動物の特徴

種	系統	類別	販売元	性別	年齢
マウス (Mus musculus)	C57BL/6	野生型	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	雄	8-9 週齢
ラット (Rattus norvegicus)	Sprague Dawley	野生型	Charles River Laboratory, Wilmington, MA	雄	8-12 週齢

20

【0463】

BMPレポーター遺伝子アッセイのために、ホタルルシフェラーゼを駆動するプロモーター [Korchynskyi et al., 2002, J. Biol. Chem., 277: 4882-91] 内にBMP応答性エレメントであるBREを含有するレンチウイルスベクターは、pGL4-BRE2-Luc2に由来した。レンチウイルスベクターを使用して、HEP3B肝臓がん細胞株に安定的にトランスフェクトした。細胞株を、10%のウシ胎仔血清、1%のペニシリン/ストレプトマイシンおよび5 ug/mlのブラスティンに伴うEMEM中で維持した。組換えヒトBMPタンパク質は、R&D Systemsから購入した。

30

【0464】

60 mlのボトル中のウシ流産菌 (Brucella abortus) リング検査抗原 (株1119-3) は、U.S. Department of Agriculture、Animal and Plant Health Inspection Service、National Veterinary Services Laboratories、Ames、Iowaから購入した。ブルセラ症リング検査抗原は、フェノール化緩衝液中の殺滅され、染色されたウシ流産菌 (B. abortus) 株1119-3細胞の懸濁液を含有する。60 mLずつのボトルの濃度は、1 mL当たりの粒子約 10^9 個である。 5×10^9 の原液を以下の方式で洗浄および調製する。まず、60 mlのボトルを冷蔵庫から取り出し、完全に混合する。次いで、500 mLのBAを500 mLの遠心分離機用ボトルへ移す。次いで、超遠心分離機を使用して、これらを10,000 rpmで15分間にわたり遠心分離する。上清を取り出し、100 mLのPBS中に再懸濁させる結果として1 mL当たりの粒子 5×10^9 個の原液をもたらし、これをアリコート分割し、-80 で凍結させた。

40

【0465】

動物の維持条件

馴致期間中および研究期間中、動物をmicro-isolator非金網底ケージ内で集団的に飼育した。動物は、室温を21~23 とし、湿度を30~70%とする以下の通りの標準的な明周期：12時間にわたる暗期、12時間にわたる明期（明期オン：午前6：30、明期オフ：午後6：30）下に保った。馴致期間中および研究期間中、動物

50

には齧歯動物用飼料および水へ自由にアクセスさせた。

【 0 4 6 6 】

実験条件

B M P レポーター遺伝子アッセイにおける抗体活性の決定

典型的なアッセイでは、 0.6×10^4 個の B R E - L u c 2 H E P 3 B 細胞を 3 8 4 ウェルプレート内の 2 5 u l の基礎培養培地中に播種したが、血清は、2 % まで低減した。翌日、P B S 中で希釈された抗体を添加するのにつき、B M P 6 を 1 0 n g / m l の最終濃度まで添加した。血清を伴わない E M E M 培地により、容量を 5 0 u l とし、最終血清濃度を 1 % とした。カウンターアッセイとして B M P 2 / 4 / 7 による活性化を並行して行った。B r i g h G l o アッセイ (P r o m e g a) は、製造元の指示書に従い、E n v i s i o n プレートリーダー (P e r k i n E l m e r) を使用して、抗体添加後 2 4 時間にわたり実施した。データは、各抗体について、対照抗体による完全なレポーター活性化と比較した阻害パーセントとして計算した。

【 0 4 6 7 】

ラットにおける単回投与による抗体の薬物動態研究

ラット P K トリアージ研究は、規定された統計学的確実性で古典的な P K パラメータを決定するのではなく、被験抗体について血清半減期の推定値をもたらすことを意図するものである。3 匹の動物に抗体の単回 I V 注射を施した。

【 0 4 6 8 】

マウス用量反応 P K / P D 研究のために、動物を等しい数の 2 つの個別のコホートへ分けた。各コホートは、ビヒクル処置マウスおよび化合物処置マウスの両方を含む。1 つのコホートを抗体注射後 2 、 4 日目に解析にかけたのに対し、第 2 のコホートを 6 、 8 日目に解析した。コホート分離の理由は、血清鉄パラメータに対する影響を最小限に保つように逐次的採血に対する必要を低減することである。動物群を表 1 0 に示す。

【 0 4 6 9 】

【表 2 5】

表 10. デザイン、動物の割り付け、および被験薬の用量

実験	群	番号	用量 (mg/kg, IV)	頻度
マウス PK/PD	対照 hlgG	5	0.5	1 回
	0.05 mpk 抗体 6	5	0.05	1 回
	0.1 mpk 抗体 6	5	0.1	1 回
	0.5 mpk 抗体 6	5	0.5	1 回
マウス BA 貧血	偽(BA なし)	6	0	0
	BA, EPO+ 対照 hlgG	6	2	1 回
	BA, EPO+ 抗体 5	6	2	1 回
	BA, EPO+ 抗体 6	7	2	1 回
	BA, EPO+ 抗体 7	6	2	1 回

【 0 4 7 0 】

マウスにおける炎症性貧血の確立および治療的処置

注射のための B A 粒子 5×10^8 個は、以下の方式 (マウス 1 0 匹の例) で調製する。マウス 1 匹当たり 2 0 0 u l を注射するため、出発濃度は、1 m l 当たりの粒子 2.5×10^9 個であることが必要である。P B S を使用して原液を 2 倍に希釈する。例えば、マウス 1 0 匹 $\times 0.200 \mu l = 2 m l + 20\%$ の過剰量 = 1 m l 当たりの粒子 2.5×10^9 個による 2 . 2 m L は、1 . 1 m l の B A 原液 + 1 . 1 m L の P B S を必要とした。E S A 処置の 1 ~ 8 日前における B A 投与は、6 ~ 7 日間後における H G B 応答の鈍化を結果としてもたらすことが示された。

【 0 4 7 1 】

C57BL/6 マウスにBA (マウス1匹当たりの粒子 3×10^8 個) を注射し、5 時間後に血清IL6 レベルをELISA (KMCO061、Life Technologies) により測定して炎症応答を決定した。IL6 濃度が全てのBA 処置動物についての平均値の95% 信頼区間より小さい動物を研究から除外した結果として、一部の群ではマウスが5~6 匹より少なくなった。この除外過程を実行して、ESA 応答を鈍化させるのに十分な炎症を示さなかった動物を組入れることによりもたらされる偽陽性結果の可能性を低下させた。除外過程後、6 日目にマウスに表示の抗体をIV 注射し、EPO (100 g/kg の皮下ダルベポエチンアルファ、Amgen) をBA 処置に対して7 日目に100 mg/kg で投与した。ESA および抗体療法に対する応答を6 日間後に測定した。
【0472】

10

薬物動態、薬力学および有効性評価項目についての解析

マウスおよびラットによるPK/PD 研究のために、抗体注射後の表示の時点において血清試料を回収した。ピオチニル化抗ヒトIgG を一次捕捉抗体とする自動式ハイスループットイムノアッセイシステム (Gyros) を介して、循環抗体濃度を決定するのに血清のアリコートを使用した。各試料の第2 の血清アリコートは、定量的比色鉄アッセイ (Quintichrom、DIFE-250、Bioassay Systems) のために使用した。第3 のアリコートを、既に記載された改変手順に従うラットまたはマウスヘプシジン25 ペプチドのLC-MS による定量化のために処理した。Li et al. 2009. J. Pharm. Tox. Meth. 59: 171-80。

【0473】

20

BA 誘導性貧血/抗体処置研究のために、EDTA コーティングBD Microtainer チューブによる最終採血は、終了時に心臓穿刺を介して得た。全血をXT-2000 iV 血液分析装置上の全血球算定解析のために使用した。有効性評価項目は、HGB、HCT、RETA およびRET-HE を含む。

【0474】

統計学的解析

一元分散分析 (ANOVA) に続き、Bonferroni の事後検定を実行して血液学パラメータの群間差について解析する ($p < 0.05$ を有意と考える)。データは、平均値 \pm SEM として報告する。

【0475】

30

結果

細胞内BMP 依存的転写アッセイにおけるBMP 6 アンタゴニスト抗体の生物学的活性

3 つのBMP 6 アンタゴニスト抗体5、抗体6 および抗体7 の全ては、ヒト肝臓がん細胞株であるHep3 B 内の組換えヒトBMP 6 に誘導されるBMP レポーター (BRE-luc) 活性の生体活性を完全に阻害し (0.3 nM のrhBMP 6 に対するIC50 = 0.4 nM)、したがってAg:mAb = 1:1 以上のモル比で活性である。抗体は、BMP 2、BMP 5 およびBMP 7 を含む類縁のBMP ファミリータンパク質を500 倍以上のウィンドウで上回る良好な選択性を裏付けた。図1 を参照されたい。

【0476】

ラットにおけるBMP 6 アンタゴニスト抗体の薬物動態プロファイルおよび薬力学プロファイル

40

Sprague Dawley ラットにおける単回投与トリアージ薬物動態研究を、BMP 6 抗体5、抗体6 および抗体7 について、頸静脈カテーテルを介する体重1 kg 当たり10 mg のIV 注射により実施した。3 つの抗体の血清中の総抗体濃度 - 時間関係 (特に $t_{1/2}$ 、MRT) を標準的なプロファイルと比較することにより、典型的なヒトIgG と符合する特徴が示唆される (図2 および表11 を参照されたい)。標的により媒介される薬物貯留の証拠は見られない。この用量において、全てのBMP 6 抗体は、血清ヘプシジンを注射後1 日目までに検出レベルを下回るように抑制した。ヘプシジン発現の強い抑制の持続は、16 日目までやはり明らかであったことから、活性の長い持続期間が示唆される。これに対応して、循環鉄濃度の一過性のピーク上昇が抗体注射後2 日目に観察され

50

、レベルは、16日目まで高レベルを維持した。

【0477】

血清抗体濃度は、単回の抗体注射後、時間経過にわたり測定した。試料は、投与（10 mg / kg、IV）の1時間、6時間、1、2、4、8、16、28日後に回収した。

【0478】

【表26】

表 11. 単回投与ラットリアージ PK 研究における重要パラメータ

パラメータ	抗体 5	抗体 6	抗体 7
T _{1/2} (H)	9.1	7.8	9.2
C _{max} (ug/ml)	140.7	189.0	146.2
平均貯留時間(日)	8.6	7.0	6.9

10

【0479】

同様に、抗体7（遊離の抗体7およびBMP6に結合した抗体7の両方）の総血清濃度も、抗体7（ラットでは、10、3、1、0.3、0.1および0.03 mg / kgの用量；カニクイザルでは、3 mg / kgの用量）の単回のIV注射後、表示の時点のラットおよびカニクイザルにおいて、ラットにおけるLLOQを46 ng / mL（点線）とし、サルにおけるLLOQを0.2 ug / mL（点線）とするELISAにより測定した。結果を図9（ラット）および図12（サル）に示す。

【0480】

20

マウスおよびカニクイザルのBMP6抗体処置後における血清鉄パラメータの用量依存的応答

BMP6抗体処置に対する鉄代謝の用量依存的応答をさらに規定するために、ナীব C57BL / 6マウスに、表示の通り0.02 ~ 0.5 mg / kgの範囲で用量を上昇させる抗体6を注射した。抗体6は、3つの抗体が同様のフレームワーク、齧歯動物のPKプロファイルおよびインビトロにおける活性を共有するため、それらを代表するものとして選択した。0.5または0.1 mg / kgの単回投与は、血清ヘプシジンを著明に抑制し、したがって処置の2日後に血清鉄濃度を増大させた。しかし、わずか0.5 mg / kgでも、注射後最長8日間にわたり、鉄代謝に対する強い持続的効果が観察された。図3を参照されたい。これらの結果は、強力なBMP6アンタゴニスト抗体を使用して、用量依存的で飽和可能な標的中和を容易に達成し得ることを示唆する。

30

【0481】

図3を参照されたい。BMP6抗体の、鉄代謝についての血清バイオマーカーに対する用量依存的効果、上：表示の用量の抗体6の単回IV注射後における、時間経過にわたる血清hIgG濃度である。下：左パネルは、単回の抗体6または対照ヒトIgG注射後における血清ヘプシジン濃度についての定量的解析であるのに対し、右パネルは、血清鉄濃度である。

【0482】

同様の実験を抗体7で実施した。循環血清ヘプシジンの抗体7による用量および時間依存的抑制を雄Sprague-Dawleyラットにおいて調べた。血清試料は、抗体7の単回投与を0.03 mg / kg ~ 10 mg / kgの範囲の用量のIV注射により投与した、0.25、1、2、6時間ならびに1、2、4、7および14日後に回収した。血清ヘプシジンレベルは、LLOQ = 9 ng / mLとするLC / MSにより測定した。同じ動物において血清鉄レベルも測定した。結果を図11に報告する。

40

【0483】

これらの結果は、本発明の抗BMP6抗体が血清鉄の用量依存的増大を引き起こすことが可能であることを示す。効果は、頑健であり、抗体投与後、少なくとも2週間にわたり持続した。

【0484】

抗BMP6抗体に応答する血清鉄パラメータに対する効果もカニクイザルにおいて調べ

50

た。雄力ニクイザルに用量を $3 \text{ mg} / \text{kg}$ とする抗体 7 の単回静脈内注射を施した。注射の表示の日数後において血清試料を回収し、総血清鉄 (Fe) 濃度および総血清ヘプシジン濃度について解析した。結果を図 13 に示す。3 匹の個々の動物に由来するデータを提示する (投与前のベースラインレベルに対してプロットする)。平均値を「x」線により示す。血清鉄の増大および血清ヘプシジンの抑制は、抗体投与の 24 時間後に観察され、効果 (投与前レベルと比べた) は、28 日間にわたる研究の終了時まで維持された。これらの結果は、本発明の BMP 6 抗体が非ヒト霊長動物におけるヘプシジンの発現を強力に低減し、循環鉄濃度を誘導することを示す。

【0485】

マウスの炎症駆動型 ESA 抵抗性貧血における赤血球パラメータに対する BMP 6 抗体の効果

10

炎症性貧血のマウスモデルにおける抗 BMP 6 抗体の治療有用性を査定する実験を実施した。図 4 を参照されたい。ウシ流産菌 (*Brucella abortus*) 抗原 (BA) で処理されたマウスは、6 日後に貧血を発症した。貧血性動物を、1 日間隔で開始した組換えエリスロポエチン (EPO) を加えた抗 BMP 6 抗体で処置し、抗体療法の貧血の進行に対する効果を BA に対して 13 日目にモニタリングした。HGB 値および HCT 値は、処置の開始 ~ 13 日目で低下し、これは、EPO 処置単独に対して抵抗性であった。BMP 6 抗体と EPO とによる組合せ処置は、EPO 応答を有効に元に戻し、HGB レベルおよび HCT レベルを有意に上昇させた。この効果は、RETA の持続的増大および網状赤血球のヘモグロビン含量の回復によっても反映されるエリスロポエチン活性の共時的刺激と関連したことから、赤血球生成コンパートメント内の機能的な鉄欠損に起因するヘム合成の是正が示唆される。

20

【0486】

図 4 を参照されたい。ESA 抵抗性炎症性貧血マウスモデルにおける BMP 6 抗体の治療的処置、上: BA 誘導型 ESA 抵抗性炎症性貧血モデルについての実験のスキームである。下: BA 処置の 13 日後における赤血球生成パラメータである。HGB: ヘモグロビン; HCT: ヘマトクリット; RETA: 網状赤血球カウント; RET-HE: 網状赤血球ヘモグロビン均等物である。BA + EPO + hIgG1 に対し、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ である。

【0487】

30

実施例 2 - ヒトにおける BMP 6 抗体について調べるための臨床計画

臨床試験計画: ヒト BMP 6 に結合する抗体またはその抗原結合性断片を使用する治療についての評価。

末期腎疾患 (ESRD) を伴う患者は、エリスロポエチン (EPO) を産生するとしてもわずかにのみ産生し、EPO に誘導される Hgb の合成を可能とするのに外因性 EPO の定期的な投与および鉄の静脈内 (IV) 注入を一般に必要とする。慢性血液透析 (HD) 患者の最大で 3 分の 1 は、主に鉄の細胞内隔離のために EPO に十分に応答しない。ヘプシジンは、主に腎臓によりクリアランスされるが、透析による除去は不十分である。したがって、慢性 HD 患者は、ヘプシジンレベルを著明に上昇させる傾向があり、これは、赤血球生成のための鉄の移動を妨げる。体内の鉄貯蔵が臨界レベル (高血清フェリチンレベルにより示される) に達したら、IV 鉄治療は、もはや有効でもなく、推奨もされない。現行のガイドラインは、IV 鉄をフェリチンレベルの高い貧血性透析患者に施すことに反対しており、したがって、これらの患者は、なお高度な EPO 用量を施される場合があり、関連する潜在的な EPO 低応答性貧血の危険性を伴う (Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group 2012)。EPO 低応答性貧血は、血液透析患者 (Kilpatrick et al 2008、Lopez-Gomez et al 2008、Fukuma et al 2012) および腹膜透析患者 (Suttorp et al 2013) における貧血および高 EPO 用量の両方と関連する全死亡原因の危険性の著明な増大を付与する。本開示のヒト BMP 6 に結合する単離抗体またはそれらの抗原結合性断片は、E

40

50

P OおよびI V鉄の投与の必要を同時に低減しながら、ヘモグロビン（H g b）レベルを改善することにより、鉄欠乏性貧血を伴う慢性腎疾患患者に利益をもたらし得る。E P O抵抗性指数（E P O用量のH g bレベルに対する比）の低下は、死亡危険性の低下と関連する。

【0488】

まとめると、本開示のヒトB M P 6に結合する単離抗体またはそれらの抗原結合性断片を使用する治療の目標は、隔離された鉄を移動させ、次いでこれによりE P O投与および鉄投与の必要を低減し、H g bレベルを改善することであり、これらの全ては、患者の転帰を改善することが予測される。これは、ヒトB M P 6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片を使用する治療について初めてヒトに投与する単回投与研究である。本研究は、慢性血液透析患者集団における安全性、忍容性、薬物動態、薬力学および有効性について評価する。本研究の目的は、ヒトB M P 6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片を使用する治療が、慢性腎疾患と関連する貧血におけるさらなる臨床開発を正当化するかどうかを査定することである。

10

【0489】

治験計画

研究設計

これは、慢性血液透析患者集団における安全性、忍容性、P K、P Dおよび有効性について評価するための、ヒトB M P 6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片について初めてヒトに投与する2パートの単回投与の非確認研究である。パート1は、初めてヒトに投与する単回投与のオープンラベルの用量設定研究である。パート2は、ヒトB M P 6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片の2つの用量レベルについて比較する無作為化、二重盲検、プラセボ対照の単回投与研究である。

20

【0490】

安全性評価は、身体検査、E C G、バイタルサイン、標準的な臨床的検査室査定（血液学指数、血液化学指数、血清鉄指数）、有害事象および重篤な有害事象のモニタリングを含むであろう。

【0491】

パート1

パート1の用途は、（a）単回投与の安全性、P K、P Dおよび忍容性を査定すること、ならびに（b）パート1において調べられ、投与の29日後におけるH g bの増大（ベースライン 0.5 g / d Lからの変化の中央値）を結果としてもたらす最低用量として規定される、ヒトB M P 6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片の最小P A D（薬理学的活性量）を決定することである。

30

【0492】

パート1の期間中、スクリーニング来院を行い、ここで、研究に参入する患者の適格性を決定する（図6）。適格な患者は、研究施設に受け入れ、ベースライン来院時に適格性基準について再査定する。ベースラインにおける全ての安全性査定の結果は、投与前に入手可能でなければならず、再検討されなければならない。

【0493】

40

図6は、パート1のための研究設計についての概観を提示する。患者は、ルーチンの透析来院の直後の1日目に研究施設を訪れるように求められる。次いで、患者は、ヒトB M P 6に結合する抗体またはその抗原結合性断片（正確な用量は、コホートに依存する）の注入を受ける。可能な場合、投与は、2透析間日（例えば、金曜日または土曜日）前の透析日に行うことが好ましいものとし、その日の透析セッション後に行う。しかし、可能でない場合、投与は、2透析間日に先行しない透析日に行うことができる。投与後、パート1における最初の2例の患者は、安全性評価およびP K / P D評価のために少なくとも48時間にわたり在院する。患者は、4および6日目にP K / P D評価のために研究施設に帰院し、次いで合計29日間にわたるP K評価および合計12週間にわたる安全性評価のためにも毎週研究施設に帰院し、およそ85日目に研究終了時の来院を行う。透析後P K

50

評価以外の全ての検査室検査を含む研究来院は、患者の規定の透析来院前に行うものとする。

【0494】

パート1は、薬理学的に活性でないと予測される用量で開始する。用量は、パート1の各後続のコホートについて、ヒトBMP6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片の単回投与後における各コホートのHgbの変化の中央値および「統計学的考察」の節で論じられ、図7で示されるトランスフェリン飽和度(TSAT)レベルに基づいて調整する。この決定木の用途は、鉄移動(投与の1週間後に患者6例のコホート内の少なくとも4例の患者において観察される50%超のトランスフェリン飽和度(TSAT)レベルにより示される)を誘導し、Hgbを増大させる最小投与可能用量を同定することである。鉄が移動するが、Hgbが投与の29日後に少なくとも0.5g/dL増大しない場合、臨床データを解析して潜在的な交絡因子(例えば、研究以外の過剰な瀉血に起因する失血)について評価する。該当する治験責任医師および治験依頼者の代表者は、各コホートの有害事象について再検討し、(a)慢性腎不全と関連する公知の医学的問題および(b)非臨床毒性所見に関連してこれらの事象について評価する。後続のコホートは、治験責任医師および治験依頼者が先に進めることが安全であると示すまで投与しない。

10

【0495】

図7は、パート1における用量の調整のためのアルゴリズムを提示する。Hgb測定を含む血液検査は、透析前に行われる。開始用量は、0.01mg/kgとする。パート1では、患者を患者最大で6例ずつの最大で6つのオープンラベルの投与コホートの1つへ割り付ける。上記で規定されたヒトBMP6に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片の最小PADをパート2のために選択される低用量アームとする。各後続のコホートの用量は、図7に示す通り、高用量に調整することもでき、低用量に調整することもできる。最低投与可能用量(0.001mg/kg)がHgbの増大の中央値0.5g/dLを結果としてもたらず場合、これを最小PADおよびパート2のために選択される低用量とし、パート1で査定された2番目の高用量をパート2のための高用量アームとする。パート1で査定された最高用量(0.1mg/kg)が最小PADである場合、パート2は、2つのアーム：プラセボおよび最小PADのみで進める。パート1でさらなる投与コホートが必要とされる場合、これらのコホートを本明細書に記載される通りに追加する。

20

【0496】

パート1の各コホートは、6例の患者を含むであろう。パート1の第1のコホート内の最初の2例の患者には、少なくとも7日間隔で投与する。パート1の後続のコホートの患者への投与タイミングは、それぞれの施設のスケジュールおよびサポートリソースに応じて実施可能なタイミングとする。全てのパート1の患者は、投与後12週間にわたり追跡される。

30

【0497】

パート2

パート2の用途は、(a)安全性、PK、PDおよび忍容性を査定すること、ならびに(b)プラセボと対比した、ヒトBMP6に結合する抗体の単回投与に应答するHgbの変化に基づいて有効性を決定することである。パート2は、最大で3つのアーム：最大で2つのAb投与アームおよびプラセボアーム(図8)を含むであろう。2つのAb投与アームは、パート1で生成されたデータに由来する。パート2は、3つのアームへ1:1:1で無作為化された約60例の患者を含むであろう。パート1で、最小PADが査定された最高用量(0.1mg/kg)でもある場合、パート2は、2つのアーム：最小PADおよびプラセボのみを有する。この場合、40例の患者を1:1の無作為化比で2つのアームへ無作為化する。パート2の標本サイズは、パート1におけるHgbのベースラインからの変化のばらつきに基づいて調整することができる。

40

【0498】

図8は、パート2のための研究設計を提示する。パート2の期間中、スクリーニング来院を行い、ここで、研究に参入する患者の適格性を決定する。適格な患者は、ベースライ

50

ン来院時に適格性基準に従って再査定される。ベースラインにおける全ての安全性査定の結果は、投与前に入手可能でなければならず、再検討されなければならない。

【0499】

患者は、ルーチンの透析来院の直後の1日目に研究施設を訪れるように求められる。次いで、患者は、無作為化された割り付けにより決定される通り、A bまたはプラセボの注入を施される。可能な場合、投与は、2透析間日（例えば、金曜日または土曜日）前の透析日に行うことが好ましいものとし、その日の透析セッション後に行う。しかし、可能でない場合、投与は、2透析間日に先行しない透析日に行うことができる。患者は、4および6日目に研究施設に帰院し、次いでフォローアップ評価のために毎週帰院する。フォローアップ来院時、患者は、ルーチンの安全性評価を受け、またPKデータも85日間にわたり収集する。研究来院は、患者の透析スケジュールに適合させるために、患者の規定の透析来院後に行うことができる。パート2に登録された全ての患者は、A b（またはプラセボ）の投与後12週間にわたり追跡される。

10

【0500】

EPO用量の管理（両方のパート）

両方のパート期間中の個別のEPO用量の調整は、各透析施設の標準治療プロトコールに従って管理する。施設プロトコールを施設評価の一部として再検討し、標準治療ガイドライン（KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease Anemia Work Group 2012）の遵守について確認する。研究期間中の任意の時点において13g/dL以上のHgbレベルを達成する患者は、目標レベルを上回るようにHgb値を管理するための施設独自のガイドラインに加えて、治験責任医師の指示による治療的瀉血により管理することができる。

20

【0501】

静脈内鉄の管理（両方のパート）

負荷用量のIV鉄（毎週100mg）を施される患者は、研究から除外する。毎週の維持IV鉄（毎週<100mg）を施される患者は、本研究に組入れることができる。毎週の維持IV鉄用量は、A b投与の1週目の開始時にも保持する。鉄指数は、A b投与後1週目にモニタリングし、レスキュー鉄治療および維持IV鉄管理は、管理的血液透析ユニットのプロトコールに従う標準治療ガイドラインに従う。施設プロトコールを施設評価の一部として再検討し、標準治療ガイドライン（KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease Anemia Work Group 2012）の遵守について確認する。

30

【0502】

研究設計についての根拠

2パート研究設計についての根拠

同じ患者集団内の2つのパートの根拠は、潜在的に治療未満用量へ曝露される患者およびコホートの数を最小化することを目途として、安全かつ効率的に最小PADを同定することである。パート2は、最小PADおよび最小PAD（パート1で決定された）を上回る1つの用量レベルのプラセボ群と比較した有効性について評価する。

40

【0503】

パート1は、単回投与の安全性、忍容性、PK/PDおよびオープンラベル研究におけるA bの最小PADを査定するように設計する。最小PADは、A b投与の29日後における各投与コホートのHgbの変化の中央値に基づいて決定する。PAD決定基準の根拠は、EPOに対する臨床的に有意な応答が、EPO用量の変化後、最長で4週間を要求し得ることである。A bが標的集団内の鉄を移動させる場合、これは、患者の現行のEPO用量がより頑健な赤血球生成効果を及ぼすことを可能とし得る。PAD決定基準に列挙された29日間にわたるHgbの範囲は、EPO用量（29日間にわたり約0.5g/dL）に応答したHgbの臨床的に有意かつ安全な増大速度に基づく。最大効果ではなく、最小PADを探索することの根拠は、過剰に頑健なHgb応答が、現行の標準治療ガイド

50

ライン (Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group 2012) における目標 Hg b 範囲により反映される通り、この患者集団における安全性に対する危険性であることである。パート 1 における安全性評価および忍容性評価の目標は、(a) 安全性シグナルを同定すること、および (b) 用量調整の決定を通知し、パート 2 (最小 PAD + 1 レベル高い用量) のために選択された用量がプラセボと比べた安全性および有効性の両方のさらなる査定に適することを確認することである。パート 1 は、安全性についてのバイアスのかからない評価をもたらすのに検出力が十分でないのに対し、パート 2 におけるプラセボ群および大きい標本サイズは、最小 PAD および 1 レベル高い用量におけるバイアスのかからない安全性評価を可能とするであろう。安全性、忍容性および PK / PD に加えて、パート 2 は、二重盲検研究におけるプラセボと対比した有効性について評価するようにも設計する。有効性評価は、主に Hg b に基づき、EPO 抵抗性指数 (ERI = 毎週の体重により調整された EPO 用量を Hg b で除した数) を重要な副次的評価項目として伴う。ERI は、所与の Hg b 値を達成するのに必要とされる EPO の量についての定量的尺度をもたらす、したがって Hg b 単独に加えて臨床的に重要な情報をもたらす。

【0504】

透析患者における F I H についての根拠

この初めてヒトに投与する (F I H) 研究は、健常ボランティア (H V) ではなく、慢性血液透析 (H D) 患者において行う。H V における抗ヒト BMP 6 A b に対する安全性、忍容性および PK / PD 応答についての査定は、いくつかの理由で、慢性 H D 患者へ敷衍することができない。

【0505】

H V と異なり、貧血、高血清フェリチンおよび低 T S A T を伴う慢性 H D 患者は、慢性的に蓄積された細胞内鉄貯蔵を有する。したがって、慢性 H D 患者では、安全性、忍容性および低用量の A b に応答した鉄移動と関連する薬理学的効果が最も適切に査定される。正常な腎機能を伴う H V では、ヘプシジン (BMP 6 は、この重要な調節因子である) は、腎臓により濾過され、尿中に効率的に排出され、低循環レベルをもたらす。これに対し、透析では、ヘプシジンの濾過は、それほど効率的ではなく、一過性であることから、慢性 H D 患者で高循環レベルがもたらされる (Zaritsky et al 2010)。さらに、正常な腎臓は、内因性 EPO レベルを動的に調整し、A b に応答した Hg b の変化は、明らかとならない可能性がある。したがって、BMP 6 経路によるヘプシジンのモジュレーションならびに A b の Hg b に対する効果と関連する安全性および忍容性は、慢性 H D 患者において最も適切に査定される。

【0506】

標的患者集団についての根拠

本研究は、EPO 低応答性、鉄欠乏性貧血の状況下において抗ヒト BMP 6 A b を査定するように設計する。確立された臨床ガイドライン (KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease Anemia Work Group 2012) は、EPO 低応答性を、EPO 用量の 2 つの増大、安定用量を最大 50 % 上回る増大と、安定 Hg b 濃度を維持する増大とに対する必要として規定している。提起される適格性基準は、貧血を伴う安定的な慢性 H D 患者ならびに鉄欠乏の臨床的指標：フェリチンの増大および低 T S A T (T S A T = 血清鉄結合能 / 総鉄結合能；T S A T は、血清鉄と極めて緊密に相関する) について選択するように設計する。さらに、EPO および I V 鉄用量の調整は、Hg b、T S A T およびフェリチンについての厳格な標準治療目標に準拠する。鉄および血液学パラメータの変化は、標準治療に従って管理されるため、この設計は、所望の Hg b 目標を超過する危険性を低減する。さらに、ベースラインの 1 週間前以内に負荷用量の I V 鉄を施される患者は、除外される。維持 I V 鉄を施されている患者は、組入れることができる (他の全ての適格性基準が満たされる場合)。これらの患者を組入れる根拠は、米国における現行の標準治療が、Hg b および T S A T を狭い限界内に維持することを指示

10

20

30

40

50

しており、したがって低 T S A T 適格性基準を満たすことを目的とする維持鉄療法の完全な中止が、T S A T が 25 % を下回る場合に患者を危険性に曝すことから、標準治療に従う I V 鉄負荷用量のコースが必然化されることである。しかし、維持 I V 鉄について適格な患者は、それらの毎週 I V 鉄用量を、A b を投与する週の開始時に保持し、モニタリングされる鉄指数に基づき、施設の標準治療プロトコールにより決定される維持 I V 鉄療法のみを再開する。

【0507】

処置の用量 / レジメン、持続期間についての根拠

開始用量についての根拠

最大推奨開始用量 (M R S D) は、ラットおよびカニクイザルにおいて行われた 13 週間 (14 回の投与) にわたる G L P 毒性研究に由来する無有害作用レベル (N O A E L) に基づいて計算した。動物は、0.1、1、10 および 100 m g / k g の毎週の I V ポーラス投与を施された。ヒト B M P 6 に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片の最終回投与後、1 および 100 m g / k g の投与群 (のみ) を、その後、ラットにおいて 16 週間にわたりまたはカニクイザルにおいて 24 週間にわたり追跡した。これらの研究に由来する N O A E L (0.1 m g / k g) のヒト同等用量 (H E D) をまず計算し (分子量 > 100 k D a である薬物に適切であると見なされる手法)、その後、貯蔵された鉄の量および赤血球生成に対する要求量など、非臨床種と患者との差を説明する安全性係数 10 をかけたことにより M R S D を推定した。非臨床種についての P K パラメータは、I N D 申請のための毒性研究において収集された毒性反応速度 (T K) データから推定した。次いで、患者における対応する P K パラメータを、アロメトリックスケーリングを使用して推定し、これらのパラメータを使用して、ヒト B M P 6 に結合する遊離の単離抗体またはその抗原結合性断片の濃度を所与の用量について患者における時間の関数として予測した。毒性研究に由来する T K データを患者におけるモデルベースの A b P K と比較することにより、N O A E L / H E D の 10 分の 1 の用量は、A b 濃度に基づく (最低で) 10 倍のマージンをもたらすと予測されることが示された。

【0508】

I V 鉄療法を投与された H D 患者は、健常動物より高度な鉄の組織貯蔵を有するため、動物研究において A b に応答して観察された血清鉄の最高レベルは、A b に対する予測ヒト鉄応答を過少推定し得る。しかし、健常の非貧血性動物と異なり、H D 患者は、放出血清鉄を赤血球生成のために活用すると予測され、したがって、動物モデルは、鉄上昇の持続期間を過大推定し得る。13 週間研究で観察される肝臓病態が 4 週間研究で観察されなかったことから、毒性は、鉄の急性放出に対する応答ではなく、血清鉄への累積的曝露によることが示唆される。

【0509】

非臨床種と患者との貯蔵鉄の予期される差を説明するために、M R S D は、血清鉄濃度についてのモデルベースの解析に基づいても予測した。毒性所見を結果としてもたらず血清鉄への累積的曝露を鉄曲線下面積 (F e A U C) として表した。この手法では、N O A E L 用量 (0.1 m g / k g) について計算される F e A U C は、十分に安全であると考えられた。次いで、患者において提起される M R S D のときの F e A U C を予測し、N O A E L のときの非臨床種における F e A U C と比較した。患者において M R S D のときにモデルにより予測される血清鉄曝露は、非臨床種における N O A E L のときの血清鉄曝露の 10 分の 1 未満であるため、N O A E L / H E D を安全性係数である 10 より減少させることは、M R S D の推定に十分であると見なされた。したがって、提起される M R S D は、0.01 m g / k g である。

【0510】

用量調整についての根拠

本研究では、最大被験用量 (x m a x) を 2 つの I N D 申請のための毒性研究の各々における N O A E L : 0.1 m g / k g に対応する H E D とする。最小投与可能被験用量 (x m i n) は、適合性研究に基づく技術的に投与可能な最低用量 : 0.001 m g / k g

である。M R S D (x 0) は、安全性基準、T S A T 基準およびH g b 基準に従って査定する(図7)。x 0 が投与前と比べてH g b の変化の中央値 < 0 . 5 g / d L を結果としてもたらず場合、x 0 とx m a x との間の自然対数スケール上の直線的な外挿(S 字型の用量反応関係を予測する)により、x + の選択(図7)が導かれるであろう。この用量漸増のための暫定用量は、上記に提示されている。これらの暫定用量は、各コホート間の非公式の中間解析におけるデータの再検討に基づいて調整することができる。この手法は、最小P A D を同定するか、またはx m a x に達するまで継続する。x m a x がH g b の変化の中央値 < 0 . 5 g / d L を結果としてもたらず場合、この用量の安全性について査定し、プロトコルを修正して、安全性データ、P K データおよびP D データに基づき、x m a x を超える用量のさらなるコホートを追加するかどうかの決定を下す。パート1における被験最高用量がH g b の増大の中央値 < 0 . 5 g / d L を結果としてもたらし、50 %を上回ってT S A T を増大させず、この用量がx m a x を下回る場合、プロトコルを修正してさらなるコホートを追加することができる。

10

【0511】

代わりに、x 0 が投与前と比べてH g b の変化の中央値 0 . 5 g / d L を結果としてもたらず場合、次のコホートのための用量をx m i n となるように調整する。x m i n もH g b の変化の中央値 0 . 5 g / d L を結果としてもたらず場合、x m i n を最小P A D と見なし、パート2ではx m i n およびx 0 について査定する。x m i n がH g b の変化の中央値 < 0 . 5 g / d L およびT S A T 50 % を結果としてもたらず場合(図7)、用量を、最小P A D を同定するまでまたは6つの用量(コホート)について査定するまで自然対数スケール上の区間(x m i n、x 0)内の直線的外挿により増大させる。区間(x m i n、x 0)内の暫定用量は、上記に提示されている。これらの暫定用量は、各コホート間の非公式の中間解析におけるデータの再検討に基づいて調整することができる。最小P A D は、投与前と比べてH g b の変化の中央値 0 . 5 g / d L を結果としてもたらず被験最低用量として規定する。

20

【0512】

A b は、非臨床毒性研究における有害所見と関連する血清鉄曝露未満の血清鉄曝露(F e A U C)を確保するようにI V 注入による単回投与として投与する。A b 溶液は、P K または投与直後の鉄バイオアベイラビリティに対する透析の潜在的な影響を最小化するように1日目の血液透析セッションの直後に注入する。透析後におけるさらに約30分間にわたる投与注入(投与日に限る)は、患者に対していかなる著明な危険性または不快感ももたらさないことが予測される。

30

【0513】

対照薬の選択のための根拠

パート2では、プラセボを対照薬として利用して、臨床転帰についてのバイアスのかからない査定を可能とする。

【0514】

中間解析/設計適応の目的およびタイミング

パート1では、6例ずつの患者による各コホートが投与後4週目の評価を終えた後、非公式の中間解析を行って次のコホートのための用量調整の決定を下す。該当する治験責任医師および治験依頼者の代表者を含む用量調整チームの全てのメンバーが、安全性マーカーおよびP D マーカーを再検討する。新たなコホートは、図7に記載される通り、安全性および忍容性が確認され、P D 条件が満たされた場合に限り始動する。パート1では、最大で5回にわたる非公式の中間解析を行う。公式の中間解析は、パート1の最終コホートの全ての患者が、被験用量の臨床効果を査定する投与後4週目の評価を終えた後に計画し、さらなる非臨床研究の潜在的な契機となり、体温、血圧、脈拍、E C G 査定、血液化学、血液鉄指数、E P O 抵抗性指数を後続の臨床的研究に通知することが可能であり、パート1で行われた最終コホートの29日目までを通して収集された有害事象を含める。

40

【0515】

最小P A D および最小P A D より1レベル高い用量をパート2のために選択する。最低

50

可能被験用量が H g b の増大 0 . 5 g / d L を誘導する場合、2 つの最低被験用量をパート 2 のために選択する。

【 0 5 1 6 】

危険性および有益性

本研究に参加する患者の潜在的な有益性は、処置時およびその後のある程度の期間にわたる E P O および I V 鉄の必要の低減ならびに H g b レベルの改善を含み得る。

【 0 5 1 7 】

本試験における患者に対する危険性は、適格性基準への準拠および A b 投与後最初の 4 8 時間にわたる全ての患者の緊密な臨床的モニタリング（およびパート 1 における最初の 2 例の患者の在院）により最小化する。

【 0 5 1 8 】

鉄移動と関連する潜在的な危険性は、（ a ）組織ならびに脾臓、肝臓、心臓、膵臓および脳下垂体などの臓器への鉄の再分布と、（ b ）特に血管内カテーテルを常駐させている患者における細菌への易感染性のわずかな増大を含む。適格性基準のいくつかは、合併症の危険性を低減する。肝機能検査のレベルの上昇は、鉄再分布との関連で見ることができる。肝機能は、血液学的パラメータおよび鉄パラメータと並行してモニタリングする。標準治療の H g b 目標の超過は、多血症を結果としてもたらし得る。H g b の管理、E P O 療法および鉄療法を企図することができる。

【 0 5 1 9 】

I V 鉄療法を投与された H D 患者は、健常動物より組織鉄貯蔵が高度である可能性があり、したがって、ヒト B M P 6 に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片で処置された患者において観察される血清鉄の最高レベルは、動物研究において見られる血清鉄の最高レベルを超え得る。しかし、健常動物と異なり、H D 患者は、放出血清鉄を赤血球生成のために活用すると予測され、したがって、動物モデルは、鉄上昇の持続期間を過大推定し得る。モデルにより予測される M R S D のときの A b に対する曝露量（例えば、C m a x、A U C）は、非臨床研究において N O A E L のときに観察される曝露の 10 分の 1 であることが予想される。この曝露は、前臨床研究で観察された肝臓トランスアミナーゼの上昇および肝臓内の単一細胞の壊死と関連する血清鉄曝露（A U C）レベルを結果としてもたらさないことが予測される。A b 用量の N O A E L への漸増は、記載された安全性査定に従って行う。慢性の鉄過負荷を伴う患者および非経口鉄を施される患者についての臨床経過は、A b により誘導される細胞内鉄の急性増大から生じ得る効果を必ずしも予測しない可能性が高い。したがって、A b に誘導される急性鉄毒性の潜在的な危険性は、おそらく低い。急性鉄毒性は、心臓、肝臓および / または膵臓に影響を及ぼし得る。急性鉄毒性の臨床症状は、心伝導障害、肝臓トランスアミナーゼの上昇および耐糖能異常 / 高血糖症を含み得る。重度の急性鉄毒性は、代謝性アシドーシス、電解質異常および神経症状も含み得る。急性鉄毒性が生じる場合、患者は、血液透析と組合わせたデフェロキサミンなどの鉄キレート化療法で応急処置することができる。研究の一部として、最大で 1 3 4 m L（パート 1）および 1 7 2 m L（パート 2）の血液を各患者から 1 1 5 日間にわたり回収するように計画する。任意の安全性所見のモニタリングのためにさらなる試料をこれに加える。これは、この集団に対する危険性とは考えられない。

【 0 5 2 0 】

現在、抗ヒト B M P 6 抗体に関する生殖系毒性研究は、実施されていない。カニクイザルにおける 1 3 週間毒性研究では、卵巣および精巣ならびに付随の生殖系臓器についての慎重な標準的組織病理学検査により、雄または雌の生殖系臓器に対する潜在的な作用が評価されている。処置関連作用は、観察されなかった。B M P 6 ノックアウトマウスは、胸骨骨化の遅延および鉄過負荷を示した（M e y n a r d e t a l 2 0 0 9）。

【 0 5 2 1 】

著明な胎児および母体の罹患率および死亡率が慢性血液透析と関連している。慢性血液透析を受ける女性（出生数 2 6 7）を、腎移植を施された女性（出生数 2 6 4）、血液透析を受ける女性と比較するレトロスペクティブの 1 つのコホート研究では、胎盤早期剥離

10

20

30

40

50

率、輸血率、胎内発育不全児率、胎児死率および母体死率の上昇が裏付けられた (Salim et al 2015)。したがって、出産の潜在的可能性を有する女性は、ヒト BMP 6 に結合する単離抗体またはその抗原結合性断片の投与時において、かつ最終回投与後 125 日間にわたり、妊娠を防止するのに高度に有効な避妊法を使用すべきである。

【0522】

集団

研究集団は、少なくとも毎週 2 回の慢性血液透析治療を要求し、機能的鉄欠損性貧血の臨床的証拠を有し、フェリチンレベルおよびトランスフェリン飽和度レベルにより決定される通り、見かけ上十分な鉄貯蔵量の存在下において、貧血と規定される末期腎疾患を伴う患者から構成されるであろう。パート 1 は、当初、6 つのコホート内に最大で 36 例の患者 (コホート 1 つ当たりの患者 6 例) について査定する計画を含む。6 つのコホート後、TSAT および Hgb に対する効果が見られず、安全性懸念 (該当する治験責任医師および治験依頼者の代表者により決定される) も見られない場合、さらなる患者 6 例ずつのコホート最大で 2 つを追加することができる (パート 1 における合計患者 48 例)。パート 2 は、最大で 3 つのアーム (さらなる査定のために、パート 1 から選択された 2 つの用量レベルおよびプラセボ群) からなり、アーム 1 つ当たりの患者最大で約 20 例を伴った (パート 2 における合計患者 60 例)。したがって、合計約 96 例の患者 (最大で 108 例) の登録を計画し、このうちの約 60 例をパート 2 において無作為化する。約 60 例の患者 (パート 1 における 12 例、パート 2 における 48 例) が研究を完了すると予測される。治験責任医師は、研究について検討下にある全ての患者が以下の適格性基準を満たすことを確認しなければならない。研究集団が全ての適格な患者を代表するために、治験責任医師は、さらなる基準を適用しないものとする。

【0523】

患者の選択は、スクリーニング時および最初のベースラインにおいて全ての適格性基準を通して確認することにより確立するものとする。適格性基準についての関連する記録 (例えば、チェックリスト) は、情報源の文書化により、研究施設で保存しなければならない。

【0524】

いかなる参入基準からの逸脱も患者を研究への登録から除外する。

【0525】

組入れ基準 (両方のパート)

本研究への組入れに適格な患者は、以下の基準の全てを満たさなければならない。説明同意文書は、任意の評価を実施する前に得なければならない。同意を書き表すことができない場合、理想的には、独立の信任を受けた立会人による公的な文書化および立合いを受けなければならない。

スクリーニング時の年齢 18 歳である。

スクリーニング前の少なくとも 2 カ月間にわたり血液透析依存的である。

末期腎疾患では、毎週少なくとも 2 回にわたり十分な血液透析を受ける。十分とは、スクリーニング前の最近の毎月の評価における Kt/V 1.2 として規定される。

透析施設の貧血管理プロトコルに従い、慢性エリスロポエチン (EPO) 療法を受ける。EPO 用量は、ベースライン前の 14 日間において 50% 以上増大させない。EPO 療法は、短期作用性製剤 (ダルベポエチンは不可) に限らなくてはならず、IV (SC は不可) 投与しなくてはならない。

Hgb 8.5 および < 11.5 g/dL を含む Hgb 8.5 であり、ベースラインにおける先行する 14 日間と対比した増大が 0.5 g/dL ではない。

ベースライン (スクリーニングを含み得る) 前の少なくとも 28 日間にわたるフェリチンが < 1500 ng/mL (端点を含む) である。代わりに、スクリーニング時にフェリチンが > 500 ng/mL および 1000 ng/mL である。

ベースライン前の 90 日間の 1 つの時点における最小のときの TSAT 30% およびベースラインにおける TSAT 30% である。

【 0 5 2 6 】

除外基準（両方のパート）

以下の基準のいずれかを満たす患者は、本研究への組入りに適格でない。研究集団が全ての適格な患者を代表することを確保するために、治験責任医師は、さらなる除外を適用することができない。

- 1．登録から5半減期以内の他の被験薬の使用または予測される薬力学効果が、ベースラインへ戻るまでのいずれか長い方の期間内にある。
- 2．治験薬または治療用抗体に対する過敏性の既往歴がある。
- 3．ヘモクロマトーシスの診断が既知である。
- 4．骨髄悪性腫瘍、リンパ悪性腫瘍または骨髄異形成症候群が既知である。 10
- 5．スクリーニング前の2カ月以内における透析、A V瘻、血栓症の既往歴またはスクリーニング前の6カ月以内におけるA V瘻、血栓症の2回以上の挿間が見られる。
- 6．重度の併発肝疾患／肝機能不全（チャイルド - ピュースコア 6）を伴うかまたは肝移植前である。7．心不全（New York Heart Association（NYHA）Functional Class IIIまたはIV）を伴う。
- 8．スクリーニングの過去2カ月以内において介入を要求する消化管出血が見られる。C型肝炎ウイルス（HCV）に感染した患者は、他の全ての肝機能適格性基準が満たされる場合に組入れられ得る。
- 9．ベースライン前の4週間以内におけるALT、ASTまたはビリルビン $1.5 \times \text{ULN}$ である。 20
- 10．スクリーニング時におけるインタクトPTH 750 pg/mL として規定されるコントロール不良の腎性骨ジストロフィーを伴う。
- 11．スクリーニング前の2週間の任意の時点における血管内カテーテル（中心静脈ラインまたは血液透析カテーテル）の常駐または抗生剤治療を要求する、活動性の感染などの重篤な感染症の危険性の増大の素因となる条件が見られる。
- 12．ベースライン前の4週間以内において輸血が実施されている。
- 13．ベースライン前の1週間以内において負荷用量（1週間当たり100mg）のIV鉄を受けている。
- 14．投与前の12カ月間以内における薬物乱用もしくはアルコール乱用の既往歴が見られるか、またはスクリーニング時に行われる検査室アッセイにより示される通りこのような乱用の証拠が見られる。 30
- 15．B型肝炎表面抗原検査の結果が陽性である。
- 16．HIV検査（ELISAおよびウェスタンブロット）の結果が陽性であることを含む、免疫不全症の既往歴がある。
- 17．高度に有効な避妊を、ヒトBMP6に結合する抗体または抗原結合性断片の投与後、最短で125日間にわたり使用する場合、出産の潜在的可能性を有する女性を本研究に登録することができる。高度に有効な避妊は、以下：a．全面的な禁欲（これが患者の好ましく通例の生活形態と符合する場合。定期的禁欲（例えば、カレンダー法、排卵法、排卵徴候体温法、排卵後法）および膣外射精は、許容可能な避妊法ではない）；b．男性／女性の避妊手術；c．経口式、注射式もしくは植込み式のホルモン避妊法の使用または子宮内デバイス（IUD）もしくは子宮内システム（IUS）もしくは同等な有効性（失敗率 $<1\%$ ）を有するホルモン避妊の他の形態、例えばホルモン膣リングもしくは経皮ホルモン避妊の1つと規定される。 40

【 0 5 2 7 】

処置

被験処置

本研究における被験治療は、ヒトBMP6に結合する抗体または抗原結合性断片、例えば抗BMP6 IgG1、完全ヒト抗体である。抗体は、溶液で提供する。原液の濃度は、投与される用量に従って施設内で希釈する。注入時間は、約30分間とコホートにわたり比較的一定に維持する。パート1は、オープンラベルの単回投与であり、パート2は、 50

二重盲検、単回投与で、マッチさせたプラセボ（ビヒクル対照）と比較する。抗ヒトBMP6 Abの活性物質およびプラセボは、バイアル内の液体として供給する。活性物質中の賦形剤とプラセボ中の賦形剤とは同一である。

【0528】

処置アーム

パート1では、患者を6例ずつの患者からなる最大6つの投与コホートの1つへ割り付ける。パート1は、オープンラベルの処置である。開始用量、最高用量および用量調整についての根拠は、上記に記載した。パート1のための暫定用量を表12（MRSDのときのHgb<0.5g/dL）および表13（MRSDのときのHgb 0.5g/dL）に示す。

【0529】

【表27】

表12: パート1の暫定用量レベル

MRSD用量レベルで Hgbが0.5 g/dL未満で ある場合	暫定用量	先行用量からの増分
1 (MRSD)	0.010 mg/kg	開始用量
2	0.016 mg/kg	60% ↑
3	0.025 mg/kg	60% ↑
4	0.040 mg/kg	60% ↑
5	0.063 mg/kg	60% ↑
6 (NOAEL)	0.100 mg/kg	60% ↑

10

20

【0530】

この表は、パート1の用量調整の指針のみのための例として意図されている。中間用量レベルも高用量レベルも使用することができ、一部の用量レベルは、各コホート間の非公式の中間解析時のデータ査定に基づいて省略することができる。実際の用量レベルは、Novartisにより、書面で確認され、新たなコホートにおける患者の処置前に全ての参加研究施設に提示される。

【0531】

【表28】

表13: パート1の暫定用量レベル

MRSD用量レベルで Hgbが0.5 g/dL以上で ある場合	暫定用量	先行用量からの増分
1 (MRSD)	0.0100 mg/kg	開始用量
2	0.0010 mg/kg	90% ↓
3	0.0016 mg/kg	60% ↑
4	0.0025 mg/kg	60% ↑
5	0.0040 mg/kg	60% ↑
6	0.0063 mg/kg	60% ↑

30

【0532】

この表は、パート1の用量調整の指針のみのための例として意図されている。中間用量レベルも高用量レベルも使用することができ、一部の用量レベルは、各コホート間の非公式の中間解析時のデータ査定に基づいて省略することができる。

40

【0533】

治験処置は、

- ・ A：プラセボの単回投与、
- ・ B：パート1で決定した最小PADにおける抗ヒトBMP6 Abの単回投与、
- ・ C：パート1で決定した最小PADを1レベル上回る用量レベルにおける抗ヒトBMP6 Abの単回投与

として規定される。

【0534】

50

併用処置

研究開始前および研究期間中、参入基準で規定された時間枠内で投与または服用された全ての処方医薬、市販薬および重要な非薬物療法（理学治療および輸血を含む）は、C R Fの「併用医薬／重要な非薬物療法」節に記録しなければならない。医薬項目は、商標名、単回投与および単一単位、投与回数および投与経路、治療の開始日および中止日および治療の理由に対して具体的であるものとする。

【 0 5 3 5 】

有効性／薬力学

有効性評価について下記で詳述する。有効性評価のための試料は、多様な時点で回収する。血液学検査値について評価する。H g b指数およびF e指数は、研究のパート1における用量調整査定の一部としての各コホート間の非公式の中間解析において再検討する。初期に設定した試料の回収回数が鉄とP Kとの間の関係を理解するために最適未満であると見なされる場合、試料の回収回数をパート1の後続のコホートにおいて改変することができる。

10

【 0 5 3 6 】

鉄指数パネル

抗ヒトB M P 6 A bは、F eを体内貯蔵部から移動させる結果として血清F e、トランスフェリン飽和度（T S A T）、不飽和鉄結合能（U I B C）、総F e結合能（T I B C）、フェリチンおよび網状赤血球ヘモグロビン含量（C H r）を含む血清F eパラメータの変化をもたらすことが予測される。これらは、検証されたアッセイを使用して血清中で測定する。

20

【 0 5 3 7 】

安全性

安全性評価について下記に詳述する。

【 0 5 3 8 】

身体検査

完全な身体検査は、全般的な外見、皮膚、頸部（甲状腺を含む）、眼、耳、鼻、喉、肺、心臓、腹部、背部、リンパ節、四肢末端についての検査、血管検査および神経学的検査を含むであろう。医療既往歴および／または徴候に基づき、適応である場合、直腸、外性器、乳房および／または骨盤の検査を実施することができる。

30

【 0 5 3 9 】

治験薬の開始前に存在する著明な所見は、患者のe C R F上の関連する医療既往歴／現在の医学的状态スクリーンに組み入れなければならない。治験薬の開始後に見られる著明な所見であって、有害事象の規定を満たす所見は、患者のe C R Fの有害事象スクリーンに記録しなければならない。

【 0 5 4 0 】

バイタルサイン

- ・体温
- ・血圧（B P）
- ・脈拍

40

【 0 5 4 1 】

身長および体重

- ・身長
- ・体重
- ・体格指数（B M I）は、（体重（k g）／[身長（m）]²）と計算する

【 0 5 4 2 】

検査室査定

検査室検査の結果の臨床的関連性がある逸脱は、有害事象を規定する基準について査定し、基準を満たす場合、有害事象として報告する。査定の反復は、結果が正常化するまでまたは変化がもはや臨床的関連性がなくなるまで必須である。

50

【0543】

血液学

ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球カウント、分画による白血球カウントおよび血小板数を測定する。鉄指数をモニタリングする。

【0544】

臨床化学

ナトリウム、カリウム、クレアチニン、尿素、塩化物、アルブミン、カルシウム、アルカリホスファターゼ、総ビリルビン、LDH、GGT、ASTおよびALTをモニタリングする。総ビリルビン濃度が正常値上限の1.5倍を上回って上昇する場合、直接反応型ビリルビンと間接反応型ビリルビンとを差別化すべきである。

10

【0545】

心電図(ECG)

PR区間、QRS持続期間、心臓数、RR、QT、QTc。

臨床決定のためにフレデリカQT補正式(QTcF)を使用するものとする。

【0546】

妊娠および受胎能力の評価

報告された生殖/更年期状態に関わらず、全ての女性患者についての妊娠検査が要求される。本研究のために、血清妊娠検査を実施する。陽性の場合、患者は、試験を打ち切らなければならない。スクリーニングおよびベースラインにおいて実施する場合、本試験の結果は、患者に投与する前に受け渡さなければならない。

20

【0547】

薬物動態

PK試料を回収する。PKデータは、研究のパート1における用量調整査定の一部としての各コホート間の非公式の中間解析において再検討する。初期に設定した試料の回収回数がPKプロファイルを特徴付けるために不十分または不適切であると見なされる場合、試料の回収回数を後続のコホートにおいて改変することができる。採血回数および回収される総血液容量は、プロトコルにおいて言明されている採血回数および回収される総血液容量を超えないものとする。

【0548】

PK試料を回収し、全ての患者において全ての用量レベルで査定する。

30

【0549】

遊離抗ヒトBMP6 Abの濃度は、ELISAアッセイを使用して決定する。予期される定量下限(LLOQ)は、10 pg/mLである。

【0550】

非処置(プラセボ) 試料について解析しない。

【0551】

遊離抗ヒトBMP6 Ab濃度は、 $\mu\text{g/mL}$ 単位で表す。LLOQを下回る全ての濃度または逸失データは、濃度データ一覧においてそのようなものとして表示する。LLOQを下回る濃度は、濃度データについての概要統計でのみ、ゼロとして処理する。これらは、PKパラメータの計算で考慮に入れない。

40

【0552】

遊離抗ヒトBMP6 Abの決定後の残りのPK試料は、探索的評価または他のバイオアナリシスの目的(例えば、異なる施設間の照合、安定性評価)のために使用することができる。

【0553】

Phoenix WinNonlin(Version 6.2以上)によるノンコンパートメント方法を使用して、以下の薬物動態パラメータ: C_{max} 、 t_{max} 、 $AUC(0-t)$ 、 $AUC(0-t_{\text{last}})$ 、 C_{max}/D および AUC/D を血清濃度-時間データに基づいて決定する(決定可能な場合)。AUCの計算のために線形台形法を使用する。ヒトBMP6に結合する抗体または抗原結合性断片($t_{1/2}$)の終末半減期も、

50

データに基づいて推定可能な場合に推定する。

【 0 5 5 4 】

他の評価

免疫原性

E L I S A アッセイを使用して抗ヒト B M P 6 抗体を検出する。免疫原性解析後の残りの I G 試料は、探索的评价または他のバイオアナリシスの目的（例えば、異なる施設間の照合）のために使用することができる。

【 0 5 5 5 】

探索的評価

バイオマーカーは、正常な生物学的過程、病理学的過程または治療的介入に対する薬理学的応答について客観的に測定および査定された指標である（B i o m a r k e r s D e f i n i t i o n s W o r k i n g G r o u p 2 0 0 1 ）。

10

【 0 5 5 6 】

B M P 6 ヘプシジン経路は、以下の通りである。肝細胞内の B M P 6 シグナル伝達は、ヘプシジンの発現の誘導、腸細胞による鉄吸収の阻害およびマクロファージによる鉄移出に要求される。ヘプシジン降下療法としての B M P 6 中和抗体は、E P O の要求を軽減し、かつ目標 H g b レベルに達する患者の数を増大させることにより、鉄欠乏性貧血を伴う患者に利益をもたらすはずである。

【 0 5 5 7 】

上記で記載した生物学に基づく、探索的バイオマーカー評価は、ヘプシジン（L C - M S アッセイを使用して測定する）を含むが、これらに限定されない。

20

【 0 5 5 8 】

さらなる探索的評価により、骨吸収マーカーの潜在的な役割について探査し得、および作用機構に寄与する因子としての炎症にも取り組むことができる。

探索の目的は、以下の通りである：

- ・ヘプシジンレベルと、E R I および鉄指数などのいくつかの重要な尺度との関係について評価すること；
- ・主要評価項目および副次的評価項目と探索的バイオマーカーとの力動関係を縦断的に研究すること；
- ・薬理遺伝学について評価すること；
- ・免疫原性について評価すること。

30

【 0 5 5 9 】

試料は、多様な時点で回収する。

【 0 5 6 0 】

試料の回収、番号付け、処理および出荷についてのさらなる詳細は、中央検査室マニュアルに提示する。

【 0 5 6 1 】

D N A

探索的 D N A 調査研究を、（ 1 ）機能的鉄欠損性貧血を伴う、エリスロポエチンで処置された慢性血液透析患者に関連する場合もあり、（ 2 ）抗ヒト B M P 6 A b による処置に対する応答を予測する場合もあり、（ 3 ）副作用に対する遺伝的素因を予測する場合もある遺伝因子を同定することを目的とする本研究の一部として計画する。

40

【 0 5 6 2 】

加えて、ジェノタイピング技術の最近の進展により、ゲノムワイドの手法も可能となっている。ゲノムワイドの手法は、上記で記載した通り、これらの研究についての限定的な範囲内で企図することもできる。

【 0 5 6 3 】

可溶性バイオマーカー

ヘプシジンを血漿中で潜在的な P D / バイオマーカーとして定量化する。

【 0 5 6 4 】

50

アッセイについての詳細な記載は、バイオアナリシスデータの報告書に組入れる。

【0565】

他のバイオマーカー

仮説によらないプラットフォームを使用して、疾患の異質性、作用方式および/または層別化マーカーの潜在的な同定について理解することができるであろう。免疫原性(IG)試料は、多様な時点で回収する。抗ヒトBMP6 Abの免疫原性は、抗ヒトBMP6抗体を認識する抗体を測定することにより評価する。

【0566】

参考文献

- Fukuma S, Yamaguchi T, Hashimoto S et al (2012) Erythropoiesis-stimulating agent responsiveness and mortality in hemodialysis patients: results from a cohort study from the dialysis registry in Japan. *Am J Kidney Dis*; 59(1): p. 108-16. 10
- Kilpatrick RD, Critchlow CW, Fishbane S et al (2008) Greater epoetin alfa responsiveness is associated with improved survival in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*; 2008. 3(4): 1077-83. 20
- Lopez-Gomez JM, Portoles JM, and Aljama P (2008), Factors that condition the response to erythropoietin in patients on hemodialysis and their relation to mortality. *Kidney Int Suppl*; (111): S75-81.
- Meynard D, Kautz L, Darnaud V et al (2009) Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*; 41(4): 478-81.
- Saliem S, Patenaude V, Abenhaim HA (2015) Pregnancy outcomes among renal transplant recipients and patients with end-stage renal disease on dialysis. *J Perinat Med* (Epub ahead of print) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719292>. 30
- Suttorp MM, Hoekstra T, Rotmans JI et al (2013) Erythropoiesis-stimulating agent resistance and mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *BMC Nephrol*; 14(1): 200. 40
- Zaritsky J, Young B, Gales B, et al (2010) Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin J Am Soc Nephrol*; 5(6): 1010-14.

【0567】

実施例3: 0.01mg/kgの抗体7により処置された患者のTSATレベル

TSAT(鉄飽和度、%)レベルを含むデータを、実施例2に記載の臨床プロトコールに従って処置した最初の10人の患者について評価し、各患者は、0.01mg/kgの抗体7の単回注入を受けた。これらの患者のいずれも、観察されなかった無有害作用レベル(NoAEL)が0.1mg/kg/週であると定義した肝臓の安全性シグナルを示さ

なかった。コホート1は、500 ng/mL以下の低いフェリチンレベルを有する5人の貧血性血液透析患者を含み、コホート2は、より高いフェリチンレベル(500~1000 ng/mL)を含む5人の貧血性血液透析患者を含んでいた。

【0568】

0.01 mg/kgの抗体7を受けた5人のコホート1(低フェリチン)の患者では、投与後TSATレベルが平均9.8%上昇した(投与後平均38.6%対投与前24.8%)。対照的に、0.01 mg/kgの抗体7を受けた5人のコホート2(高フェリチン)患者では、投与後TSATレベルが平均17.6%上昇した(投与後平均48.4%対投与前30.8%)。データを図14に示す。図14は、2つのコホートにおける抗体7投与前対抗体7投与後72時間以内のピークTSATレベルを示す。驚くべきことに、コホート1の患者とは対照的に、コホート2の貧血患者は、ベースラインと比較して明らかなTSATの上昇を示す。これらのデータは、500 ng/mL以上のフェリチンレベルを有する患者が抗BMP6治療への応答について良好な候補であること、およびフェリチンレベル、例えば500 ng/mL以上のフェリチンレベルが応答の指標となり得ることを示している。

【0569】

別段に定義されない限り、本明細書で使用される技術的および科学的用語は、本開示が属する分野に精通している専門家によって通常理解される意味と同じ意味を有する。

【0570】

別段に示されない限り、具体的な詳細について記載されていない全ての方法、ステップ、技法および操作を実施することができ、当業者に明らかであるように、それ自体公知の方式で実施されている。例えば、ここでもまた本明細書で言及される標準的なハンドブックおよび一般的な背景技術ならびにその中で引用されているさらなる参考文献が参照される。別段に示されない限り、本明細書で引用される参考文献は、それぞれ参照により全体的に組込まれる。

【0571】

本発明に対する特許請求の範囲は、非限定的なものであり、下記に提示される。

【0572】

本明細書では、特定の態様および特許請求の範囲について詳細に開示してきたが、これは、例示のみを目的とする例としてなされたものであり、付属の特許請求の範囲または任意の対応する将来の適用についての特許請求の範囲の主題の範囲に関して限定することを意図するものではない。特に、本発明者らは、特許請求の範囲により規定される本開示の趣旨および範囲から逸脱しない限り、本開示に対する多様な代替形態、改変形態および変更形態がなされ得ることを企図する。核酸の出発材料、目的のクローンまたはライブラリーの種類の選択は、本明細書に記載される態様の知識を有する当業者にとって日常的な問題であると考えられる。他の態様、利点および変更形態も以下の特許請求の範囲内であると見なされる。当業者は、ルーチンの実験のみを使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な態様についての多くの均等物を認識または確認することが可能であろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることが意図される。後に提出される対応する出願における特許請求の範囲の再起草は、多様な国の特許法による制限のためである可能性があり、特許請求の範囲の主題の放棄として解釈されるべきではない。

本発明は次の実施態様を含む。

[1]

選択的に、

a. BMP6を阻害すること、

b. 血清鉄レベル、トランスフェリン飽和度(TSAT)、網状赤血球ヘモグロビン含量(CHr)、網状赤血球カウント、赤血球カウント、ヘモグロビンもしくはヘマトクリットを上昇させること、

c. ヘプシジンの活性またはレベルを低減すること、

d. 貧血を処置すること、または

10

20

30

40

50

e. ヘモグロビンレベルを上昇させるかもしくは維持すること
を、それを必要とする患者において行う方法であって、選択的に、2000 ng/mL 以下
のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づき、治療有効量の BMP
6 アンタゴニストを前記患者に投与するステップを含む方法。

[2]

貧血を有する患者を BMP 6 アンタゴニストで処置する方法であって、選択的に、20
00 ng/mL 以下のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づき、
治療有効量の BMP 6 アンタゴニストを前記患者に投与するステップを含む方法。

[3]

選択的に、貧血を有する患者を BMP 6 アンタゴニストで処置する方法であって、
a) 前記患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、選択的に、治療有効量の BMP 9 アンタゴニストを前記患者に投与するス
テップであって、前記フェリチンレベルは、2000 ng/mL 以下である、ステップと
を含む方法。

10

[4]

選択的に、貧血を有する患者を BMP 6 アンタゴニストで処置する方法であって、
a) 前記患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、2000 ng/mL 以下のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記生
物学的試料に基づき、前記 BMP 6 アンタゴニストによる処置のために前記患者を選択す
るステップと、

20

c) その後、治療有効量の BMP 9 アンタゴニストを前記患者に投与するステップと
を含む方法。

[5]

選択的に、
a. BMP 6 を阻害すること、
b. 血清鉄レベル、トランスフェリン飽和度 (TAS T)、網状赤血球ヘモグロビン含量
(CHr)、網状赤血球カウント、赤血球カウント、ヘモグロビンもしくはヘマトクリッ
トを上昇させること、

c. ヘプシジンの活性またはレベルを低減すること、

d. 貧血を処置すること、または

30

e. ヘモグロビンレベルを上昇させるかもしくは維持すること
を、それを必要とする患者において行う方法であって、選択的に、500 ng/mL 以上
のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づき、治療有効量の BMP
6 アンタゴニストを前記患者に投与するステップを含む方法。

[6]

貧血を有する患者を BMP 6 アンタゴニストで処置する方法であって、選択的に、50
0 ng/mL 以上のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づき、治
療有効量の BMP 6 アンタゴニストを前記患者に投与するステップを含む方法。

[7]

選択的に、貧血を有する患者を BMP 6 アンタゴニストで処置する方法であって、
a) 前記患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、選択的に、治療有効量の BMP 9 アンタゴニストを前記患者に投与するス
テップであって、前記フェリチンレベルは、500 ng/mL 以上である、ステップと
を含む方法。

40

[8]

選択的に、貧血を有する患者を BMP 6 アンタゴニストで処置する方法であって、
a) 前記患者からの生物学的試料をフェリチンレベルについてアッセイするステップと、
b) その後、500 ng/mL 以上のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記生
物学的試料に基づき、前記 BMP 6 アンタゴニストによる処置のために前記患者を選択す
るステップと、

50

c) その後、治療有効量の B M P 9 アンタゴニストを前記患者に投与するステップとを含む方法。

[9]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、2 0 0 0 n g / m L 以下のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づいて前記患者に投与されることを特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

[1 0]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、5 0 0 n g / m L 以上のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づいて前記患者に投与されることを特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

10

[1 1]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、
a) 前記患者は、2 0 0 0 n g / m L 以下のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づき、前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置のために選択されることと、
b) その後、治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、前記患者に投与されることを特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

[1 2]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、
a) 前記患者は、5 0 0 n g / m L 以上のフェリチンレベルを有する前記患者からの生物学的試料に基づき、前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置のために選択されることと、
b) その後、治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、前記患者に投与されることを特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

20

[1 3]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、
a) 前記患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、
b) 治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、2 0 0 0 n g / m L 以下のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記生物学的試料に基づき、選択的に前記患者に投与されることと
を特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

30

[1 4]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、
a) 前記患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、
b) 治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、5 0 0 n g / m L 以上のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記生物学的試料に基づき、選択的に前記患者に投与されることと
を特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

[1 5]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、
a) 前記患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、
b) 前記患者は、2 0 0 0 n g / m L 以下のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記生物学的試料に基づき、前記 B M P 6 アンタゴニストによる処置のために選択されることと、
c) 治療有効量の前記 B M P 6 アンタゴニストは、選択的に前記患者に投与されることを特徴とする、B M P 6 アンタゴニスト。

40

[1 6]

貧血を有する患者の処置における使用のための B M P 6 アンタゴニストにおいて、
a) 前記患者からの生物学的試料は、フェリチンについてアッセイされることと、
b) 前記患者は、5 0 0 n g / m L 以上のフェリチンレベルを有する前記患者からの前記

50

生物学的試料に基づき、前記BMP6アンタゴニストによる処置のために選択されることが、

c) 治療有効量の前記BMP6アンタゴニストは、選択的に前記患者に投与されることを特徴とする、BMP6アンタゴニスト。

[1 7]

貧血を有する患者がBMP6アンタゴニストによる処置に应答する可能性を予測する方法であって、前記患者からの生物学的試料をフェリチンについてアッセイするステップを含み、2000 ng / mL以下のフェリチンレベルは、前記患者が前記BMP6アンタゴニストによる処置に应答する上昇した可能性を示す、方法。

[1 8]

貧血を有する患者がBMP6アンタゴニストによる処置に应答する可能性を予測する方法であって、前記患者からの生物学的試料をフェリチンについてアッセイするステップを含み、500 ng / mL以上のフェリチンレベルは、前記患者が前記BMP6アンタゴニストによる処置に应答する上昇した可能性を示す、方法。

[1 9]

前記患者から前記生物学的試料を得るステップをさらに含み、前記得るステップは、前記アッセイするステップの前に実施される、上記[1 7]または[1 8]に記載の方法。

[2 0]

前記フェリチンレベルは、フェリチンタンパク質レベルである、上記[1] ~ [1 9]のいずれかに記載の方法または使用。

[2 1]

前記アッセイするステップは、イムノアッセイ、免疫組織化学、ELISA、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、HPLCおよび質量分析からなる群から選択される技法を含む、上記[3]、[4]、[7]、[8]または[1 3] ~ [1 9]のいずれかに記載の方法。

[2 2]

BMP6アンタゴニストによる処置に対する、貧血を有する患者の应答性を予測するための伝達可能な形態の情報を生成する方法であって、

a) 前記患者からの生物学的試料における2000 ng / mL以下のフェリチンレベルの存在に基づき、前記患者が前記BMP6アンタゴニストによる処置に应答する上昇した可能性を決定するステップと、

b) 前記決定するステップの結果を、伝達に使用するための有形または無形の媒体形態に記録するステップとを含む方法。

[2 3]

BMP6アンタゴニストによる処置に対する、貧血を有する患者の应答性を予測するための伝達可能な形態の情報を生成する方法であって、

a) 前記患者からの生物学的試料における500 ng / mL以上のフェリチンレベルの存在に基づき、前記患者が前記BMP6アンタゴニストによる処置に应答する上昇した可能性を決定するステップと、

b) 前記決定するステップの結果を、伝達に使用するための有形または無形の媒体形態に記録するステップとを含む方法。

[2 4]

前記貧血は、慢性疾患に関連する貧血である、上記[1] ~ [2 3]のいずれかに記載の方法または使用。

[2 5]

前記慢性疾患は、慢性腎臓病、癌または炎症である、上記[2 4]に記載の方法または使用。

[2 6]

10

20

30

40

50

前記患者は、赤血球生成刺激剤（ＥＳＡ）で処置されるかまたは処置されている、上記〔１〕～〔２５〕のいずれかに記載の方法または使用。

〔２７〕

前記ＥＳＡは、エリスロポエチン（ＥＰＯ）である、上記〔２６〕に記載の方法または使用。

〔２８〕

前記貧血は、ＥＰＯ低応答性貧血である、上記〔１〕～〔２７〕のいずれかに記載の方法または使用。

〔２９〕

前記貧血は、鉄欠乏性貧血、例えば機能的鉄欠乏性貧血である、上記〔１〕～〔２８〕のいずれかに記載の方法または使用。

10

〔３０〕

前記患者は、慢性血液透析患者である、上記〔１〕～〔２９〕のいずれかに記載の方法または使用。

〔３１〕

前記治療有効量の前記ＢＭＰ６アンタゴニストによる処置の非存在下におけるＥＰＯ要求用量および／または鉄要求用量と比べて、前記患者の鉄要求用量を低減するか、前記患者のＥＰＯ要求用量を低減するか、または前記患者の鉄要求用量および前記患者のＥＰＯ要求用量の両方を低減するステップをさらに含む、上記〔１〕～〔３０〕のいずれかに記載の方法または使用。

20

〔３２〕

前記生物学的試料は、滑液、血液、血清、糞便、血漿、尿、涙液、唾液、脳脊髄液、白血球試料または組織試料である、上記〔１〕～〔３１〕のいずれかに記載の方法または使用。

〔３３〕

前記生物学的試料は、血清または血液である、上記〔３２〕に記載の方法または使用。

〔３４〕

前記生物学的試料は、血清である、上記〔３３〕に記載の方法または使用。

〔３５〕

前記ＢＭＰ６アンタゴニストは、ＢＭＰ６結合性分子である、上記〔１〕～〔３４〕のいずれかに記載の方法または使用。

30

〔３６〕

前記ＢＭＰ６アンタゴニストは、抗ＢＭＰ６抗体またはその抗原結合性断片である、上記〔３５〕に記載の方法または使用。

〔３７〕

前記抗ＢＭＰ６抗体またはその抗原結合性断片は、表１または表１４に記載される抗体の抗ＢＭＰ６抗体またはその抗原結合性断片である、上記〔３６〕に記載の方法または使用。

〔３８〕

前記抗ＢＭＰ６抗体またはその抗原結合性断片は、

40

（ａ）それぞれ配列番号６９、７０および７１のＨＣＤＲ１配列、ＨＣＤＲ２配列およびＨＣＤＲ３配列、ならびにそれぞれ配列番号７９、８０および８１のＬＣＤＲ１配列、ＬＣＤＲ２配列およびＬＣＤＲ３配列、

（ｂ）それぞれ配列番号７２、７３および７４のＨＣＤＲ１配列、ＨＣＤＲ２配列およびＨＣＤＲ３配列、ならびにそれぞれ配列番号８２、８３および８４のＬＣＤＲ１配列、ＬＣＤＲ２配列およびＬＣＤＲ３配列、

（ｃ）それぞれ配列番号２９、３０および３１のＨＣＤＲ１配列、ＨＣＤＲ２配列およびＨＣＤＲ３配列、ならびにそれぞれ配列番号３９、４０および４１のＬＣＤＲ１配列、ＬＣＤＲ２配列およびＬＣＤＲ３配列、

（ｄ）それぞれ配列番号３２、３３および３４のＨＣＤＲ１配列、ＨＣＤＲ２配列および

50

H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 4 2、4 3 および 4 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(e) それぞれ配列番号 4 9、5 0 および 5 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 5 9、6 0 および 6 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(f) それぞれ配列番号 5 2、5 3 および 5 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 6 2、6 3 および 6 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、

(g) それぞれ配列番号 9、1 0 および 1 1 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 9、2 0 および 2 1 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列、または

(h) それぞれ配列番号 1 2、1 3 および 1 4 の H C D R 1 配列、H C D R 2 配列および H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 2 2、2 3 および 2 4 の L C D R 1 配列、L C D R 2 配列および L C D R 3 配列

を含む、上記 [3 6] または [3 7] に記載の方法または使用。

[3 9]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 7 5 の V H 配列、

(b) 配列番号 3 5 の V H 配列、

(c) 配列番号 5 5 の V H 配列、または

(d) 配列番号 1 5 の V H 配列

を含む、上記 [3 6] ~ [3 8] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 0]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 8 5 の V L 配列、

(b) 配列番号 4 5 の V L 配列、

(c) 配列番号 6 5 の V L 配列、または

(d) 配列番号 2 5 の V L 配列

を含む、上記 [3 6] ~ [3 9] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 1]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 7 5 の V H 配列および配列番号 8 5 の V L 配列、

(b) 配列番号 3 5 の V H 配列および配列番号 4 5 の V L 配列、

(c) 配列番号 5 5 の V H 配列および配列番号 6 5 の V L 配列、または

(d) 配列番号 1 5 の V H 配列および配列番号 2 5 の V L 配列

を含む、上記 [3 6] ~ [4 0] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 2]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 7 7 の重鎖配列、

(b) 配列番号 3 7 の重鎖配列、

(c) 配列番号 5 7 の重鎖配列、または

(d) 配列番号 1 7 の重鎖配列

を含む、上記 [3 6] ~ [4 1] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 3]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 8 7 の軽鎖配列、

(b) 配列番号 4 7 の軽鎖配列、

(c) 配列番号 6 7 の軽鎖配列、または

(d) 配列番号 2 7 の軽鎖配列

を含む、上記 [3 6] ~ [4 2] のいずれかに記載の方法または使用。

10

20

30

40

50

[4 4]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- (a) 配列番号 7 7 の重鎖配列および配列番号 8 7 の軽鎖配列、
 - (b) 配列番号 3 7 の重鎖配列および配列番号 4 7 の軽鎖配列、
 - (c) 配列番号 5 7 の重鎖配列および配列番号 6 7 の軽鎖配列、または
 - (d) 配列番号 1 7 の重鎖配列および配列番号 2 7 の軽鎖配列
- を含む、上記 [3 6] ~ [4 3] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 5]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- a) 1 n M 以下の K D でヒト B M P 6 に結合するか、または
- b) 0 . 1 n M 以下の K D でヒト B M P 6 に結合する、上記 [3 6] ~ [4 4] のいずれかに記載の方法または使用。

10

[4 6]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、

- a) ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 7 の少なくとも約 1 0 0 倍のアフィニティを有し、
- b) ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 2、ヒト B M P 5 またはヒト B M P 7 の少なくとも約 1 0 0 倍のアフィニティを有し、
- c) ヒト B M P 6 に対して、ヒト B M P 2、ヒト B M P 5 またはヒト B M P 7 の少なくとも約 5 0 0 倍のアフィニティを有し、および / または
- d) E L I S A においてヒト B M P 2 および / または B M P 7 に対する検出可能な結合を有しない、上記 [3 6] ~ [4 5] のいずれかに記載の方法または使用。

20

[4 7]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、I g M および I g G から選択されるスクヤフォールドを含む、上記 [3 6] ~ [4 6] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 8]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、I g G 1、I g G 2 および I g G 3 または I g G 4 から選択される I g G である、上記 [3 6] ~ [4 7] のいずれかに記載の方法または使用。

[4 9]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F a b および s c F v からなる群から選択される、上記 [3 6] ~ [4 8] のいずれかに記載の方法または使用。

30

[5 0]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、免疫コンジュゲートの成分である、上記 [3 6] ~ [4 9] のいずれかに記載の方法または使用。

[5 1]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、F c 領域の突然変異を通して、改変されたエフェクター機能を有する、上記 [3 6] ~ [5 0] のいずれかに記載の方法または使用。

40

[5 2]

前記抗 B M P 6 抗体またはその抗原結合性断片は、配列 Q T L V H L M N P E Y V P K P (配列番号 9 8) を含む、例えばそれからなるヒト B M P 6 エピトープに結合する、上記 [3 6] ~ [5 1] のいずれかに記載の方法または使用。

[5 3]

前記抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 0 0 1 m g / k g ~ 0 . 1 m g / k g の範囲の用量で投与される、上記 [3 6] ~ [5 2] のいずれかに記載の方法または使用。

[5 4]

前記抗体またはその抗原結合性断片は、0 . 0 0 6 3 ~ 0 . 1 m g / k g の範囲の用量で投与される、上記 [5 3] に記載の方法または使用。

50

[5 5]

前記抗体またはその抗原結合性断片は、 0.001 mg/kg 、 0.0016 mg/kg 、 0.0025 mg/kg 、 0.0040 mg/kg 、 0.0063 mg/kg 、 0.01 mg/kg 、 0.016 mg/kg 、 0.025 mg/kg 、 0.040 mg/kg 、 0.063 mg/kg または 0.1 mg/kg の用量で投与される、上記[3 6] ~ [5 3]のいずれかに記載の方法または使用。

[5 6]

前記抗体またはその抗原結合性断片は、前記患者に2回以上投与される、上記[3 6] ~ [5 5]のいずれかに記載の方法または使用。

[5 7]

前記抗体またはその抗原結合性断片は、

a) 静脈内、または

b) 皮下

に投与される、上記[3 6] ~ [5 6]のいずれかに記載の方法または使用。

[5 8]

前記投与は、約30 ~ 約60分間の期間にわたる注入によるものである、上記[5 7]に記載の方法または使用。

[5 9]

前記フェリチンレベルは、 1900 ng/mL 以下、 1800 ng/mL 以下、 1700 ng/mL 以下、 1600 ng/mL 以下、 1500 ng/mL 以下、 1400 ng/mL 以下、 1300 ng/mL 以下、 1200 ng/mL 以下、 1100 ng/mL 以下または 1000 ng/mL 以下である、上記[1] ~ [5 8]のいずれかに記載の方法または使用。

[6 0]

前記フェリチンレベルは、 1500 ng/mL 以下である、上記[1] ~ [5 9]のいずれかに記載の方法または使用。

[6 1]

前記フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上、 600 ng/mL 以上、 700 ng/mL 以上、 800 ng/mL 以上、 900 ng/mL 以上、 1000 ng/mL 以上、 1100 ng/mL 以上、 1200 ng/mL 以上、 1300 ng/mL 以上、 1400 ng/mL 以上、 1500 ng/mL 以上、 1600 ng/mL 以上、 1700 ng/mL 以上、 1800 ng/mL 以上または 1900 ng/mL 以上である、上記[1] ~ [6 0]のいずれかに記載の方法または使用。

[6 2]

前記フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上、 600 ng/mL 以上、 700 ng/mL 以上、 800 ng/mL 以上、 900 ng/mL 以上、 1000 ng/mL 以上、 1100 ng/mL 以上、 1200 ng/mL 以上、 1300 ng/mL 以上または 1400 ng/mL 以上である、上記[1] ~ [6 0]のいずれかに記載の方法または使用。

[6 3]

前記フェリチンレベルは、 500 ng/mL 以上である、上記[1] ~ [4]、[9]、[11]、[13]、[15]、[17]、[22]または[23] ~ [6 2]のいずれかに記載の方法または使用。

10

20

30

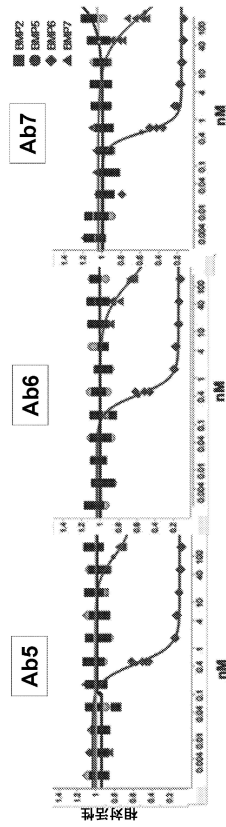
40

50

【図面】

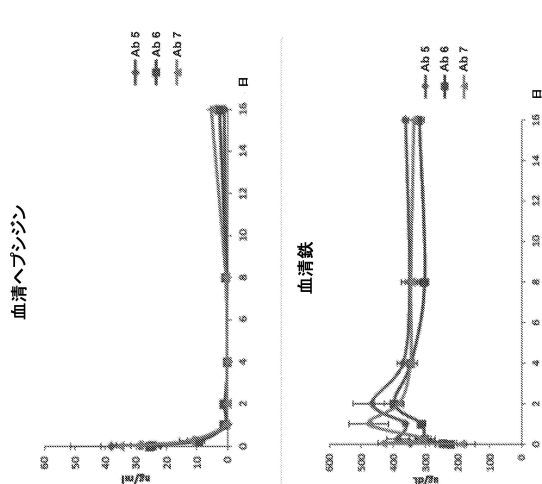
【図 1 - 1】

図1A



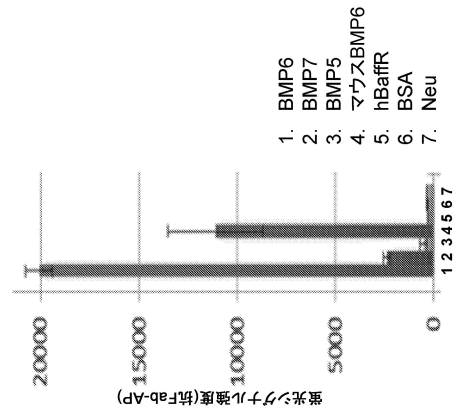
【図 2】

図 2



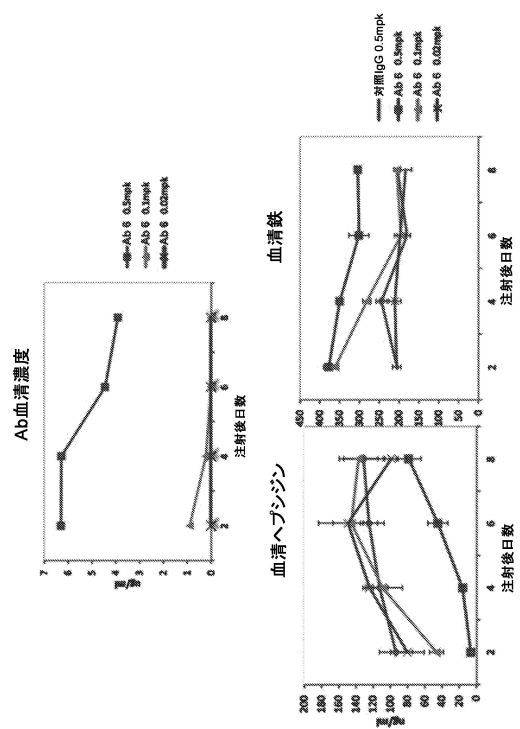
【図 1 - 2】

図1B



【図 3】

図 3



10

20

30

40

50

【図 8】

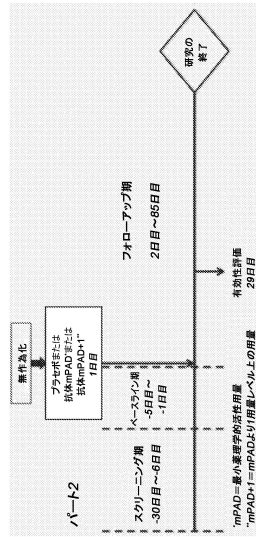


図 8

【図 9】

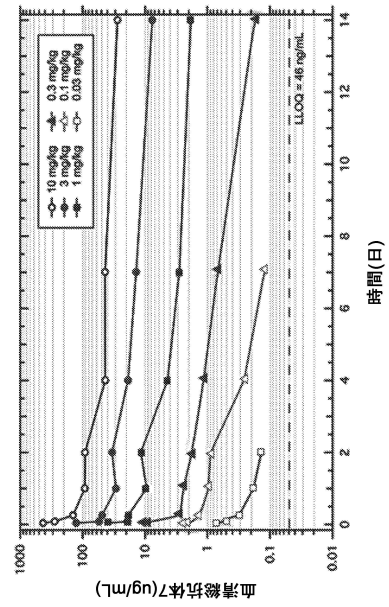


図 9

【図 10】

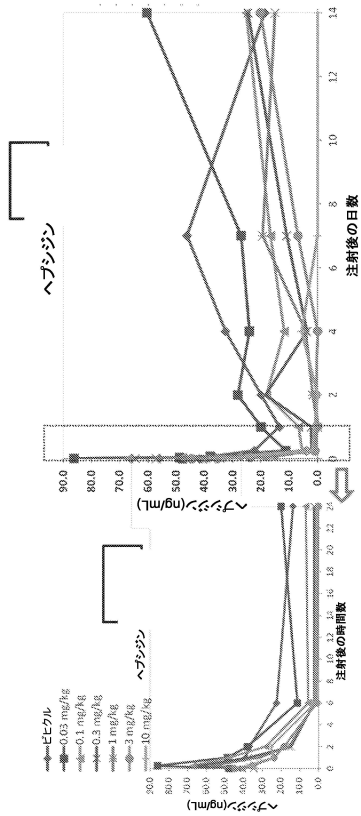


図10

【図 11】

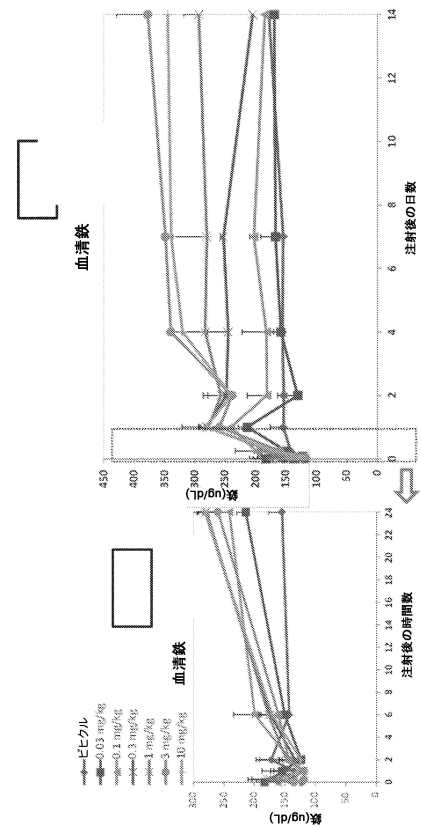
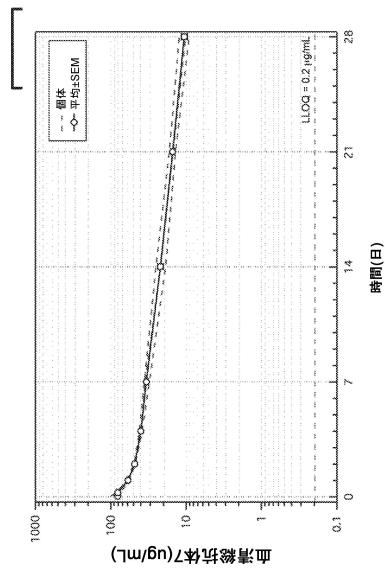


図11

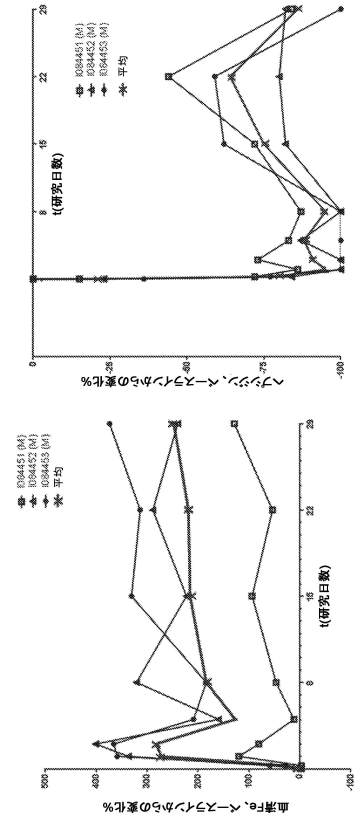
【 図 1 2 】

図12



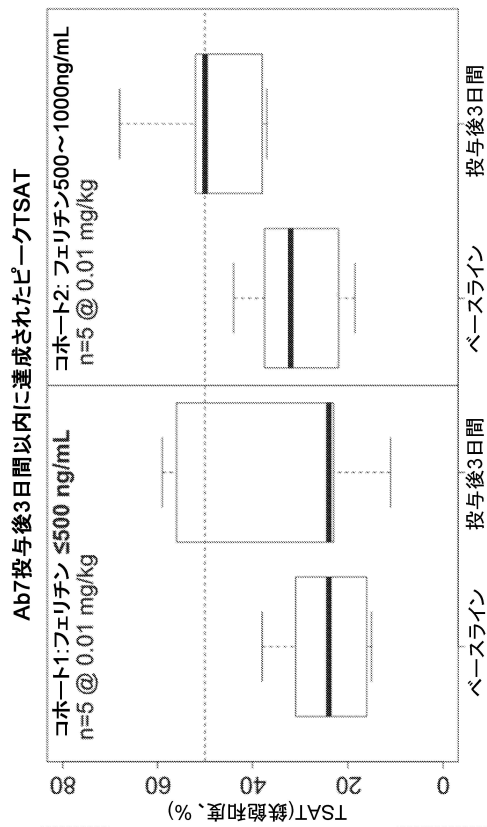
【 図 1 3 】

図13



【 図 1 4 】

図14



10

20

30

40

50

【配列表】

0007231411000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/22 (2006.01)

C 0 7 K 16/22

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニュー
2 5 0 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコーポレ
イテッド

(72)発明者

ディートリッヒ , ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニュー
2 5 0 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコーポレ
イテッド

(72)発明者

ジョルジュ , ナタリー

スイス国 バーゼル 4 0 0 2 , ポストファッハ , ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者

リウ , ドン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニュー
2 5 0 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコーポレ
イテッド

(72)発明者

シャクター , アシャー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニュー
2 5 0 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコーポレ
イテッド

(72)発明者

ソニ , アディティ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニュー
2 5 0 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコーポレ
イテッド

(72)発明者

ジョウ , ジン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニュー
2 5 0 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ , インコーポレ
イテッド

審査官 池上 文緒

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 0 1 2 7 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 8 0 7 9 (W O , A 1)

Blood Purif. (2012) vol.34, p.19-27

COYNE D W , JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY , 米国 , 2007年 ,
VOL:18, NR:3 , PAGE(S):975 - 984

CHIA CHI SUN , AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY , 米国 , 2012年01月31日 , VOL:
87, NR:4 , PAGE(S):392 - 400

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 7 / 0 6

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 6 8

C 0 7 K 1 6 / 2 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

U n i P r o t / G e n e S e q