

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520005

(P2004-520005A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

4 B O 2 4

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 45/00

4 B O 6 3

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 19/08

4 B O 6 4

A 6 1 P 19/08

C O 7 K 14/51

4 B O 6 5

C O 7 K 14/51

C O 7 K 16/18

4 C O 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-504639 (P2002-504639)

(86) (22) 出願日 平成13年6月15日 (2001.6.15)

(85) 翻訳文提出日 平成14年12月19日 (2002.12.19)

(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/006795

(87) 国際公開番号 W02001/098491

(87) 国際公開日 平成13年12月27日 (2001.12.27)

(31) 優先権主張番号 00112867.7

(32) 優先日 平成12年6月19日 (2000.6.19)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013

エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー

F. HOFFMANN-LA ROCH

E AKTIENGESELLSCHAFT

T

スイス・シーエイチ-4070バーゼル・

グレンツアーヘルストラッセ124

(71) 出願人 303069195

ユニフェルジテレー インステリング ア

ントウェルベン

ベルギー国 ウィルリジーク ユニフェル

ジテイツブレイン 1

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オステオレピン遺伝子多型性

(57) 【要約】

本発明は一般にファン・ブッヘムー骨硬化症疾病領域における遺伝子多型性に関する。特に、本発明はヒトにおいて正味の過剰な骨形成または不十分な骨形成のいずれかに至る疾病に関連する、ファン・ブッヘム骨硬化症疾病領域における遺伝子多型性に関する。さらに、ヒトオステオレピンをコードする単離された核酸分子が提供される。オステオレピンポリペプチド、ならびにベクター、宿主細胞およびそれらを生産するための組換え方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者から得たオステオレビン核酸配列中の多型性の存在を決定する段階を含む、被験者におけるオステオレビン多型性をスクリーニングする方法。

【請求項 2】

多型性が異常な骨形成に関連している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

被験者から得たオステオレビン核酸配列中の異常な骨形成に関連する多型性の存在を決定する段階を含む、被験者において遺伝的に関連した形態の異常な骨形成の存在をスクリーニングする方法。

10

【請求項 4】

多型性が挿入、欠失、置換、または反復性ヌクレオチド配列として特徴づけられる、請求項 1 または 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

多型性がオステオレビン蛋白質の発現または機能に影響を与える、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

オステオレビン核酸配列中の多型性の存在が、制限酵素断片長多型解析、質量分光分析を用いた PCR 産物の直接の質量解析、侵襲的開裂 (invasive cleavage) 産物の直接の解析、直接の配列解析、ARMS (登録商標) (増幅抵抗性変異システム)、ALEX (登録商標) (増幅抵抗性変異システムリニア伸長) および COPS (競合オリゴヌクレオチドプライミングシステム) のような伸長に基づく技術、OLA (オリゴヌクレオチド連結アッセイ法)、Invader アッセイ法、DNA チップ解析、またはポリメラーゼ連鎖反応解析のような鑑別核酸解析技術を含むアッセイ法によって決定される、請求項 1 または 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

PCR 産物が、OSTV3UT-F、OSTVint-F1、OSTVint-F3、OSTVint-F4、OSTVint-F5、OSTVex1-F、OSTV5UT-F、OSTV3gen-F1、OSTV3gen-F2、OSTV5UT-F、OSTVprom-F1、および OSTVprom-F2 からなる群より選択されるフォワードプライマー、ならびに OSTV3UT-R、OSTVint-R1、OSTVint-R3、OSTVint-R4、OSTVint-R5、OSTVex1-R、OSTV5UT-R、OSTV3gen-R1、OSTV3gen-R2、OSTV5UT-R、OSTVprom-R1、および OSTVprom-R2 からなる群より選択されるリバースプライマーを用いて増幅される、請求項 4 記載の方法。

30

【請求項 8】

患者から得られたオステオレビン核酸配列の遺伝子多型性パターンを決定する段階、および患者の遺伝子多型性パターンと野生型オステオレビン配列とを比較する段階を含む、異常な骨形成を伴う病態に対する患者の感受性を同定する方法であって、患者の遺伝子多型性パターンと野生型配列との差異が病態に対する感受性を示す方法。

40

【請求項 9】

被験者から単離されたオステオレビン配列を、既知の野生型オステオレビン配列と比較して、異常な骨形成に関連した被験者から単離されたオステオレビン配列に反復している多型性を同定する段階を含む、1 人または複数の被験者において異常な骨形成を伴う多型性を同定する方法。

【請求項 10】

核酸分子が、

- a) 配列番号：1 に示される核酸分子または該核酸分子の相補鎖、
- b) 配列番号：2 に示されるポリペプチドをコードする核酸分子または該核酸分子の相補鎖、

50

c) 上記 a) または b) の核酸分子にハイブリダイズすることのできる核酸分子からなる群より選択される、オステオレビンをコードする核酸分子。

【請求項 11】

G から A 6 1 3 6 位

C から T 6 1 4 0 位

T から A 9 0 4 7 位

C から T 1 0 8 7 7 位

A から G 1 0 8 7 6 位

T から C 1 0 8 1 7 位

C から A 1 0 6 8 7 位

T C C 1 0 6 6 8 位と 1 0 6 6 9 位との間

C から G 1 0 4 2 4 位

C から G 1 0 3 4 2 位

A から G 1 0 0 2 0 位

T から C 9 7 8 3 位

C から T 9 7 2 3 位

C から T 9 6 4 6 位

G から A 9 6 1 6 位

C から T 9 2 4 2 位

A から G 8 3 7 5 位

C から T 7 8 9 4 位

G から T 7 4 8 9 位

T から G 6 3 5 8 位

C から T 5 3 0 8 位

G から A 5 0 0 4 位

C から T 4 8 6 6 位

G から C 4 4 7 5 位

およびその組み合わせならびにその逆方向の相補鎖

からなる群より選択される核酸の置換または挿入を一つまたは複数含む、EMBL アクセッション番号 AC003098、リリース 62.0 のヌクレオチド位置 4, 000 ~ 11, 000 によって定義される核酸またはその一部を含む、オステオレビン領域多型性をコードする核酸分子。 30

【請求項 12】

請求項 10 または 11 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 13】

転写調節配列に機能的に連結された請求項 10 または 11 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 10 または 11 に記載の核酸分子にコードされる組換えオステオレビンポリペプチド。

【請求項 16】

骨硬化症、ファン・ブッヘム病、ページェット病などの異常な骨形成を伴う疾病の治療に使用される、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 17】

骨硬化症、ファン・ブッヘム病、ページェット病などの異常な骨形成を伴う疾病を治療するための医薬品の製造を目的とする、請求項 15 に記載の化合物の使用。

【請求項 18】

薬学的に許容される担体および薬学的に有効な量の請求項 15 に記載のポリペプチドを含む 50

薬学的組成物。

【請求項 19】

以下の段階を含む、請求項 15 記載の組換えオステオレビンポリペプチドの調製方法：

- a) 請求項 14 記載の細胞を適当な培地中で培養してオステオレビンポリペプチドを生産する段階；および
- b) オステオレビンポリペプチドを単離する段階。

【請求項 20】

以下の段階を含む、オステオレビン活性またはオステオレビンに誘導される活性の調節因子のスクリーニング方法：

- a) 特定の種類の細胞中でオステオレビンによって調節される、レポーター遺伝子または細胞内カルシウムのような下流のシグナル伝達分子の発現レベルを決定する段階； 10
- b) 候補薬剤を細胞に接触させる段階；
- c) 候補薬剤に応答したレポーター遺伝子または下流のシグナル伝達分子の発現レベルを決定する段階；および
- d) レポーターまたは下流のシグナル伝達分子の最初の発現レベルを、候補化合物に応答して観察される発現レベルと比較する段階であって、変化があれば候補薬剤がオステオレビン活性を調節することを示す段階。

【請求項 21】

請求項 15 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 22】

モノクローナル抗体である、請求項 21 記載の抗体。 20

【請求項 23】

検出可能な標識で標識された、請求項 21 から 22 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 24】

オステオレビン領域中の核酸配列の特徴決定に使用するための少なくとも一つの試薬、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法にしたがった手順を示す説明書、およびキットの内容物を入れる容器を含む、オステオレビン領域中の多型性を同定するためのキット。

【請求項 25】

オステオレビン領域中の核酸配列の特徴決定に使用するための試薬が、オステオレビン領域に特異的にハイブリダイズすることのできるポリヌクレオチドを含む、請求項 24 記載のキット。 30

【請求項 26】

請求項 20 記載の方法で同定される、オステオレビン活性またはオステオレビンに誘導される活性の調節因子。

【請求項 27】

請求項 26 記載の調節因子および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は一般にファン・ブッヘムー骨硬化症疾病領域における遺伝子多型性に関する。特に、本発明はヒトにおいて正味の過剰な骨形成または不十分な骨形成のいずれかに至る疾病に関連する、ファン・ブッヘム骨硬化症疾病領域における遺伝子多型性に関する。 40

【0002】

2000 を超えるヒトの病的症候群が、挿入、欠失、重複、およびヌクレオチド置換を含む DNA 多型性から生じることが知られている。個体の遺伝子多型性を探り、家族におけるその変異を追跡することにより、臨床的診断を確認し、保因者ならびに前臨床および無症状の罹患した個体における素因と病態の両方を診断する手段が提供される。正確な診断に基づくカウンセリングによって、患者は罹患個体における育児の可能性、進行中の妊娠、および早期介入について情報に基づいた決定ができる。

【0003】

病的症候群に伴う多型性は、非常に変化に富んでおり、したがって同定が困難となりうる 50

。遺伝子中に複数のアレルがあることが一般的なので、中立的な（疾病に関連しない）多型性から、疾病に関連するアレルを識別する必要がある。大部分のアレルは、識別不能な通常は活性な遺伝子産物を生産したり、目の色のように通常変動する特徴を発現する中立的な多型性である。反対に、鎌形赤血球貧血のような臨床的疾患に伴う多型性アレルも存在する。さらに、疾病に関連する多型性の構造は非常に変化に富んでおり、鎌形赤血球貧血のように単一の点変異から生じたり、脆弱X症候群やハンチントン舞踏病のように広範囲のヌクレオチドの反復から生じたりする。さらに、多型性アレルは、薬物治療に対する特定の応答として発現する表現型を伴う場合もある。

【0004】

関心のある多型性または領域が同定されたら、疾病または疾病素因を診断するために様々な技術が使用できる。従来、そのような症候群の診断は、酵素活性試験、統計解析、または侵襲的診断手技によっていた。最近、制限酵素断片長多型（RFLP）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、およびモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に基づく測定法を含むDNAおよび関連技術の進歩によって、迅速かつ非常に正確に、遺伝病に伴う多型性の存在をスクリーニングする方法が提供されるようになった。

【0005】

遺伝子の変異は、ファン・ブッヘム病のような骨形成疾患を伴う疾病を含め、いくつかの遺伝障害に関与している可能性がある。ファン・ブッヘム病（汎発性皮質過骨症；OMIM 239100）および骨硬化症（OMIM 269500）は、骨内膜の過骨症の群に属する2つの常染色体劣性疾患であり、共に頭蓋（頭蓋冠および頭蓋底）および下顎骨に最も顕著な全身性過骨症という特徴を持つ。さらに肋骨、鎖骨、および長骨の骨幹も硬化している。臨床的合併症には、顔面神経麻痺、感覚神経性聴力損失、および時には視覚障害が含まれる。ファン・ブッヘム病と骨硬化症の鑑別診断は、主に骨硬化症における合指症および巨人症の存在に基づく。また、骨硬化症ではほとんどの場合、重症の表現型を持つ。オランダの家族におけるファン・ブッヘム病遺伝子、およびブラジルおよびアメリカの家族における骨硬化症遺伝子の遺伝的位置推定によって、いずれの遺伝子も染色体17q12～q21の同じ領域に割り付けられた。同一の連鎖区間に両方の疾病が局在しているということは、ファン・ブッヘム病と骨硬化症が同一遺伝子の変異によって起きるという仮説を支持する。

【0006】

骨粗鬆症および／または硬化症のような正味の過剰または不十分な骨形成にいたる遺伝的疾患に関連する特定の多型性を同定および解析することは、情報を与える診断方法のデザインに必要である。ヒトゲノム中で疾病に関連する多型性を含む特定の領域を同定することによって、症候群の有病率および浸透度の統計解析が可能になる。さらに、常染色体劣性、常染色体優性、およびX連鎖遺伝病の評価に異なる統計式が使用されるので、多型性の染色体上の位置の同定は家系図に関連するリスク解析の評価に重要な要素となる。そのような情報があると、1) 各遺伝子座における異なるアレルの数、2) 母集団における各アレルの相対頻度（最も情報を与えるものは複数の共通アレルを持つ）、および 3) 母集団中でアレルが無作為に分布しているかどうか、を考慮した正確なリスク評価が可能になる。特定の多型性または多型性領域の有無を評価する技術が開発されるにつれ、診断方法の主な限界は異なる疾患に伴う多型性情報の欠如ということになる。

【0007】

当技術分野で必要なのは、ヒトゲノム中で疾病に伴う多型性を含む領域の同定である。そのような領域の同定ができれば、そのような症候群の発生に伴う感受性因子の診断試験や有用な測定法のデザインが可能になる。疾病に伴う多型性を検出する有用な測定法を用いると、罹患患者の正確な診断が可能になり、それらの患者および医療従事者が、情報に基づいた意思決定をするために必要な知識を提供できる。

【0008】

本発明は異常な骨形成に関連する領域であるヒト17番染色体のファン・ブッヘム－骨硬化症領域中の、オステオレビン遺伝子（SOST遺伝子とも呼ばれる）における多型性の

同定に関する。この領域の多型性は、異なる民族起源の多様な集団の多数のDNAサンプルの配列決定によって同定された。本発明は、本明細書で開示される多型性領域を骨粗鬆症または骨硬化症の診断および評価に使用することにも関する。このような疾病が、より早期に（明らかな症状の発現前に）、より確実に検出できるので、疾病関連多型性を持つと同定された個体には、より良い治療オプションが利用できる。

【0009】

一つの態様において、本発明はオステオレビン領域の多型性をコードする単離核酸分子を提供する。単離核酸分子には、上記の同定された配列を持つか、またはこれらの核酸配列に相補的で、選択的にそれらにハイブリダイズし、少なくとも中等度の条件下、および選択的には高ストリンジェンシー条件下で安定的に結合を保持する配列を持つ、オステオレビン領域多型性が含まれる。 10

【0010】

別の態様において、本発明は多型性のオステオレビン領域配列がベクターに挿入されて組換えプラスミドとなったコンストラクトを提供する。宿主細胞に挿入されたそのようなプラスミドを含む組換え細胞も提供される。

【0011】

別の態様では、本発明は組換えオステオレビンポリペプチド、およびオステオレビン領域の多型性による変異体、ならびにオステオレビンポリペプチドおよびその変異体をコードする単離核酸分子を提供する。

【0012】

さらに別の態様では、本発明はオステオレビン遺伝子および領域多型性によってコードされるポリペプチド上の多型性エピトープに特異的に結合できる抗体を提供する。選択的に、抗体はモノクローナル抗体である。別の態様では、本発明はオステオレビン領域トランスジーンを持つ動物を提供する。 20

【0013】

他の態様では、本発明はオステオレビン領域多型性のスクリーニング方法を提供する。一つの態様では、本発明は被験者の異常な骨形成に伴う多型性のスクリーニング方法を提供する。被験者のDNAでオステオレビン多型性の有無を解析する。挿入、欠失、重複、または塩基置換である多型性は、異常な骨形成と関連する。この方法の特定の態様では、多型性は本明細書に開示される一つまたはいくつかのオステオレビン多型性である可能性がある。本発明のさらに特定の態様では、オステオレビン核酸配列中の多型性の存在は、制限酵素断片長多型性解析、質量分光分析を用いたPCR産物の直接の質量解析、侵襲的開裂（*invasive cleavage*）の直接の解析、ARMS（登録商標）（増幅抵抗性変異システム）、ALEX（登録商標）（増幅抵抗性変異システムリニア伸長）、およびCOPS（競合オリゴヌクレオチドプライミングシステム）のような伸長に基づく技術、OLA（オリゴヌクレオチド連結アッセイ法）、Invaderアッセイ法、直接の配列解析、またはポリメラーゼ連鎖反応解析のような鑑別核酸解析技術によって決定される。 30

【0014】

別の態様では、本発明は患者のオステオレビン多型性パターンを決定し、これを野生型オステオレビンパターンと比較し、異常な骨形成に関連する疾病に対する感受性を示すような差異を探すことによって、異常な骨形成に関連する疾病への患者の感受性を同定する方法を提供する。関連する態様では、本発明は異常な骨形成を持つ被験者から単離されたオステオレビン遺伝子配列を、既知のオステオレビン遺伝子配列と比較して、反復性の多型性を同定することにより、異常な骨形成に関連する多型性を同定する方法を提供する。これらの方法の特定の態様では、オステオレビン核酸配列中の多型性の存在は、制限酵素断片長多型性解析、質量分光分析を用いたPCR産物の直接の質量解析、侵襲的開裂（*invasive cleavage*）産物の直接の解析、直接の配列解析、ARMS（登録商標）（増幅抵抗性変異システム）、ALEX（登録商標）（増幅抵抗性変異システムリニア伸長）、およびCOPS（競合オリゴヌクレオチドプライミングシステム）のような伸 40 50

長に基づく技術、O L A（オリゴヌクレオチド連結アッセイ法）、I n v a d e r アッセイ法、D N A チップ解析、またはポリメラーゼ連鎖反応解析のような鑑別核酸解析技術によって決定される。

【0015】

本発明の他の態様には、本明細書で開示される方法で使用する、およびファン・ブッヘムー骨硬化症領域から得られる遺伝子活性に対する候補物質の効果を評価するためのキットおよび製品が含まれる。

【0016】

本明細書で使用される場合、「異常な骨形成」という用語は骨形成の正味の上昇または低下として広く定義される。

【0017】

「多型性」という用語は、挿入、欠失、置換、および重複を含む反復配列を含む、核酸およびアミノ酸配列に起きることが知られている全ての変異を含むと広く定義される。

【0018】

「オステオレビン領域」という用語は、図3（配列番号：3）に示される核酸配列を含む17番染色体の領域として定義される。

【0019】

本明細書で使用される場合、「野生型配列」という用語は、多型性を含まないオステオレビン領域中の配列を指す。

【0020】

「変異体」とは、特定の集団で少なくとも1%の頻度で発生するオステオレビンヌクレオチド多型性を含め、図4（配列番号：2）で示される推定オステオレビンポリペプチドと少なくとも約80%のアミノ酸配列の同一性を持つ、以下に定義される変異体を意味する。そのような変異体には、NまたはC末端を含む配列内のいずれかの場所で一つまたは複数のアミノ酸残基が付加、欠失、または変化したポリペプチドが含まれる。通常は、オステオレビン変異体は、図4（配列番号：2）の対応するオステオレビン配列と少なくとも約80%または85%のアミノ酸配列の同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列の同一性を持つ。最も好ましくは、オステオレビン変異体は、図4（配列番号：2）の対応するオステオレビン配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列の同一性を持つ。

【0021】

本明細書で同定されるアミノ酸配列に関する「アミノ酸配列の同一性パーセント(%)」とは、最大パーセントの配列の同一性を得るために、同一のリーディングフレームに配列を整列させ、必要ならばギャップを挿入した後、オステオレビン配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。保存的置換は、同一とは見なされない。アミノ酸配列の同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、B L A S T ソフトウェア (A l t s c h u l ら、J . M o l . B i o l . , 5 ; 2 1 5 (3) : 4 0 3 - 4 1 0 (1 9 9 0) 参照) のような公開されているコンピュータソフトウェアを用いるなど、当技術分野の技術範囲内である種々の方法で行われる。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを得るために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメント測定のための適当なパラメーターを決定することができる。本明細書で同定されるオステオレビン配列に関する「核酸配列の同一性パーセント(%)」とは、最大パーセントの配列同一性を得るために、配列を整列させ、必要ならばギャップを挿入した後、オステオレビン配列中のヌクレオチドと同一である、候補配列中のヌクレオチドの割合として定義される。核酸配列の同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、B L A S T ソフトウェア (A l t s c h u l ら、J . M o l . B i o l . , 5 ; 2 1 5 (3) : 4 0 3 - 4 1 0 (1 9 9 0) 参照) のような公開されているコンピュータソフトウェアを用いるなど、当技術分野の技術範囲内である種々の方法で行われる。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを得るために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメント測定のための適当

10

20

30

40

50

なパラメーターを決定することができる。

【0022】

本明細書で開示される種々のポリペプチドを記述するときに使用する「単離された」とは、ポリペプチドが同定され、天然の環境の成分から分離および／または回収されたこと意味する。天然の環境の不純物成分は、ポリペプチドの診断または治療での使用に通常は干渉する物質であり、酵素、ホルモン、および他の蛋白質性または非蛋白質性溶質を含む可能性がある。好ましい態様では、ポリペプチドは、スピニングカップ・シークエネーターを使ってN末端または内部のアミノ酸配列を得るために十分な程度、またはクーマシーブルーもしくは銀染色を用いて非還元もしくは還元条件下のSDS-PAGEで均一と評価される程度まで、精製される。単離されたポリペプチドには、オステオレビンの天然の環境の少なくとも一つの成分が存在しないので、組換え細胞中にインサイチュールでポリペプチドが含まれる。しかし通常は、単離ポリペプチドは、少なくとも一つの精製段階によって調製される（本明細書では「単離および精製されたポリペプチド」と称する）。 10

【0023】

「単離された」オステオレビン核酸分子は、オステオレビン核酸の天然の供給源で通常伴っているような少なくとも一つの不純物核酸分子から同定および分離された核酸分子である。単離されたオステオレビン核酸分子は、天然に見られるような形または環境以外にある。したがって、単離されたオステオレビン核酸分子は、天然の細胞中に存在しているオステオレビン核酸分子とは区別される。しかし、単離されたオステオレビン核酸分子には、例えば、天然の細胞とは異なる染色体位置に核酸分子がある、通常オステオレビンを発現する細胞に含まれるオステオレビン核酸分子が含まれる。 20

【0024】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に位置する場合に「機能的に連結」している。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレ蛋白質として発現されるならば、そのポリペプチドのDNAに機能的に連結している；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与えるならば、そのコード配列に機能的に連結されている；または、リボソーム結合部位は、翻訳を促進するような位置にあるならば、そのコード配列に機能的に連結している。一般に、「機能的に連結」とは、連結されるDNA配列が隣接していること、および分泌リーダーの場合には隣接しておりリーディングフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、都合の良い制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しないならば、通常の方法にしたがって、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用できる。 30

【0025】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」とは、一本鎖または二本鎖の分子を表し、塩基A、T、CおよびGを含むDNAであるか、塩基A、U（Tの代替）、CおよびGを含むRNAでありうる。ポリヌクレオチドはコード鎖またはその相補鎖でありうる。ポリヌクレオチド分子は、天然に存在する配列と同一の配列をもつか、天然に存在する配列に見られるものと同じのアミノ酸をコードする別のコドンを含む可能性がある（Lewin「遺伝子V（Genes V）」Oxford University Press、第7章、pp 171-174（1994）参照）。さらに、ポリヌクレオチド分子には、記述されたようなアミノ酸の保存的置換を表すコドンを含む可能性がある。ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAまたはcDNAを表す可能性がある。 40

【0026】

「ポリペプチド」とは、ポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸に対応するアミノ酸を含む分子を意味する。ポリペプチドは、天然に存在するアミノ酸が、同様な性質を持つもので置換されたが、ポリペプチドの機能が変化しないような、保存的置換を含む（Lewin「遺伝子V（Genes V）」Oxford University Press、第1章、pp 9-13（1994）参照）。 50

【0027】

「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、特に単一の抗オステオレビンモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、および中和抗体を含む）および複数のエピトープ特異性を持つ抗オステオレビン抗体組成物を含む。本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体集団から得られた一つの抗体を指す。すなわち、少量存在する可能性のある自然に発生する変異を除いては、その集団を構成する個々の抗体は同一である。

【0028】

本発明は、被験者においてオステオレビンの多型性をスクリーニングする方法であって、被験者から得られたオステオレビン核酸配列における多型性の存在を決定することを含む方法に関する。

10

【0029】

オステオレビン遺伝子の多型性は、a) 骨硬化症患者の配列決定を行い、その配列を対照と比較すること（実施例2b参照）、および b) 5つの異なる民族の47の無関係の個体のDNA（ニュージャージー州ハムデンのCoriell Instituteから入手）において、400～600塩基対の重複する断片（EMBLアクセッション番号AC003098、リリース62.0のヌクレオチド4,000～11,000位として定義されるオステオレビンのゲノム領域全体をカバーする）をPCR増幅することによって同定された。これらの47サンプルで、フォワードおよびリバースプライマーを用いて断片の配列決定を行い、PolyPhredソフトウェア（ワシントン大学よりライセンス供与）を用いて多型性が検出され、変異体のアレル頻度が確立された。

20

【0030】

骨硬化症患者のみに検出され150人以上の対照個体では検出されない、異なる独立した変異が3つ存在した：

A) EMBLアクセッション番号AC003098で定義される6136位におけるGからAへの変異で、Arg (CGA) から停止コドン (TGA) への変化をもたらす。この変異は、あるアメリカ人家族の2人の骨硬化症患者においてホモ接合で見られた。患者は、Balemansら (Am. J. Hum. Genet. 64:1661-1669; 1999) により以前に記述されていた。以前にハプロタイプ解析から保因者と同定されていたこの家族の1人は、この変異をヘテロ接合で持つことが分かった。

B) EMBLアクセッション番号AC003098で定義される6140位におけるCからTへの変異で、Trp (TGG) から停止コドン (TGA) への変化をもたらす。この変異は、あるブラジル人家族の2人の骨硬化症患者においてホモ接合で見られた。患者は、Balemansら (Am. J. Hum. Genet. 64:1661-1669; 1999) により以前に記述されていた。以前にハプロタイプ解析から保因者と同定されていたこの家族のうちの6人は、この変異をヘテロ接合で持つことが分かった。

30

C) EMBLアクセッション番号AC003098で定義される9047位におけるTからAへの変異で、イントロン1の最初でスプライス変異をもたらす。この変異は、以前にTaccioniら (Clinical Genetics, 53:497-501; 1998) によって記述された1人のイタリア人骨硬化症患者において、ホモ接合で見られた。

40

【0031】

さらに、標準的母集団パネルで、オステオレビン領域における遺伝的変異体はいくつか同定された。5'隣接領域およびプロモーター領域において、11の塩基対置換および一つの挿入が検出された：

多型	位置*
CからT	10877
AからG	10876
TからC	10817
CからA	10687
TCC 挿入	10668位と10669位との間
CからG	10424
CからG	10342
AからG	10020
TからC	9783
CからT	9723
CからT	9646
GからA	9616

10

20

* EMBLアクセッション番号AC003098における位置として定義される
【0032】

エクソン1にアミノ酸を変化させる多型が一つ見られた：

多型	位置*	影響
CからT	9242	10位におけるバリンからイソロイシンへの変化

30

* EMBLアクセッション番号AC003098における位置として定義される
【0033】

イントロン1には5つの多型性が見られた：

多型	位置*
AからG	8375
CからT	7894
GからT	7489
TからG	6358

40

* EMBLアクセッション番号AC003098における位置として定義される
【0034】

3' 隣接領域には4つの多型が検出された：

多型	位置 *
CからT	5308
GからA	5004
CからT	4866
GからC	4475

10

* EMBLアクセッション番号AC003098における位置として定義される

【0035】

EMBLアクセッション番号AC003098の配列は、大きなインサートに由来し、5'から3'オステオレピンDNA配列には逆方向に相補的である。したがって、オステオレピンcDNAの遺伝子多型性は、上述の変異体に逆方向に相補的である。

【0036】

ファン・ブッヘムー骨硬化症の疾病区間は、以前に、ヒト17番染色体の0.7 cMの区間にマッピングされた(Balemansら、Am. J. Hum Genet. 64:1661-1669; 1999)。この区間内でオステオレピンをコードする遺伝子は、GenScanを用いたゲノム配列解析によって、コンピュータで同定された(BurgeおよびKarlin, J. Mol. Biol. 268:78-94; 1997)。GenScanのデフォルトのパラメーター設定を用いて、4つのエクソンを持つ遺伝子構造が予測され、そのうち、2つの内部のエクソンは、それ以外よりも低い質のスコアが割り当てられた。オステオレピンと遠い関係にあるヒト蛋白質配列を用いた相同性研究により、2つの内部のエクソンはGenScanによって間違って予測されたことが分かった。その後、ドットプロット解析(「dotter」プログラム: SonnhammerおよびDurbin, Gene 167:GC1-10; 1995)により11番染色体上のマウスシンテニック領域と比較すると、マウスホモログが同定され、2つのエクソンの遺伝子構造が明確に確立した。

20

【0037】

オステオレピン遺伝子のゲノム構造は、図1Bに示されている。この遺伝子には、サイズが220 bpおよび421 bpで、図3に示す配列のbp 9269で始まりbp 5870で終わる2つのエクソンが含まれる。いずれのエクソンも、GT-A Gスプライシングルールに従う。フレームで最初のATGはエクソン1 (bp 9269)にあり、TAG停止コドンはエクソン2 (bp 5870)にあり、213アミノ酸の蛋白質が推定される。

30

【0038】

本発明は、ファン・ブッヘムー骨硬化症疾病領域における多型性が異常な骨形成に関与する可能性があるという知見に関する、物質の組成物ならびに診断および予後診断方法を提供する。本発明の方法に従い、野生型オステオレピン配列の変化が検出される。「野生型配列の変化」には、コード領域および非コード領域における欠失、挿入、および点変異を含む、全ての形の多型性が含まれる。多型性は、コード領域および非コード領域を含む17番染色体のこの領域の任意の場所に起きる可能性がある。

40

【0039】

本発明の鍵となる構成要素は、オステオレピン遺伝子における上述の2つのナンセンス変異および一つのスプライス部位の変異が、すべて主要な特徴として骨密度の大きな上昇を伴う状態である骨硬化症になるという事実によって、明らかに示されているとおり、異常な骨形成に関連する多型性を持つ特定の染色体領域の解明である。

【0040】

したがって、本発明は異常な骨形成を持つことが既知である患者から得られたオステオレ

50

ビン領域において一つまたは複数の配列を決定し、これらの配列を既知のオステオレビン野生型配列と比較することによって、異常な骨形成の素因と相関する、新規のオステオレビン多型性を同定する方法を提供する。

【0041】

異常な骨形成に関連する同定されたオステオレビン多型性の存在は、患者から得た生体試料を検査することによって確認できる。生体試料は、核酸配列を含む細胞を含む物質のサンプルである。生体試料は、血液、組織、および細胞株を含む、様々な供給源から入手することができる。最も簡単には、採血をして、血液細胞からDNAを抽出する。また、胎児細胞、胎盤細胞、または羊膜細胞を検査することによって、出生前診断も可能である。例えば、置換、挿入、または欠失による野生型オステオレビン配列の変化は、本明細書で例示したプロトコールを含め、当技術分野で周知の任意の様々な方法によって検出できる。さらに、多型性が同定されれば、当技術分野で周知の種々の統計および系図解析によって疾病との関連が評価できる。「ヒト遺伝子連鎖のハンドブック (Handbook of Human Genetic Linkage)」(Joseph D. TerwilligerおよびJurg Ott編、第1版、1994)；「生物統計学の基礎 (Fundamentals of Biostatistics)」(Bernard Rosner編、第1版、1982)参照)。例えば、オステオレビン領域における多型性が異常な骨形成と関連しているという証拠は、罹患する親族から抽出されたDNAにおいて、異常なオステオレビン遺伝子産物をコードする配列または遺伝子産物の異常なレベルを生じる配列を見つけることによって得られる。そのような異常な骨形成感受性アレルは、大きな家系では疾病と共に分離されると考えられる。また一般の母集団における個体よりも、異常な骨形成を持つ非血縁者において、はるかに高頻度で存在すると考えられる。さらに、同様な目的のために、血縁関係のない個体の患者および対照の関連解析も行うことができる。

【0042】

本発明は図4（配列番号：2）に示されるアミノ酸配列を持つオステオレビンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸分子を提供する。オステオレビンcDNAの配列決定をして決定された核酸配列（図1B；配列番号：1）には、13～15位（イタリック体、下線）に開始コドン（ATG）を含み、約19アミノ酸残基のリーダー配列を持ち、推定分子量が約24 kDaの213アミノ酸残基のポリペプチド（太字）をコードするオープンリーディングフレームが含まれる。停止コドン（TAG）は、イタリック体で下線が付けられている。成熟したオステオレビンポリペプチドのアミノ酸配列は、図4、アミノ酸残基1～213（配列番号：2）に示されている。

【0043】

したがって一つの態様では、本発明は、a) 配列番号：1に記載の核酸分子またはその相補体、b) 配列番号：2に記載のポリペプチドをコードする核酸分子またはその相補体、c) 上述のa)もしくはb)の核酸分子にハイブリダイズでき、少なくとも中等度の条件、および選択的には高ストリンジェンシー条件下で安定に結合を保持する核酸分子、からなる群より選択される、オステオレビンをコードする単離核酸分子を提供する。

【0044】

本発明の別の態様には、配列番号：1に記載の核酸分子と少なくとも60%同一、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、または95%同一なヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドを含む、単離核酸分子が含まれる。

【0045】

別の態様では、本発明は、a) 上述の核酸分子のいずれか一つにコードされるアミノ酸配列、b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%同一、好ましくは少なくとも90%同一、さらに好ましくは少なくとも95%同一なアミノ酸配列、c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を持つ組換えオステオレビンポリペプチドを提供する。

【0046】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に少なくとも90%の類似性、好ましくは少なくとも95%の類似性を持つアミノ酸配列を持つポリペプチド、ならびに、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と少なくとも60%同一、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、または95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を持つポリペプチドも含む。

【0047】

さらに、本発明は異常な骨形成に関連する可能性のある多型性を持つオステオレビン領域から単離されたヌクレオチド配列を提供する。本発明はさらに、部位特異的PCR突然変異誘発法のような当技術分野で周知の方法を用いた、これらの配列およびそのコードする分子の変異体および修飾物を提供する。部位特異的突然変異誘発法（Carterら、Nuc l. Acids Res., 13:4331（1986）；Zollerら、Nuc l. Acids Res., 10:6487（1987））、カセット変異導入（Wellsら、Gene, 34-315（1985））、制限選択変異導入（Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415（1986））、または他の既知の技術をクローニングされたDNAに用いて、変異DNAを作製できる。本明細書で開示された配列の共有結合修飾は本発明の範囲内に含まれる。例えば、

「分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols In Molecular Biology,）」

Vol.2, ユニット10, 11および14、Frederick M. Ausubel ら編、1995;

「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual,）」§ 12, Tom Maniatis ら編、第2版、1989 参照。

【0048】

以下の説明は主に、オステオレビン領域の多型性配列を含むベクターで形質転換またはトランスフェクトした細胞を培養することによる、本発明の配列の生産に関する。当技術分野で周知の他の方法を用いてこれらの分子を調製することができると考えられる。例えば、多型性配列またはその一部は、固相技術（例、Stewartら、「固相ペプチド合成（Solid-Phase Peptide Synthesis）」、W. H. Freeman Co.、カリフォルニア州サンフランシスコ（1969）；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154（1963）参照）を用いた、直接のオリゴマーまたはペプチド合成によって生産できる。インビトロタンパク合成は、手作業または自動化技術で行える。自動合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer（カリフォルニア州フォスターシティ）を用いて、製造元の指示にしたがって実行できる。オステオレビン配列の種々の部分を別々に化学合成し、化学的または酵素的方法によって結合することもできる。

【0049】

本発明の多型性配列を持つDNAは、これらの配列を持つ個体から得られた組織から調製されたゲノミックライブラリーもしくはcDNAライブラリーから、または上述のようなオリゴヌクレオチド合成によって得られる。ライブラリーは、関心のある配列またはそれによってコードされる蛋白質を同定するように設計されたプローブ（少なくとも約20～80塩基のオリゴヌクレオチドのような）を用いてスクリーニングできる。ライブラリーの例には、λTriplexヒト腎臓cDNAライブラリー（Clontech Laboratories, Inc.）およびλTriplexヒト脾臓cDNAライブラリー（Clontech Laboratories, Inc.）が含まれる。選択されたプローブによるcDNAライブラリーまたはゲノミックライブラリーのスクリーニングは、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」（ニューヨーク：Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）に記述

されたような標準的な手順で行える。オステオレピン領域にコードされる遺伝子を単離する別の方法は、PCR法を使用することである〔Sambrookら、前記；Dieffenbachら、「PCRプライマー：実験室マニュアル（PCR Primer：A Laboratory Manual）」（Cold Spring Harbor Laboratory Press，1995）。

【0050】

後述の実施例では、DNAライブラリーのスクリーニング技術を説明する。プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性を最低限に押さえるため、十分な長さを持ち、十分に明白である必要がある。好ましくはオリゴヌクレオチドは標識され、スクリーニングされるライブラリー中のDNAにハイブリダイズした時に検出できる。標識方法は当技術分野で周知であり、³²P標識ATPのような放射性標識、ビオチン化、または酵素標識の使用を含む。中等度のストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシー条件を含むハイブリダイゼーション条件は、Sambrookら前記に記述されている。

10

【0051】

そのようなライブラリースクリーニング法で同定された配列は、GenBankのような公的データベースまたは他の民間の配列データベースに登録され利用可能な他の既知の配列と比較および整列することができる。分子の一定の領域内または配列の全長にわたる配列の同一性（アミノ酸またはヌクレオチドレベルのいずれか）は、種々のアルゴリズムを用いて相同性を測定するコンピュータソフトウェアプログラムを用いて、配列のアライメントを行って決定できる。

20

【0052】

蛋白質コード配列を持つ核酸は、本明細書で初めて開示される推定アミノ酸配列を用いて、選択されたcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。必要ならば、Sambrookら前記に記述される通常のプライマー伸長手順を用いて、cDNAに逆転写されなかったmRNAの前駆体またはプロセッシング中間体を検出できる。

【0053】

当技術分野で周知の任意の様々な技術を用いて、適当な宿主細胞中で複製によって本発明のポリヌクレオチドを大量に生産できる。所望の断片をコードする天然または合成ポリヌクレオチド断片を、原核細胞または真核細胞中に導入し複製することのできる、通常はDNAコンストラクトである組換えポリヌクレオチドコンストラクトに組み入れる。通常、ポリヌクレオチドコンストラクトは、酵母または細菌のような単細胞宿主中での複製に適しているが、培養された哺乳類または植物または他の真核細胞株への導入（ゲノムへの組み込みありまたはなし）も意図できる。本発明の方法によって生産された核酸の精製は、例えばSambrookら、1989、またはAusubelら、1992に記述されている。

30

【0054】

原核または真核宿主への導入のために調製されたポリヌクレオチドコンストラクトは、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含め、宿主に認識される複製システムを含むことがあり、好ましくはポリペプチドをコードする部分に機能的に連結された転写および翻訳開始調節配列も含む。発現ベクターは、例えば、複製開始点または自律複製配列（ARS）および発現制御配列、プロモーター、エンハンサーおよびリボソーム結合部位のような必要なプロセッシング情報部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位、転写終結配列、およびmRNA安定化配列を含みうる。そのようなベクターは、当技術分野で周知で、例えば、Sambrookら、1989またはAusubelら、1992に記述されるような標準的な組換え技術を用いて調製できる。宿主中で機能するように、適当なプロモーターおよび他の必要なベクター配列が選択され、これには、適切ならば、オステオレピン領域に天然で会合しているものも含まれることがある。実施できる細胞株と発現ベクターの組み合わせは、Sambrookら、1989またはAusubelら、1992に記述されている。当技術分野では多くの有用なベクターが周知で、

40

50

Stratagene、New England Biolabs、Promega Biotech、Invitrogen、Pharmingenおよび他の販売元から入手できる。trp、lacおよびファージプロモーター、tRNAプロモーターおよび糖分解酵素プロモーターのようなプロモーターは、原核生物宿主で利用できる。有用な酵母プロモーターには、メタロチオネイン、3-ホスフォグリセリン酸キナーゼ、またはエノラーゼまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のような他の糖分解酵素、マルトースおよびガラクトース利用に関与する酵素、その他のプロモーター領域が含まれる。酵母での発現に適したベクターおよびプロモーターは、Hitzmanら、EP 73, 675 Aにさらに記述されている。適当な非天然哺乳類プロモーターには、SV40の初期および後期プロモーター、またはマウスモロニー白血病ウイルス、マウス腫瘍ウイルス、トリ肉腫ウイルス、アデノウイルスII、ウシパピローマウイルス、またはポリオーマ由来のプロモーターが含まれる可能性がある。また、コンストラクトを増幅可能な遺伝子（例、DHFR）に結合して、その遺伝子が複数コピー作製されるようにできる。適当なエンハンサーおよび他の発現制御配列については、「エンハンサーおよび真核生物遺伝子発現（Enhancers and Eukaryotic Gene Expression）」Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1983)も参照。強い分泌シグナルペプチドをコードする配列も、オステオレピンシグナルペプチド配列を除去した成熟したオステオレピン蛋白質の配列に機能的に連結することができる。例えば、gp67のシグナル配列をバキュロウイルスベクターに含め、昆虫細胞由来のポリペプチドの分泌を促進することができる。そのようなベクターは、Pharmingenなどから市販されている。そのような発現ベクターは自律的に複製する可能性があるが、当技術分野で周知の方法によって、宿主細胞のゲノム中に挿入しても複製する可能性がある。

【0055】

発現およびクローニングベクターは、ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要な蛋白質をコードする遺伝子である、選択可能なマーカーを含む可能性が高い。この遺伝子が存在するために、インサートを発現する宿主細胞のみが増殖することになる。典型的な選択遺伝子は、a) 抗生物質または他の毒性物質、例、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート等に対する耐性を与える、b) 栄養要求性欠損を補完する、またはc) 天然培地では得られない重要な栄養素を供給する（例、バチルス（Bacilli）のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）、といった蛋白質をコードする。適切な選択可能マーカーの選択は、宿主細胞に依存し、種々の宿主に対する適当なマーカーは当技術分野で周知である。

【0056】

関心のある核酸を含むベクターは、インビトロで転写し、得られたRNAを、例えば注射のような周知の方法によって宿主細胞に導入するか、当技術分野で周知の方法によってベクターを直接宿主細胞中に導入することができる。この方法は、宿主細胞によって異なり、電気穿孔；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、または他の物質を用いたトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；感染（ベクターがレトロウイルスゲノムのような感染性物質の場合）；および他の方法が含まれる。一般に、Sambrookら、1989またはAusubelら、1992を参照のこと。とりわけ上述のものを含め、当技術分野で周知の任意の方法を用いた宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、本明細書では「形質転換」と呼ばれる。上述の核酸が導入された細胞は、その子孫細胞も含む。

【0057】

本発明の核酸およびポリペプチドは、適合する原核または真核宿主細胞において、ベクターまたは他の発現手段でオステオレピン核酸またはその一部を発現することによっても、大量に調製できる。最も一般的に使用される原核宿主は、大腸菌（Escherichia coli）の株であるが、枯草菌（Bacillus subtilis）またはシェードモナス（Pseudomonas）のような他の原核生物も使用されることがある。

哺乳類、または酵母、糸状菌、植物、昆虫、もしくは両生類もしくは鳥類のような他の真核宿主細胞も、本発明の蛋白質の生産に有用な場合がある。哺乳類細胞の培養による増殖自体は周知である。一般的に使用される哺乳類宿主細胞株は、V E R OおよびH e L a細胞、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、およびW I 3 8、B H K、およびC O S細胞株であるが、例えば、発現量の増加、所望のグリコシル化のパターン、または他の特徴を得るために、他の細胞株が適当である可能性があることは、当業者には理解されると思われる。

【0058】

クローンは、ベクター作製の様式によって、マーカーを用いて選択する。マーカーは同じまたは異なるD N A分子上にあり得るが、好ましくは同じD N A分子上にある。原核宿主では、形質転換体は、例えばアンピシリン、テトラサイクリンまたは他の抗生物質への耐性によって選択できる。温度感受性によって特定の産物が生産されるのも適当なマーカーとなり得る。

10

【0059】

本発明のポリヌクレオチドで形質転換された原核または真核細胞は、本発明の核酸およびポリペプチドの生産のみでなく、例えば、オステオレピンポリペプチドの性質の研究にも有用である。本明細書に開示される配列に基づくプローブおよびプライマーは、マウスオステオレピン遺伝子のような他の種における相同な配列および蛋白質を同定するために使用できる。さらに、他の種のゲノムまたはc D N A配列のデータベースでヒトオステオレピン配列を持つ配列を検索することによって、コンピュータで他の種の相同配列も同定することができ。そして、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）を用いて種特異的クローンを得ることができる。これらの遺伝子配列および蛋白質は、それが単離された種において、本明細書に記述される診断／予後、治療、および薬剤耐性スクリーニング法に使用できる。

20

【0060】

異常な骨形成に関連する多型性を持つ核酸配列は、ストリンジェントから中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で、標的配列のプローブと安定なハイブリッドを形成するポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによって検出できる。本発明によって、多型性領域に選択的にハイブリダイズするプローブのデザインが可能になる。特異的配列に選択的にハイブリダイズするプローブのデザインおよび使用するハイブリダイゼーション条件は、当技術分野で周知である。「分子生物学の最新プロトコル（C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y）」I～III巻、F r e d e r i c k M. A u s u b e lら編、1995参照。例えば、プローブが標的配列に完全に相補的だと予想されるならば、ストリンジェントな条件が使用できる。ミスマッチが予測される場合には、例えば変異体が予測され、プローブが完全に相補的でないと思われる場合には、ストリンジェンシーを下げることもできる。ノイズを抑えるために、非特異的／偶然の結合を排除するような条件が選択される。

30

【0061】

オステオレピン領域の多型性のプローブは、多型性に隣接する、またはその全体もしくは一部をカバーし、この領域に選択的なハイブリダイゼーションを可能にする、任意の適切な長さのものでよい。標的配列にプローブの配列と同一の配列が含まれているならば、ストリンジェントな条件でもハイブリッドは比較的安定なので、プローブは例えば約8～30塩基対の範囲のような短いもので良い。プローブとのある程度のミスマッチが予測されるならば、すなわちプローブが変異領域にハイブリダイズすると考えられるならば、必要な特異性で標的配列とハイブリダイズする、より長いプローブが使用できる。

40

【0062】

プローブには、標識またはレポーター分子に結合した単離されたポリヌクレオチドが含まれ、標準的な方法で、関心のある配列と類似した、またはこれに隣接する他のポリヌクレオチド配列を単離するために使用できる。プローブの調製および標識方法は、例えば、S a m b r o o kら、1989またはA u s u b e lら、1992参照。他の類似したポリ

50

ヌクレオチドは、相同ポリヌクレオチドを用いて選択できる。または、これらもしくは類似したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、遺伝コードの重複性を用いて、合成または選択できる。発現された配列では、例えば、サイレント変異（これにより種々の制限部位が作製される）または特定の系で発現を最適化するために、種々のコドンの置換が導入できる。ポリペプチドの性質を変化させるために、おそらくポリペプチドの分解または回転率を変えるために、多型性を導入できる。本発明の合成オリゴヌクレオチドまたは他のポリヌクレオチドを含むプローブは、天然に存在するもの、または組換え一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド、または化学合成したものでよい。プローブはニックトランスレーション、クレノウ反応、または当技術分野で周知の他の方法でも、標識できる。

【0063】

標的特異的配列に選択的に結合するために適当なサイズおよび配列を持つプローブのデザイン、ならびに使用するハイブリダイゼーション条件は、当技術分野で周知である。「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」Vol. 1, ユニット2, 4, および6, Frederick M. Ausubelら編、1995参照。多型性配列からの、少なくとも約8ヌクレオチド、通常は少なくとも約15ヌクレオチド、および約6 kb未満、通常は約1.0 kb未満のポリヌクレオチド配列の部分が、プローブとして好ましい。多型性配列の特定の部分を持つプローブも考えられる。さらに、多型性領域に隣接したプローブも、核酸サンプルの評価に使用できる。ゲノム配列の評価以外にも、プローブはオステオレピンをコードするようなmRNAが細胞または組織に存在するかどうかを決定するために使用できる。

【0064】

異常な骨形成に関連する多型性の存在を検出するために、血液のような生体サンプルを調製し、多型性配列の有無を解析する。これらの試験の結果およびその解釈は、医療従事者に戻して被験者に伝えられる。そのような診断は、診断検査室で行われるか、または診断キットを製造し、医療従事者または個体の自己診断用に販売される。

【0065】

オステオレピン領域の多型性と異常な骨形成の間の関連を同定すると、異常な骨形成を伴う疾病のリスクを持つ個体を同定するための、初期の症状発現前のスクリーニングが可能になる。そのような個体を同定するために、オステオレピン領域の多型性は、直接または対象配列のクローニング後に、スクリーニングされる。潜在的な病原性の多型性についての評価、および異常な骨形成に関連する多型性の特異的な解析の両方に使用できる、本発明のいくつかの方法がある。例えば、本発明は、個体の異常な骨形成に関連する多型性のスクリーニング方法を提供する。また本発明は、患者から単離されたオステオレピン配列を、既知の野生型オステオレピン配列と比較し、異常な骨形成に関連する何度も出現する多型性を同定することによる、異常な骨形成に関連する多型性の同定方法も提供する。

【0066】

以下に説明するように、サンプルは、当技術分野で周知の様々な核酸解析技術の任意のものをを用いて、正常配列から異なる核酸配列の存在を調べることができる。核酸解析技術には、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH)、直接のDNA配列決定、一本鎖立体配座多型 (SSCP)、制限酵素断片長多形 (RFLP) を含むサザンブロットティング、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、多型性特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、およびPCR-SSCP解析が含まれるがこれらに限定されることはない。以下で説明するように、発現される分子およびポリペプチドをコードする配列に関しては、さらに別の技術も使用できる。核酸およびアミノ酸配列の評価および操作の技術の総説は、「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」I-II巻、Frederick M. Ausubelら編、1995を参照のこと。

【0067】

オステオレピンmRNA発現の変化は、当技術分野で周知の任意の技術によって検出でき

10

20

30

40

50

る。これには、ノーザンブロット解析、定量的PCR増幅（TaqMan）、およびRNAse保護が含まれる。mRNA発現の低下は、野生型遺伝子座の変化を示す。野生型遺伝子座の変化は、野生型オステオレビン蛋白質の変化をスクリーニングすることによっても検出できる。例えば、特異的なオステオレビンエピトープと免疫反応するモノクローナル抗体を用いて、組織のスクリーニングができる。認識する抗原が無いということは多型性であることを示す。変異アレルの産物に特異的な抗体は、変異遺伝子産物の検出にも使用できる。そのような免疫アッセイ法は、当技術分野で周知の任意の都合の良い形式で行える。それには、ウェスタンブロット、免疫組織化学アッセイ法、およびELISAアッセイ法が含まれる。変異した蛋白質を検出する任意の方法を用いて、野生型オステオレビンの変化の検出ができる。蛋白質結合の決定のような機能的アッセイ法も使用できる。また、オステオレビン領域における遺伝子の生化学的機能の検出をするアッセイ法も使用できる。通常は、この領域の遺伝子にコードされるポリペプチドの生化学的機能の変化、この領域の野生型遺伝子に変化していることを示す。

【0068】

細胞レベルおよび細胞内レベルでの蛋白質の局在性は、ゲストペプチドに対する抗体を使用する方法である、エピトープタギングによって決定できる。エピトープタギングは、クローニングされた遺伝子および既知のペプチド（エピトープ）を認識する抗体から始める。組換えDNA技術を用いて、エピトープをコードする核酸の配列を、クローニングされた遺伝子のコード領域内に挿入し、ハイブリッド遺伝子を形質転換のような方法によって細胞に導入する。ハイブリッド遺伝子が発現されると、その結果としてゲストペプチドとしてエピトープを含むキメラ蛋白質が得られる。エピトープが蛋白質の表面に露出しているならば、エピトープ特異的抗体によって認識されるので、免疫蛍光法または他の免疫局在技術を用いて、細胞内の蛋白質を観察することができる。したがって、ペプチドタグをコードする機能的に連結された配列が、ベクター中に含まれてもよい。ペプチドタグは、通常は8～12アミノ酸であるが、これより長くてもよい。タグは特異的な抗体（例、mycエピトープ）で認識されるか、特定の金属（例、His6タグはニッケルカラムに結合する）に結合することができる。タグによって、オステオレビン蛋白質の精製が容易になる。

【0069】

DNA配列の変異を直接検出するために、いくつかの方法が使用できる。直接のDNA配列決定は、手作業でも自動化蛍光配列決定でも、配列の変化を検出できる。検査する個体のオステオレビン領域の遺伝子のアレルは、通常の方法でクローニングできる。例えば、個体から血液サンプルを入手して、サンプル中の細胞からオステオレビンゲノムDNAを単離し、適当なベクターに連結して増幅する。そしてクローンの配列を決定し、正常なオステオレビン配列と比較する。DNAクローニングおよび配列決定に関する技術は当技術分野で周知であり、「分子生物学の最新プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」Vol. 1、ユニット7、Fredrick M. Ausubelら編、1995を参照のこと。

【0070】

DNA配列の変異を検出する別の手法は、一本鎖立体配座多型（SSCP）（Oritara、1989）である。この方法では、特にDNA断片のサイズが200bpを越える場合には、全ての配列の変化を検出するのではなく、DNA配列の変異の大部分を検出するように最適化できる。検出感度の低下は不利ではあるが、SSCPで処理量が増えるという魅力があり、研究目的では多型性を検出するために直接の配列決定をすることに代わる選択肢になる。SSCPゲル上での移動度が変化した断片の配列決定をして、DNA配列変化の詳しい性質を決定する。2つの相補的DNA鎖の間のミスマッチの検出に基づく別の手法には、クランプ変性ゲル電気泳動（CDGE）（Sheffieldら、Am. J. Hum. Genet., 49:699-706（1991））、ヘテロ二本鎖解析（NA）（Miteら、Genomics 12:301-306（1992））、および化学ミスマッチ切断（CMC）（Grompeら、P. N. A. S. 86:5

855-5892 (1989)) が含まれる。タンパク切断アッセイ法または非対称アッセイ法のようなこれらの多型性クラスを検出する他の方法は、特定のタイプの多型性のみを検出し、多型性のミスセンスを検出しない。DNA配列変異を検出するために利用できる方法の総説は、Grompeら、Nature Genetics 5:111-117 (1993) および Landegrenら、Genome Research 8:769-776 (1998) を参照のこと。

【0071】

DNA配列の多型性を検出するための迅速な予備解析は、RFLPを用いて実施できるが、これはDNAを一つまたは複数の制限酵素、好ましくは多数の制限酵素で切断し、一連のサザンブロットでオステオレビン特異的プローブを用いて解析するものである。各ブロットには一連の健常個体および異常な骨形成を持つ一連の症例が含まれている。ハイブリダイズする断片（既知の多型性遺伝子座の付近またはこれを含む配列をプローブとしたときに対照DNAとは異なる長さを持つ）を示すサザンブロットは、多型性の可能性があることを示す。RFLPに関する技術は当技術分野で周知であり、「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」Vol. 1, ユニット 2、Frederick M. Ausubelら編, 1995を参照のこと。

10

【0072】

制限酵素断片長多型解析は、解析されていない多型性を同定することができるので、解析には好ましい。特に、オステオレビン中の様々な領域の配列をプローブとして用いるだけで、未同定のものを含め様々な多型性について、当業者は核酸サンプルを評価することができる。これらの解析に用いるプローブは、本明細書で開示される例示的な多型性（例、EMBLアクセッション番号AC003098の10877位におけるT/Cプロモーター多型性のような）を持つ配列を含むか、または、本明細書で同定されたもしくは当技術分野で周知の染色体ウォーキング技術によって単離された隣接配列を含み得る。Uegharaら、Mamm Genome 1(2):92-99 (1991) 参照。

20

【0073】

ポリメラーゼを用いた増幅を用いた核酸解析の特に好ましい方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。ポリメラーゼ連鎖反応および他のポリメラーゼを用いた増幅アッセイ法は、ポリメラーゼを用いた増幅サイクルを利用することで、コピー数を100万倍以上増加できる。増幅したら、得られた核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化による解析、配列決定、またはDNAプローブの基質として使用できる。特定の多型性を含む配列が既知の場合、これらの配列を標的とする様々なPCRプライマーが作製できる。例えば、多型性に隣接する配列を用いて、これらの配列を増幅できる。配列特異的PCRの変形として、特定のオステオレビン多型性に3'端でハイブリダイズするプライマーを用いることができる。特定の多型性が存在しないならば、増幅産物は観察されない。欧州特許出願第0332435号およびNewtonら、1989に開示されるような、増幅抵抗性変異システム (ARMS) も使用できる。または、オステオレビンの5'領域またはエクソンに対するプライマー対を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことができる。PCRは、正常なオステオレビン領域に任意の配列に基づくプライマー対を用いて実行できる。例えば、イントロンの一つに対するプライマー対を調製し、利用することができる。最後に、mRNAを逆転写酵素でcDNAに転換して、mRNAを用いてPCRを行うことができる。通常の技術を用いた一本鎖立体配座多型 (SSCP) によって増幅産物を解析し、差異を同定し、その後配列決定をして正常遺伝子配列と比較する。

30

40

【0074】

本発明のプライマー対は、PCRを用いた特定のオステオレビン配列のヌクレオチド配列の決定に有用である。例えば、遺伝子自身のDNA合成を増幅させるために、一本鎖DNAプライマーの対を17番染色体上のオステオレビン配列内またはその周辺にアニーリングさせることができる。これらのプライマーの完全なセットがあると、遺伝子のコード配列、エクソンの全てのヌクレオチドの合成が可能になる。プライマーのセットは、好まし

50

くはイントロンとエクソンの両方の配列の合成を可能にする。また、アレル特異的プライマーも使用できる。そのようなプライマーは、特定のオステオレビン変異アレルのみにアニーリングするので、鋳型として変異アレルが存在する場合にのみ産物を増幅する。

【0075】

増幅した配列をその後クローニングするのを容易にするために、プライマーはその5'末端に制限酵素部位の配列を持つことができる。例えば、プライマーの全てのヌクレオチドは、制限酵素部位を形成するために必要ないくつかのヌクレオチドを除いて、一つまたは複数のオステオレビン多型性に隣接する配列に由来しても良い。そのような酵素および部位は当技術分野で周知である。プライマー自身は、当技術分野で周知の技術を用いて合成できる。一般に、プライマーは市販のオリゴヌクレオチド合成機を用いて作製できる。当技術分野の水準を考えると、特定のプライマーのデザインは、十分に当技術分野の技術範囲内である。「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」II巻, ユニット15、Frederick M. Ausubelら編, 1995参照。

10

【0076】

PCRで増幅されたオステオレビン領域のDNA配列は、アレル特異的プローブを用いてスクリーニングすることもできる。これらのプローブは、核酸オリゴマーで、各々が既知の多型性を含む遺伝子配列の領域を含む。例えば、一つのオリゴマーは、オステオレビン多型性配列の一部に対応する約20ヌクレオチドの長さである可能性がある。そのようなアレル特異的プローブ群を利用して、PCR増幅産物をスクリーニングし、遺伝子中に以前に同定された多型性の存在を同定できる。アレル特異的プローブの増幅したオステオレビン配列へのハイブリダイゼーションは、例えば、ナイロンフィルター上で行える。ストリンジェントな条件下で特定のプローブにハイブリダイズすれば、そのアレル特異的プローブと同じ多型性が組織中に存在することを示す。適当なプライマー対を用いて個体のDNAを増幅し、例えば、アレル特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションなどによって、増幅産物を解析することにより、一般的なオステオレビン変異について、個体を迅速にスクリーニングすることができる。多型性の解析がなされたら、アレル特異的オリゴヌクレオチド (ASO) ハイブリダイゼーションのようなアレル特異的検出手法を用いて、大量のサンプルの迅速なスクリーニングが可能になる。

20

30

【0077】

多型性を検出するために好ましい別の方法には、質量分光分析の使用がある。例えば、EMBLアクセッション番号AC003098の9783位置におけるT/Cのような多型性を含むDNA配列のPCR増幅後、対象の多型性から1塩基上流で終わるプライマーを用いて、内部のプライマー伸長反応を行う。プライマー伸長反応でジデオキシヌクレオチド3リン酸 (ddNTP) のみを使用すると、プライマーは多型性部位 (例、9783位) に相当する1塩基のみ、伸長する。伸長したプライマーの正確な質量は、MALDI-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分光分析) で直接決定され、ヘテロ接合体は明確に区別される2つのピークを生成する。

【0078】

40

侵襲的開裂 (invasive cleavage) の産物も、質量分光分析または蛍光を用いた方法によって検出できる。一塩基多型 (SNPs) は、特別の構造特異的エンドヌクレアーゼ (cleavase) が特別のDNA構造 (特異的ハイブリダイゼーションで生じる) を認識することにより検出される。インベータープローブおよび標識されたシグナルプローブは、標的DNAにハイブリダイズし、インベータープローブがシグナルプローブとSNP部位の少なくとも1塩基重複するようにデザインされている。シグナルプローブ標的二本鎖のインベージョンは、標識を含む一本鎖のフラップを置き換える。フラップと部分的にインベージョンされた二本鎖との結合部は、開裂部位に相補的な塩基がある場合のみに酵素で開裂され、シグナルプローブのハイブリダイズしていない領域が放出される。開裂された断片の検出は、上述のように行うか、直接のゲル解析または断片

50

上のタグに対する酵素結合抗体によって行う。開裂後、新しいシグナルプローブがハイブリダイズし、このプロセスが繰り返され、開裂されたシグナルプローブが蓄積する。したがって、この方法でシグナルは増幅され、この増幅によってこの技術全体の感受性が増加する。

【0079】

逆に、いくつかの多型性を含むオリゴヌクレオチドをナイロンフィルター（「SNPストリップ」）上に固定し、アレルト異的ハイブリダイゼーションに関して、個体のDNAから得られた多様なPCR反応産物をハイブリダイズすることができる（Chengら、Clin. Chem. Lab. Med.（1998）36（8）：561-566, RMS, Alameda）。

10

【0080】

上述の診断アッセイ法の大部分は、必須の要素として核酸プローブを含んでいる。標的配列の存在を検出するためにプローブが使用されるときには、血液または血清のような解析用生体サンプルを処理して核酸を抽出する。上述のように、サンプルの核酸は、標的配列の検出を容易にするために様々な方法、例、変性、制限消化、電気泳動、またはドットプロット、で調製できる。核酸解析物の標的領域は、プローブの標的配列とハイブリッドを形成するために、通常は少なくとも部分的に一本鎖である必要がある。配列が天然で一本鎖ならば、変性は不要である。しかし、配列が二本鎖であれば、その配列はおそらく変性させる必要がある。変性は、当技術分野で周知の様々な技術によって行える。

【0081】

標的核酸、プローブおよび解析物は、プローブ内の標的配列が、解析物中に推定される標的配列と安定なハイブリッドを形成するような条件下でインキュベートできる。解析物に結合するために使用されるプローブの領域は、ヒト17番染色体の標的領域と完全に相補的であり、したがって、偽陽性を予防するために、高ストリンジエンシー条件が望ましい。しかし、ゲノム中でユニークな染色体領域にプローブが相補的な場合にのみ、高ストリンジエンシー条件が使用される。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、およびホルムアミド濃度を含め、ハイブリダイゼーション中および洗浄手順における様々な要素によって決定される。これらの要素は、例えば、Maniatisら、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」Cold Springs Harbor Laboratory, 1982およびSambrookら、1989に概説されている。場合によっては、標的配列の検出手段を提供するために、3本鎖、4本鎖等のようなより高次のハイブリッドの形成が望まれる場合もある。

20

30

【0082】

当業者は容易に理解するように、核酸ハイブリダイゼーションは、塩基組成、相補鎖の長さ、およびハイブリダイズする核酸間のヌクレオチド塩基ミスマッチの数に加え、塩濃度、温度、有機溶媒のような条件に影響される。ストリンジエントな温度条件には、一般に30℃を越える温度、通常は37℃を越える温度、および好ましくは45℃を越える温度が含まれる。ストリンジエントな塩条件は、通常は1000 mM未満、典型的には500 mM未満、および好ましくは200 mM未満である。しかし、パラメータの組み合わせは、任意の単一のパラメータの大きさよりも、はるかに重要である。プローブ配列は、特定の条件では二重鎖DNAに特異的にハイブリダイズし、3重鎖または他の高次DNA複合体を形成する場合もある。そのようなプローブの調製および適当なハイブリダイゼーション条件は、当技術分野で周知である。

40

【0083】

得られたハイブリッドの検出には、通常は標識されたプローブを用いる。または、プローブは標識されていないが、直接または間接的に標識されたリガンドへの特異的な結合によって、検出されることもある。適当な標識、ならびにプローブおよびリガンドの標識方法は、当技術分野で周知であり、例えば、既知の方法で組み込める（例、ニックトランスレーション、ランダムプライミング、またはキナーゼ）放射性標識、ビオチン、蛍光基、化

50

学発光基（例、ジオキセタン、特にトリガ（triggered）ジオキセタン）、酵素、抗体などが含まれる。この基本的スキームの変形は当技術分野で周知であり、無関係の物質から検出するハイブリッドを容易に分離できる変法、および／または標識部分からのシグナルを増幅する変法が含まれる。そのようないくつかの変法の総説は、例えば、MatthewsおよびKricka, Anal. Biochem., 169:1, 1988; Landegrenら, Science, 242:229, 1988; Mittlin, 1989; 米国特許第4,868,105号; およびEPO公報第225,807号に記述されている。

【0084】

上述のように、いくつかの非PCRスクリーニングアッセイ法が、本発明では考えられる。一つの手順では、核酸プローブ（または通常のホスホジエステルを置換するメチルリン酸骨格のようなアナログ）を、低濃度で存在するDNA標的にハイブリダイズさせる。このプローブは、ハイブリダイゼーションの特異性に干渉しないような共有結合で、プローブに共有結合した酵素を持つ可能性がある。この酵素-プローブが結合した標的核酸複合体は、遊離のプローブ酵素結合体から単離され、酵素検出のために基質が添加される。酵素活性は、発色またはルミネセンスの変化として観察され、感受性が向上する。オリゴデオキシヌクレオチド-アルカリ性ホスファターゼ結合体の調製およびハイブリダイゼーションプローブとしての使用に関する例は、Jablonskiら, N. A. R., 14:6115-6128, 1986参照。2段階標識増幅法は、当技術分野で周知である。これらのアッセイ法は、小さなリガンド（ジゴキシゲニン、ビオチンなどのような）がオステオレビン領域の配列に特異的結合のできる核酸プローブに結合されるという原理に基づく。アレルト異的プローブもこの実施例の範囲内と考えられ、アレルト異的プローブの例には、本特許出願の素因を作る多型性を含むプローブが含まれる。

【0085】

一つの例では、核酸プローブに結合した小さなリガンドは、抗体-酵素結合体によって特異的に認識される。この例の一つの態様では、核酸プローブにジゴキシゲニンが結合される。ハイブリダイゼーションは、アルカリ性ホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体によって検出される。アルカリ性ホスファターゼは、化学発光基質を修飾し、検出可能となる。この態様の核酸プローブの標識方法は、Martinら, BioTechniques 9:762-768, 1990参照。第2の例では、小さなリガンドは、第1のリガンドに特異的に複合体を形成する能力のある、第2のリガンド-酵素結合体によって認識される。この例の周知の態様は、ビオチン-アビジンタイプの相互作用である。核酸プローブの標識方法およびビオチン-アビジンアッセイ法における使用は、Nguyenら, BioTechniques 13:116-123, 1992参照。本発明の範囲内で、本発明の核酸プローブアッセイ法はオステオレビン多型性を検出する能力のある核酸プローブの組み合わせを利用する。したがって、一つの例では、一つの細胞サンプルで多型性の存在を検出するために、遺伝子に相補的な複数のプローブが使用され、特に異なるプローブの数は2、3、または5の異なる核酸プローブ配列である。別の例では、患者のオステオレビン領域配列の多型性の存在を検出するために、この領域の遺伝子に相補的な複数のプローブが使用される。このカクテルには、この領域の異なる患者群で同定されたアレルト異的多型性に結合できるプローブが含まれる。この態様では、任意の数のプローブが使用でき、好ましくは異常な骨形成に関連すると同定されたファン・ブッヘム-骨硬化疾病領域中の主要な多型性に対応するプローブを含む。

【0086】

上述の技術の一つによって見つかった任意の配列の差は、異常な骨形成を伴う可能性のあるオステオレビン領域の分子変異を持つ個体を同定することになる。これらの変異には、いくつかの形があり、コード領域および非コード領域のいずれにも発生し得る。発現された遺伝子に関連する特定の多型性は、異常な蛋白質を生じるか、蛋白質発現を大きく変え得る。他の破壊的多型性には、小さなインフレームの欠失、および、生産される蛋白質に対して著しい影響のある非保存的塩基対置換が含まれる。その例には、システイン残基

へもしくはシステイン残基からの変化、塩基性アミノ酸から酸性アミノ酸への変化もしくはその逆、疎水性アミノ酸から親水性アミノ酸への変化もしくはその逆、または蛋白質の2次もしくは3次構造に影響を与えるような他の多型性がある。サイレント多型性または保存的なアミノ酸置換を生じるようなものは、一般的に蛋白質の機能を破壊するとは考えられない。

【0087】

本明細書で開示される方法およびオステオレビン配列は、DNAチップテクノロジーを用いた様々なアッセイ法も提供する（参照として本明細書に組み入れられるWangら、Science 15; 280:1077-1082 (1998) および米国特許第5, 858, 661号および同第5, 837, 832号参照。）特に、本発明は固相支持体（「チップ」）上に固定されたオステオレビント異的オリゴヌクレオチドプローブのアレイを提供する。ここでは、オリゴヌクレオチドプローブのアレイを含むDNAチップを用いて、標的核酸サンプルが、特定の参照配列と同一または異なるヌクレオチド配列を含むかどうかを決定できる。典型的なアレイには、参照配列（オステオレビン配列中でEMBLアクセッション番号AC003098によって定義される10668位におけるTCCの挿入など）に完全に相補的なプローブ、および完全に相補的なプローブから一つまたは複数の塩基が異なるプローブを含む。典型的な態様では、アレイは1セットのオリゴヌクレオチドプローブを含んでおり、特定の参照配列中の各塩基に対して、セットには参照オステオレビン配列の一部に完全に相補的なプローブ、およびこの配列中の一つまたは複数のヌクレオチドがあらかじめ決められたヌクレオチドセット（通常、多型性領域の一部を含む）で置換されている以外はこの参照配列と関連している別のプローブが含まれる。そのようなアレイに対して結合する配列の検出は、当技術分野で周知の様々な方法で行われる（例えば米国特許第5, 837, 832号参照）。

【0088】

本発明はさらに、オステオレビン領域中の遺伝子によってコードされる蛋白質の多型性領域に対する抗体を提供する。典型的な抗体には、当技術分野で周知のポリクローナル、単一特異的ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、ヘテロ結合体抗体が含まれる。特に、異常な骨形成の存在は、野生型オステオレビンポリペプチドの変化に基づいても検出できる。そのような変化は通常の技術を用いた配列解析によって決定できるが、より好ましくは、オステオレビンペプチド中の差異もしくはオステオレビンペプチドの欠損を、抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）を用いて検出する。抗体を作製および精製する技術は当技術分野で周知であり、本発明に請求される調製物を得るために任意のそのような技術が選択できる。本発明の好ましい態様では、抗体は溶液から多型性オステオレビン蛋白質を免疫沈降させ、またポリアクリルアミドゲルのウェスタンまたは免疫ブロット上でこれらの蛋白質と反応する。別の好ましい態様では、免疫細胞化学技術を用いて、抗体はパラフィンまたは凍結組織切片中のオステオレビン蛋白質を検出する。

【0089】

オステオレビンポリペプチドまたはその多型性を検出する方法に関連した好ましい態様には、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ法（RIA）、免疫放射定量法（IRMA）、およびモノクローナルおよび／またはポリクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイ法を含む免疫酵素法（IEMA）が含まれる。典型的なサンドイッチアッセイ法は、参照として本明細書に組み入れられるDavidら、米国特許第4, 376, 110号および同第4, 486, 530号に記述されている。

【0090】

オステオレビン領域の遺伝子またはその修飾型をコードする核酸は、治療に有用な試薬の開発およびスクリーニングに役立つ、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物の作製にも使用できる。トランスジェニック動物（例、マウスまたはラット）は、トランスジーンを含む細胞を持つ動物である。トランスジーンは出生前、例、胎児期に、動物または動物の祖先に導入される。トランスジーンはトランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組み込まれたDNA断片である。一つの態様では、確立された技術にした

がって、オステオレピンをコードする cDNA を用いてオステオレピン蛋白質 (EMBL アクセション番号 AC003098 によって定義される 10668 位における 3 塩基対の挿入を含むオステオレピナレルを含む) をコードするゲノム DNA をクローニングできる。そしてゲノム断片を用いてオステオレピン (例えば、ヒト蛋白質で見られる、EMBL アクセション番号 AC003098 によって定義される 10668 位における 3 塩基対の挿入を含むマウスオステオレピン) をコードする DNA を発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製できる。トランスジェニック動物、特にマウスやラットのような動物の作製方法は、当技術分野で通常のものになっており、例えば、米国特許第 4, 736, 866 号および同第 4, 870, 009 号に記述されている。通常は、組織特異的エンハンサーを用いて、特定の細胞がオステオレピントランスジーンの特異的とされる。しかし、例えば、 β アクチンプロモーターの制御下で、オステオレピントランスジーンが広く発現されるトランスジェニック動物も作製できる。胎児期に動物の生殖細胞系に種々のオステオレピン配列をコードするトランスジーンのコピーが導入されたトランスジェニック動物を用いて、オステオレピン配列をコードする DNA の発現の上昇の効果を調べることができる。そのような動物は、例えば、過剰発現に伴う病的状態からの保護を与えると考えられる試薬の試験動物として使用できる。本発明のこの局面では、試薬で処理されたトランスジェニック動物が、未処理のトランスジェニック動物と比較して病的状態の発生率が低下していれば、その試薬は、その病的状態のための潜在的な治療薬の候補となり得る。

【0091】

または、オステオレピンの非ヒトホモログを用いて、オステオレピン「ノックアウト」動物を作製できる。ノックアウト動物は、オステオレピン領域配列をコードする内在遺伝子と、動物の胚細胞に導入されたオステオレピン配列をコードする変異したゲノム DNA との間の相同組換えの結果、オステオレピン領域が欠損または変化した遺伝子を持つ。例えば、オステオレピンをコードする cDNA を用いて、確立された技術でオステオレピンをコードするゲノム DNA をクローニングできる。オステオレピンをコードするゲノム DNA の部分を削除するか、または組み込みをモニターするために使用できる選択可能マーカーをコードする遺伝子のような別の遺伝子で置換できる。通常は、ベクターには変化していない隣接 DNA (5' および 3' の両方) が数キロベース含まれている (相同組換えベクターの説明は、Thomas および Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) 参照)。ベクターを胚性幹細胞株に導入し (例、電気穿孔法)、導入された DNA が内在性 DNA と相同組換えを起こした細胞を選択する (例えば Li ら、Cell 69: 915 (1992) 参照)。その後、選択された細胞を動物 (例、マウスまたはラット) の胚盤胞に注入し、集合キメラを形成する (Bradley, 「奇形癌と胚性幹細胞—実践的アプローチ手法 (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells? A Practical Approach)」E. J. Robertson 編 (IRL, Oxford, 1987), pp 113-152 参照)。そしてキメラ胚を適当な養親の疑妊娠メスに移植し、胚が成熟して「ノックアウト」動物が生まれる可能性がある。生殖細胞系に相同組換えした DNA を持つ子孫は、標準的な技術で同定でき、動物の全ての細胞が相同組換えした DNA を含む動物の生産に使用できる。ノックアウト動物は、オステオレピンポリペプチドがないことによる、病態の発現について解析できる。

【0092】

本明細書に開示される方法およびオステオレピン配列は、組換えオステオレピン配列、通常は、病態に関連した一つまたは複数の多型性を持つオステオレピン配列を用いた様々な薬剤スクリーニング法も提供する。そのような蛋白質は、蛋白質および蛋白質複合体の活性の新規のモジュレーター (阻害剤または活性化剤) の薬理的解析に特に有用である。さらに、種々の薬剤スクリーニングアッセイ法が当技術分野では周知であり、その方法は本明細書で開示されるオステオレピン配列の評価に容易に適応される (内容が参照として本明細書に組み入れられる、Vinggaard ら、Toxicol. Appl. Ph 50

armacol. 155 (2) : 150-160 (1999); Fernandesら、Curr. Opin. Chem. Biol., 2 (5) : 597-603 (1998); Gonzalesら、Curr. Opin. Biotechnol. 9 (6) : 624-31 (1998)、および米国特許第5, 877, 007号および同第5, 780, 258号参照)。

【0093】

そのようなアッセイ法の例示的態様では、組換え多型性オステオレビン蛋白質を、野生型オステオレビン蛋白質に応答することが既知の細胞の培地に導入できる。応答は、例えば、Cytosensor microphysiometerシステム(Molecular Dynamics社製)を用いた培地のpHの変化の測定、または細胞内カルシウム濃度、サイクリックAMPまたはGMPレベル、シグナル伝達経路の蛋白質のリン酸化の変化の測定、またはレポータージーンアッセイ法を用いて、定量できる。そのような特定の活性または他の細胞特性の応答的变化は、ヒトまたは動物の疾病または他の状態の治療に適した物質の発見、開発または解析を含む、多くの有用な方法に利用できる。そのようなオステオレビン蛋白質および関連する細胞アッセイ法は、疾病または他の生物学的過程の研究、様々な薬剤の単独または組み合わせの効果の決定、および疾病または他の状態の発生の低下または予防に役立つ可能性のある物質の同定または解析にも、有用な可能性がある。

10

【0094】

本発明の特定の態様は、オステオレビン活性またはオステオレビンに誘導される活性を調節する薬剤のスクリーニングのための方法および組成物を提供する。そのような薬剤は、オステオレビン多型性に伴う疾病を含む、様々なオステオレビン発現の生理的発現を調節する役に立つ可能性がある。

20

【0095】

様々な薬剤の薬理的活性を試験する細胞ベースのアッセイ法は、オステオレビンに応答する細胞を、薬剤の存在がオステオレビンに対する細胞の応答に変化をもたらし得る条件で、候補薬剤に暴露することで実施できる。強く関連した態様では、(1) 変異および(2) 野生型オステオレビンに対する細胞の応答の比較も、解析できる。

【0096】

本明細書に記述されるアッセイ法のための組換えオステオレビンを生産する細胞も、オステオレビン領域に多型性を持つ個体から、または上述のトランスフェクション法を含む当技術分野で周知の様々なプロトコルによって作製できる。または、そのような細胞は、相同組換え、例えば多型性または修飾されたオステオレビン配列を含むトランスジーンと野生型オステオレビン配列との組換え、によって作製されたトランスジェニックまたはノックアウト動物を利用して作製できる。同様に、アッセイ法自身のための細胞は、オステオレビン受容体の内在性発現をする細胞または受容体のトランスフェクトされた細胞で良い。また、当技術分野で周知の様々なレポーター遺伝子およびアッセイ法は、本明細書で開示される細胞ベースのスクリーニングアッセイ法に適応できる。例えば、レポーター遺伝子は宿主細胞中で、インサイチュ解析によって検出される、転写活性の定量または半定量的関数である、発色または蛍光の変化を生成する酵素をコードする可能性がある。酵素の例には、エステラーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ(組織プラスミノゲンアクチベーターまたはウロキナーゼ)、および当業者には周知である発色団または蛍光体を生成する活性によって検出可能な他の酵素が含まれる。好ましい例は、本明細書で開示される大腸菌βガラクトシダーゼである。この酵素は、βガラクトシダーゼを持つ細胞によって、インジゴを生成する基質インドリルβ-D-ガラクトシドの開裂によって色の変化を生じる(例、Goringら、Science, 235: 456-458 (1987))およびPriceら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 156-160 (1987))。この酵素が好ましいのは、哺乳類細胞中での内在性βガラクトシダーゼ活性は通常非常に低く、βガラクトシダーゼを用いた解析スクリーニング系が宿主細胞のバックグラウンドに影響されないためである。

30

40

50

【0097】

本明細書に記述される方法で同定される、オステオレビン活性またはオステオレビンに誘導される活性の調節因子、およびそのような調節因子および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物も本発明の対象である。

【0098】

オステオレビンポリペプチドを含む医薬品、ならびにそのような医薬品の製造過程であって、オステオレビンポリペプチドおよび必要ならば一つまたは複数の他の治療に有用な物質を生薬の投与形態にする過程も、本発明の目的である。この薬学的組成物は、例えば錠剤、コートした錠剤、糖衣錠、硬質または軟質のゼラチンカプセル、溶液、乳濁液、懸濁液のような形態で、経口投与できる。投与は、例えば座薬を使って直腸から；例えば軟膏、クリーム、ゲルまたは溶液を使って局所的または経皮的に；または例えば注射溶液を用いて非経口的に行える。

10

【0099】

錠剤、コートした錠剤、糖衣錠、または硬質のゼラチンカプセルの調製には、本発明の化合物を薬学的に不活性な、無機質または有機質の賦形剤と混合できる。錠剤、糖衣錠、または硬質のゼラチンカプセルに適当な賦形剤の例には、ラクトース、トウモロコシデンプンまたはその誘導体、タルクまたはステアリン酸もしくはその塩が含まれる。軟質ゼラチンカプセルに適当な賦形剤には、例えば、植物油、ワックス、脂肪、半固体もしくは液体のポリオール等が含まれる。活性成分の性質によって、軟質ゼラチンカプセルには、全く賦形剤が不要な場合もある。溶液およびシロップの調製に使用できる賦形剤には、水、ポリオール、サッカロース、不活性な糖およびグルコースが含まれる。注射溶液に使用できる賦形剤には、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が含まれる。座薬、局所または経皮投与に使用できる賦形剤には、例えば、天然または硬化した油、ワックス、脂肪、および半固体または液体のポリオールが含まれる。薬学的組成物には、保存剤、可溶化剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色料、香料、浸透圧の調製のための塩、緩衝液、コート剤、または抗酸化剤が含まれ得る。他の薬学的に価値のある薬剤が含まれることもある。

20

【0100】

それゆえ本発明にしたがいオステオレビンポリペプチドは、骨硬化症、ファン・ブッヘム病、ページェット病のような異常な骨形成を伴う疾病の治療のための薬剤の製造に使用できる。投与量は限度内で変化でき、当然、各症例の個体の必要量に適応される。

30

【0101】

本発明の別の態様では、例えば上述の診断用に使用できる、プローブ、オリゴヌクレオチド、または抗体を含む製品およびキットが提供される。製品には、ラベル付きの容器が含まれる。適当な容器には、例えば、ボトル、バイアル、試験管が含まれる。容器はガラスまたはプラスチックのような様々な材料から形成され得る。容器には、上述のような診断に有効な薬剤を含む組成物を入れる。容器上のラベルは、その組成物が特定の診断用を使用されることが表示される。本発明のキットは、通常、上述の容器、および緩衝液、希釈剤、フィルター、および使用方法を記載した添付文書を含め、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料を含む一つまたは複数の他の容器を含む。

40

【0102】

本発明は以下の実施例でさらに詳細に説明されるが、これらは説明のために提供されるものであり、本発明を制限する意図は全くない。当技術分野で周知の技術または以下に特に説明する技術が利用される。本明細書に引用される全ての特許および論文は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0103】

実施例

実施例中に言及される市販の試薬は、特に記載がないかぎり、製造元の指示にしたがって使用された。

【0104】

50

実施例 1

オステオレビン cDNA のクローニングおよび配列決定

ヒト腎臓組織に由来する cDNA ライブラリー (Clontech) をハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。使用されたプローブは、オステオレビン遺伝子の推定 3' UTR に由来するプライマーを用いて、PCR によって得られた。陽性クローンを培養し、プラスミド DNA は高純度のプラスミド単離キット (Roche) を用いて単離した。ベクタープライマーおよび遺伝子の内部プライマーを用いた自動配列決定装置 (ABI 377) による配列決定では、4 つのクローンの存在が示された。標準的な手順による配列決定で、図 1 B に示すような全長の cDNA クローンが示された。

【0105】

10

実施例 2

多型性の検出

a) 多型性を検出するために、5 つの異なる民族由来の 47 人の非血縁個体からオステオレビン遺伝子を PCR 増幅した。断片特異的プライマー対 (長さ 18 ~ 27 bp) を用いて、200 ~ 700 bp 断片が増幅された。例えば、プライマー対 OSTV prom-F2 (図 5) および OSTV prom-R2 (図 5) を用いて 588 PCR 産物が作製された。断片は、重複しオステオレビンのゲノム領域全体を覆うようにデザインされた。PCR 産物をカラム精製した後、ABI Dye ターミネーターケミストリー (蛍光ベースの配列決定) を用いて ABI キャピラリーシーケンサーで DNA の配列決定を行った。DNA 配列の多型性は、Polyphred ソフトウェア (Nickerson, D. ら、1997: NAR 25 (14): 2745-2751) を用いて決定したが、これは Phred、Phrap、および Consed (すべて米国ワシントン大学からライセンスされたプログラム) に基づいて動作する。このプログラムは、蛍光ベースの配列決定により、ヘテロ接合の単一ヌクレオチド置換の存在を自動的に検出することができる。上述の例では、588 bp の断片に以下の 5 つの多型が検出された。

20

C から T	10877
A から G	10876
T から C	10817
C から A	10687
間に TCC 挿入	10668 および 10669

30

* EMBL アクセス番号 AC003098 の位置として定義

【0106】

b) ファン・ブッヘムおよび骨硬化症の患者から得られた適当なゲノム DNA 断片を PCR 増幅して、3 つの疾病関連多型が検出され、断片の配列決定および健常個体の DNA との比較が行われた。ハイスループットスクリーニングを可能にするために、2 つの変異に関して PCR ベースのアッセイ法が開発された。ブラジルの患者の変異については、変異アレル中に Mbo I 制限部位を生じるような修飾プライマーがデザインされた。Mbo I 制限消化および電気泳動後、変異アレルは正常アレルから識別できる。アメリカの患者の変異アレルには、野生型アレルにはない Bst E I I 制限部位が含まれているため、変異アレルと正常アレルの区別が可能になる。

40

【0107】

実施例 3

組換えオステオレビンの発現

3 種類の組換えオステオレビンが生産された。第 1 のものは、カルボキシ末端タグ、第 2 はアミノ末端タグを持ち、第 3 はタグを持たない。エピトープタグは蛋白質の精製のため

50

に組み込まれた。コンストラクトは標準的な方法で作製された（ここでM a n i a t i sまたはP r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g yを引用）。以下に詳述するように、プライマーは各配列の5'末端に制限部位を持つオステオレビン配列の適当な領域に対してデザインされた。ヒトオステオレビン配列をP C Rで増幅し、その産物を適当な酵素で消化し、同様に消化されたベクターに連結した。

【0108】

カルボキシ末端にタグのついた蛋白質の発現コンストラクトは、B a m H IおよびH i n d I I I部位を用いて、p B l u e B a c 4 . 5 / V 5 - H i sベクター（I n v i t r o g e n）で作製された。ベクターに挿入するために、内在性の分泌シグナルと推定される部分を含むオステオレビンコード配列全体が増幅された。ベクターにはV 5エピトープが含まれていた。これにより、融合蛋白質の発現が、抗V 5エピトープ抗体（I n v i t r o g e n）を用いたウェスタン解析でモニターできるようになる。加えて、このベクターは、ニッケルカラム（多くの販売元がある）上でポリペプチドの精製を可能にするH i s 6タグをコードしている。

【0109】

アミノ末端にタグのついた蛋白質の発現コンストラクトは、B a m H IおよびE c o R I部位を用いて、p A c S e c G 2 Tベクター（P h a r m i n g e n）で作製された。ベクターに挿入するために、成熟オステオレビン配列と推定されるもの（シグナル配列を含まない）が、増幅された。ベクター自身は、高レベルの分泌のためにg p 6 7蛋白質から得た分泌シグナルをコードしている。また、ベクターは抗G S T抗体（P h a r m i n g e n）を用いた発現モニタリングおよびグルタチオンアガロースビーズ（P h a r m i n g e n）を用いた精製の両方を可能にするグルタチオンSトランスフェラーゼタグを含んでいる。また、G S Tタグとオステオレビンの間にはトロンビン開裂部位があるので、精製後にタグから蛋白質を分離することができる。

【0110】

タグのない蛋白質の発現のためのコンストラクトは、B a m H IおよびE c o R I部位を用いて、p B l u e B a c 4 . 5ベクター（I n v i t r o g e n）で作製された。ベクターに挿入するために、内在性の分泌シグナルと推定される部分を含めオステオレビンコード配列全体が増幅された。

【0111】

各コンストラクトは完全に配列決定を行い、増幅またはクローニング過程で偶然ヌクレオチドの変異が導入されていないことを確認した。

【0112】

適当な宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の増殖、およびオステオレビンの特異的発現は、製造元の指示にしたがって行った。

【図面の簡単な説明】

【図1A】オステオレビン遺伝子のゲノム構造の模式図を示す。

【図1B】オステオレビンc D N Aのヌクレオチド配列を示す（配列番号：1）。

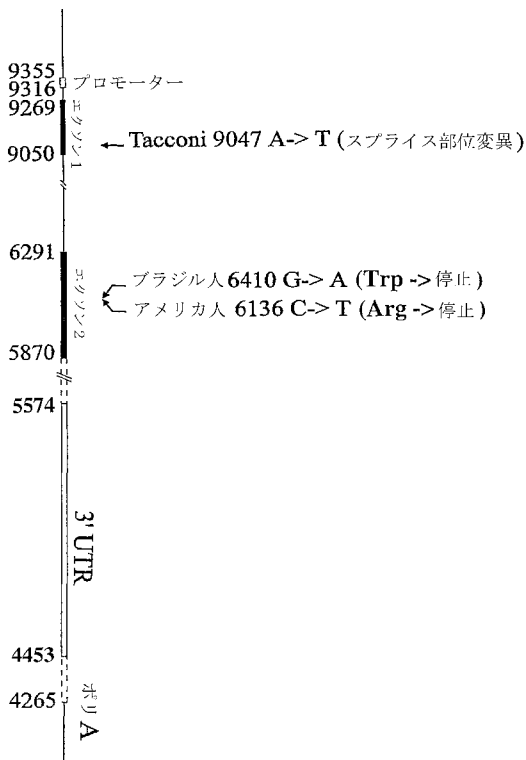
【図2】様々なヒト組織におけるオステオレビンm R N Aの発現のP C R解析を示す。心臓、腎臓（最強の発現）、膵臓、胎盤、前立腺、脾臓、および末梢血リンパ球から得られたヒトc D N Aにおいて観察されたシグナルで示されるように、転写物は広範に発現されている。発現はヒト骨芽細胞でも示された。

【図3】ゲノムのオステオレビン領域を示す（配列番号：3）。配列はH T S ラージインサートクローンに由来する（E M B L アクセッション番号A C 0 0 3 0 9 8）。オステオレビン配列は相補鎖上に位置する。したがって、ゲノムのオステオレビンの逆方向相補D N A配列が以下に示されている。

【図4】オステオレビンポリペプチドのアミノ酸配列を示す（配列番号：2）。

【図5】D N A配列決定によって多型性をスクリーニングする前にオステオレビン領域を増幅するために使用したプライマーを示す（配列番号：4～27）。

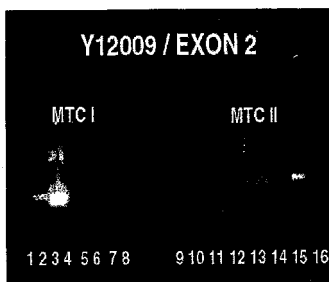
【図 1 A】



GAGACACCGCCTTCTGCCACCACTCACGGACACATTTCTGCCTAGAAAAAGCCTT
CTTACTGCTCTTACATGTGATGGCAATATCTTACACTAAAAGAAATATTATTGGGGA
AAAACATCAAGTGTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATACTGCCACCC
AAAAATCTTTTGAAGATCATTTCCAGACACCTCTTACTTTCTGTAGTATTAA
TTGTTAAAAAAGGTTTAAACAGAGCAGATGACATATGAAAGCCTGCAGGA
CTGGTCGTTTCTTGGCAATCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAAGTA
GTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACATATTTATTTCTCACTTAAGTTATTATGCAA
AAGTTTTTCTGTAGAGAATGACAAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAACAGTCTGT
TCTTCCAGAGTCCAGAGACATTTGTTAATAAGACAATGAATCATGAAAAA
AAA

【図 2】

オステオレピンは腎臓および末梢血リンパ球で
発現される



ヒト組織 cDNA

1. 脳
2. 心臓
3. 腎臓
4. 肝臓
5. 肺
6. 脾臓
7. 胎盤
8. 骨格筋
9. 胸腺
10. 卵巣
11. 精巣
12. 白血球
13. 前立腺
14. 小腸
15. 脾臓
16. 大腸

【図 1 B】

CTGGCTGGTACCATGTCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTGCCTGCTGGTAC
ACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGC
CAGCGAAATCATCCCGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCTCCACCGGAGCTGGAG
AACAAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGCTCCCAACACCC
TTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAGCTGCACTTCAACCGCT
ACGTGACCGATGGGCGCTGCCGAGCGGCAAGCGGTCACCGAGCTGGTGTGCT
CCGGCCAGTGGGCGCGCGCGCTGTGCTGCCAACGCCATCGGCCGGGCAAGT
GGTGGCGACCTAGTGGGCGGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCA
GCGGTGACAGTGTCTGTGCCGCTGGTGGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCG
CCTGGTGGCTCGTGCAAGTGCAAGCGCTCACCGCTTCCACAACAGTGGAG
CTCAAGGACTTCGGGACCGAGCGCGCTCGGCCGAGAAAGGGCGGAAAGCGCGG
CCCCGCGCCGGAGCGCCAAAGCCAAACAGCGCGAGCTGGAGAACGCTACTAG
AGCCCGCGCGCGCGCTCCCAACCGGGCGCGCGCGCGCGCTGAACCGCGCGC
CACATTTCTGTCTCTGGCGGTGGTTGATTGTTTATATTTCATTGTAATGCCTGC
AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGG
CAAGGCCCGCTCAGCCCGCAGCTGAGGGTCCACCGGGCAGGGAGGGAAT
TGAGAGTACAGACACTGAGCCAGCAGCGCGCTCTGGGCGCGCTACCTTTG
CTGGTCCCACTTCAGAGGAGCGAGAAATGGAAGCATTTTCAACCGCTGGGTTT
TAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGGGAAAGTCCAGGAGTGGTTAAGAAAGTTGGATA
AGATTCCCGCTTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCTGAGGCGTGGCCAGAGCA
CAAGACTGGGGCACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTTGGCACTAACCTG
CTGTGTAACCTTGAACACACAATTTCTCTTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTA
AATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTATTGGCATATGATTCCA
AGGACTCCAGTGGCTTTTGAATGGGAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAG
AGAATGAATGCAGTTGCAATTGATTGAGTGCAGAGGTGACTTCCAGAAATTCAGAGT
GTGATGCTCTCTCTGACAGCCAAAGATGAAAAACAAACAGAAAAAAGTAAA
GAGTCTATTATGGGTGACATATTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAAGCTATGC
TGCTTCCAGCGCTGGCTTCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCGCTCCATCTCAAA
GAAATAACATCATCATTGGGTAGAAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGG
GATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCGGAGCGCA
TAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAGAGAGAGTGAAGGTTCAGGAGCACTGGC
CTTGACAGGCCGAGGGAGCAGCCATCACAACCTCACAGACCAGCATCCCTTT

【図 3】

3951 GGAGCTATGG AAGGCTTTTG AGCAGGGAG TGATACAATG AGACAGCAT
4001 TTTGGAAGCC AGCATGGAGG GAGGCTGCT AAAAGGATAC AAGGCTGAGG
4051 TTATTACCAT GCGCTGGGTG AAGAAATGCG GTCTGGSTTT GGAAGGAAG
4101 GGATAAATCAT GACTTTTCAA AGGAAGACAT AATTGCCACA AGGCGCACCA
4151 GAGAGCAGTC AAAGGTGTGT CCAAGGTGG AGCTCTAGTG ACCAAGAGAA
4201 GGGTGTCAAC TTTGACAGAA ATGACGTAT GTGTGGTTGA CAAATGAGA
4251 CCACATCCTT TCGGTCAATG TTCATTGCT TTATTACAA TGTCTCTGGA
4301 CTCGGAAGA ACAGACTGTT AATTCATAAA GCAATATTA CATTGTGATT
4351 CTCATACAGA AAACCTTTTG CATAAATAAC TTAAGTGAGA AAATAATAT
4401 GTAACCTAAC TCTTTAAAA CCACTACTTT CATTCTTGTG GACAAGTCCC
4451 ACGTGAAGA ATTGCCAAA AACGACACG TCTGCGAGGCT TTTCATATGT
4501 CATGTGCTTC TGTTTAAAC TTTTCTTTT TAACAATTA AAATACACA
4551 GAAAGTAAGA GGTTCCTGG AATGATTTT CAAGAAGATT TTTGGGTGGC
4601 AGCTATTATG CTCTGCAGTT TCTCAGCAFA TGTACAGCAC TTGTAGTTTT
4651 TCCCAATA ATATCTTTT AGTGTAGAT ATGCCATCAC ATGTAGAGGC
4701 AGTAAGAAGC TTTTCTAG GCAGAAATGT GTCCGTGAGT GGTGGGAGA
4751 AGCGGGTGC TCAAAAGGA TGTCTGGTC TGTAGTTTG TGATGGCTGC
4801 TCCCTGGGC CTCCAGGCC AGTGCTTGG AACCTTTCAC TTCTCTCGG
4851 AAGGTGACTT TAAACATGG CTATGGTGG GGGAGGGAT GTCTCTCTTT
4901 GGGAGTTGG GCGGATGTG ATTTCTATCC CTCCACAC CCGGAGGCC
4951 TCTCTTTTC TACCCAAAG GATGATGTA TTCTTTGAG ATGAGGGGT

5001 GGAGGTAGCC AAACATCCGG GGAAGCCAGG CTGGGAAGCA GCATAGCTTC
5051 TTCCAGGAGT TTGTACGCG TAAATATGTC AGCATAAAT AGACTCTTTA
5101 CTTTTTTTT TCTGTGTTT TTTCATCTTT GGTCTCAGA AGAGAGCATC
5151 ACAACTCTGA ATTCTGGAAG TGACCTTGGC ACTGAATCAA TGCAACTGCA
5201 TTCACTCTCT CTCTTCTCT CTCTCTCTCT CACCTCTGCC CATTCAAAAG
5251 GCACTGGAGT CCTTGGAAAT ATATGCCAAT AGTCTCCTCG AGATCCTATT
5301 CCCACCTCCA CCTCATTTT ACAAACTGGA AATTGAGTCC CCGAAGGAGA
5351 ATTGTGTAGT TCAAGGTTAC ACAGCAAGTT AGTGGCGAGG CCAAGGACTAG
5401 AAACCAATC TACAGTTGCC CCCAGTCTTG TGCTCTGGGC ACGCCCTCAGG
5451 CTTCTGTATG GGCAGCGAGG TGCAAGGGGG AATCTTATCC AACTTTCTTA
5501 ACCAGTCCCT GGACTTTCCC ACTCCACAC CGCTCCCTTA AAACCCGAGG
5551 GCGGTGAAA TGCTTCCATT TCTGCTCCT CTGAAGTGGG ACCAGCAAG
5601 GTAGCGGCGC CCAGAGGCGG GGTCTGCTGG CTCAGTGTCT GTGACTCTCA
5651 ATTCCCTCCC CTGCCCTCTG GGAACCCCTCA GCTGGCGGGC TGAAGGGGGC
5701 CTTGCGGGCG CCGGGGATT CTACAGGCCCT GGAAGTCTC AGCCCCCTGC
5751 CTTGGGTTGC AGGCATTAC AATGAATAT AAACAATCAA ACCACGCGCA
5801 GAGGACAGAA ATGTGGGCG GGGTTCTAGG CGCGGGGCGC CCGCGGTGG
5851 GAGGGGCGC GGGCGGCTC TAGTAGGCT TCTCCAGTCC GGCCTGGTTG
5901 GCTTTGGGCG TCGGGGCGG GGGCGGCGC TTCCGGCCCT TCTGGGCGG
5951 AGCGGCTCG CTCCCGAAGT CCTTGAAGTC GCACTGGTTG TGGAAAGCGG
6001 TGAGGCGCTT GCATTTGCAC GAGGCCACCA GGCGACCTT CGCGCGCGC

6051 GCGGCTCAC CACCGGACA CAGCAGTGC ACGCCCTGG CCGGTAGCG
6101 GTCGGGGATG CAGCGAAGT CGGCCCACT AGGTCCGAC CACTTGGCG
6151 GCGGATGCG GTTGGGACG AGCGCGCGC GCGGCACTG CCGGAGCAC
6201 ACCAGCTCGG TGACGGCTT GCGCTGCGG CAGGCCCAT CGTACAGTA
6251 GCGGTGAAG TGAGGTCGC GGCAGCTGTA CTCGACACG TCTGTGAGA
6301 GAGGCGCGG TGAGGTTGC CGCCCGCTG GCCACCCCTG CCTTGACCG
6351 GCGGCTCTCT CTCACCCCA GCGCTGCTT TGCCAAAGCT GTCTCCAGAG
6401 GCTTTGCCC CTGAACATCT ATTGCAGAA GGTCCAGAT GCTTAGAGC
6451 TGGTGAAAG CTCTCTGCG CACCTGTCC CCTCGAGCC AAATGACTGC
6501 TGGGTTCAA ACACGAGGC TCCATCGCTC ACTGAGGTG TCACTTGGG
6551 CAAGTTCCCT AACCTCTCT TCTTCTCTGT CTGCAAAATG GGCGCGCCA
6601 AGCATTCGGA GTTAATCCAT TACACAGCA ATGCAGAAA TACCATTGG
6651 CACATATAGC TGAAGGCTC GGTGTATAG TATTATTAT ATCATTTCTC
6701 TTCTGGGTC TTCTTATGAT TTAAGCCACA CTGTCGCG AGGTCCCTG
6751 GCTGGGCGG GGTAACTACT CAGCACACT TCTGCTGGC TGTGCTTCT
6801 CCCAAATCC TTTTCCAGC ACTTGGAGG GGTGGACAGG GGATGGAGAA
6851 AGGAGTAGAG GTTAATTGAA GGTAAATAT CAGGCGAGT GCTGTGAGG
6901 CAGGGGACTG AAGGGAGGT GATCAGACA GGAATCATT AGACTTGAAA
6951 GGAATCAAG GCAGTGTGTC CAACCCCTC ATTATCAATG AGAATATGA
7001 GGCCAGCCA GAGAAAAGAA CTGCCCAA AGGCTGGGT GCATCTCCG
7051 ACTCCACTTC CTTGGGTCC CAGCACCTT TGCGTCCGC AAGATGGAG

7101 GCTCTGCTT CGAGATCCA TGGAAGCTG GGTGGGGGA TGGAGCTAG
7151 GCGTCTTTT TACTGTGTT ACTTTCTAC CATAGGGGCC CTGAGCTTG
7201 ACCAAAACC TACAGTTCA GCTGCACAA ACATTGACCT GGTCTCTGC
7251 TGGGCATTT TCTGTGCTG TGTATCTGA ATGGGGCCT CATGGTGATA
7301 CTCCCTGGC AGGACAGAT TGCGTCCGA GGCCTGCCCT GATCCCTGC
7351 ACACACCTTG ACCATGTCT CTATGTGGA CTTAGATGG TGGGAGCTTT
7401 TTAATAGCT GGTCTCTGT TGAATACAG TCCACCCCA AAGGTTTCAT
7451 GGGGATAGTT CCAATGTAC AAGAAAGAT GAAAAATAG CTTAAGACCA
7501 AACCAGAGAG GGCACAGGA AGGCACCCC CCACCCCCAC TCTGAAGAGC
7551 AAGCACAGCA GGGGAGATG GGCACAGCC ATGCTCTGG GCTGCTTCT
7601 GGTCTGTGG CTGTTTGA TCTTCACTC TGCAGGCTG GAATGTGTG
7651 GTGTCAGGG GGGCATTTG CCAGGGAAG GGCATTTTG CGCTTTTCG
7701 AGAATAGCG CCTTAGGCC GGCATTCCT CTGAGATCA TGACTTTGT
7751 TTGAGCATGT GGTTCCTCA GGGCTGTG CTTCTCTGG GATTCAGCA
7801 AGGTGACAT TTTGTTTG GGTCTCTAC AGCCCTTAC GCACTCTCTG
7851 GAGCCAGCT GACTTGCCT AGAAGGGAG CTGTGGGGG AGGCCCTCT
7901 GTCTCCATT TTGAAGAGG AGGGTCTGG CTGGCTCCC ATGCAGTGC
7951 CCTTTTAGC ACCCATAGT CCCAACAGT TGTAGGCGG GAGGGCTTG
8001 GGTCCAGGAG CCTGGGAGT GCACTTCTCT GCCACTGGA TAATGGCCAG
8051 AGGACAGGA AGCTTTAGT CTGAAGTGT ATTTAGAGC CCCCATGGC
8101 CTAGGATTC CTGCCAATTA TAGAGCCGA TGCAACTGT CACTTGGCT

8151 TCTCTGTGA GCGTGAACA GGAACCCAG GTTCTCTCT CTTCTCCCTC
8201 CCTTGAATG AGGCAAGGT GGGACTGGG TGGTCTGTA GGCAGATGT
8251 CCTACTCCT GCACAGAGA TGCTGCTCT CCTCCAGGG CTTGAGTCA
8301 GCTGACCCA TGTAGGGGC TAAACTGTG CGAATACTC CCATTCTTC
8351 AAGTCCACC TCCCTGGCA GGCATGGC AATCCACAT GCAGGGTGC
8401 CTCTCTGGC TTCTTCCCA CTGCTTGTG GAGATCTGC CCCCACCC
8451 CCCCACAC CAGGGTATC TTGAGTTGG ATCAACAGG GTTACACCT
8501 CAGCTCTCT CACTACCAAG TTACTGAGT CTTGGAACCT GTTCTCTCC
8551 CTTCGAGCTG GGGTTCACC TCCGTGGAT TCCATGATG GGTCTGTGT
8601 GGTGGGACA GCCACCA CAATAGAGT TCCGTGCC CACAGTGTCT
8651 GTTCTGTGA TGGGAGCTC CTTACTTGT TTCTCTCC AGTGATCCA
8701 GCAGCTGGAC GTGGCTCTA TATCCAGG AGGATTTCT TTGAACCTT
8751 TTCTTTCTG AGCCCTGAG CTTGTCTGA TGCCCTGAT CCATACCTC
8801 ACCACCCAG CGTCTCTCT GCGTGGCT CTCACAGG TCTGTGCT
8851 CATGCTCTG CACTGAATT TGAAGGCTG ACCAGCAGC CATCTTCC
8901 CCACCTCCAG GCAAGACTGT TCTCGACCA GTGCTGGAG AGGCCAGCA
8951 TCTTCACTG GACTACCCA GTCTTCCA CTTCCCAAG AGAAGTTCT
9001 AAAACCTCC CAGGATCTT TACTAAGAT TCTCTCTCC ACCCATACC
9051 TTTGTCTCA AAGGCTGTG GGGAGGCG CCTCGGTC TCCGCGGT
9101 TCAIGTCTT GTTGTCTCT AGCTCCGCT GAGGCTGGG GTACTCTCG
9151 AGCTCGGGA TGATTCTGT GGCATCTT TTGAAGCTT GCCACCTG

9201 GCCCTCCACT ACACGGAAG CTTGTGTAC CAGCAGGCAG ACAGACACA
 9251 GGGCCAGTGG GAGCTGCATG GTACGACCCA GAGGAGGCCA CCCCACCTTC
 9301 CAGTAGCACA GGCTCTGTC TCCAGCCGAG ACACGGTGGC CTTTAAAG
 9351 CCCCCTCTCG CTTCAATGCC GCCAATGAGG ACAGGCTGGG GCAGGGCTGG
 9401 TCCCATGTTT CCTCAGCCC CGGAGGAGG GAAAGGGTG TGTTCAGAGC
 9451 AAACCCCTCC CAAAGACTTC TCCTCTAGCT CAGCAAACTT CCAATTGCT
 9501 GCTGGCACTC CCAGGTGACC CAGAGAGAGG GGGCGTGTGA GGCAGGCC
 9551 AAGCCTGCTC TCCGGCACCT CCCACGTGCT GGCAGCTGTG GTTTCAGAT
 9601 ATCAAAATGA GCTCCGGCTT TTAATTGTCT GTCTCCCTGG GCCCTCGGC
 9651 ATTCTCAAAA CAAACTGTGG ACCCGCTCAA CAAAGAAAAT GTGCAGTTCT
 9701 GAGTGTCTCG CGGGGCTGAG CCGGGCTTAT TCCATTCTTC AGGCCAAGTT
 9751 CATTGTGCAC CCCACCAACA AATGCCCAA GGTGTTTCTG TTTGACCCCC
 9801 ATAGACCCAG CCAGAGGCAA AAAGATGCTT TTAAGAAAT CCAATTGTC
 9851 CCAACTCCAC AAGTCTCAGC ATTCACTGTC CTAAAGAAAG AAGCCTCTCT
 9901 TGGTATTCTC TGGAGGCCAA GAGAGAGAAC TAGAGGCTCA GAGCAGGGT
 9951 GCCCGCTGG GAGAGAGGGC AGGATCTCTG TTACAAATCG AGGATCGCT
 10001 GGTCACTCAG GCTCTGTGTA TGGACAGCAC AGAGGAAATC CCAGCTCATG
 10051 CTCTCAGGG ATCCTGTGCA CTGTGACAGG CACTTCTGAG CCAGGGCACT
 10101 CACTGTGGCT CGCAGGTGTA TGTGTGAAG ACATCATTTT CCCCACCG
 10151 TCTGTGTGTG TGAGAGACA ACACCAAAAT CTTTCTCTTA GCAAAAGCCA
 10201 CAGCCAGCGT TTTTAGTGCT GACATTTTAT TTTCTGTCTC TCCAGCTGCT

10251 TACATTTTTC AAAACAGTT TTGAGTCCTG TATGGAAGC TCAATTGCTG
 10301 CACACCACAG GATGTGTTC ATGAAGCCAT CCCAGACCA ACTGTGCACA
 10351 AAGAAGCTAA GAGAAAATGC TGCCTTGCC CTGCATATA TGAGCCACAC
 10401 AGGGCCGGGG CGGGGGGCG GGGCGCAGGT AGAGGCGTGG GGGAGAAGGA
 10451 TTCACACCTG AGGTGCAAGA AGAGAAAGGA AGGCCAGAGG AATCTTTCAT
 10501 TGAAGACAGA TTGTTTGAGG ACAAGCAGCT CCTGTGAAGA GGTGCCACG
 10551 ATCCTCTGCT ATTTTAACTG GGCAATGAAT CAGCATGCC CACCTGCAGA
 10601 GCTCTGTCAA GTCTTTGCC ACCTGCTCA ACTTGCAAGT CGCTGTGTCC
 10651 ATCTGCAGCC GACTGTCTT TCCATCATCC ATCATCCGAC ACATGAATGC
 10701 AGCTGCTCTG ACAGTTTAC AAGCCAGACA GAACCCCTCT CAGGAAGGC
 10751 CCTCTCTGAT ACCTGCTCC TAAGTCAGTT TCCTCAGGG CAGATGAAA
 10801 CAGCTGTGCT CATTTGTTGG GGTGATCAT CTCTCCAGC AGAGCGGTA
 10851 GTGTTGTGAG AAGCTGGCC TCCGACCCAC CTCCTCTGT CTATGACCT
 10901 CCAGCCTCCT TTCCCTTGC TGTGGAATGT GGACTGTAA CCCTCTCATG
 10951 ACCAGACGAC TGCTTCTTG CAATGGACTT GGGAGAGAGC AGTCTGTATG
 11001 CTGGGTTC TTGACAGGT AGGATGTATG CTATAGCCC CACTGCTG

【 図 4 】

MQLPLALCLVCLIVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATHEIPELGEYPEPPPELENNKTMNR
 AENGGRPPHPHFETKDVSEYSRELHFTRYVTDGPCRSAPVTELVCSGQCGPARLLPN
 AIGRGKWWRPSPDFRCIPDRYRAQRVQLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHN
 QSEKDFGTEAARPKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

【 図 5 】

プライマー名	ヌクレオチド配列	アニーリング温度
OSTV3UT-R	TCTGTTTGTTTTTCATCTTTGGCTGTC	74°C
OSTV3UT-F	ACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCC	74°C
OSTVint-R1	CACTGGCCGGAGCACACAGCTC	70°C
OSTVint-F1	ACCTTGGCCGACAAAGTGTGGC	70°C
OSTVint-R3	CTGAGCTCTGACCCAAAACC	62°C
OSTVint-F3	CACCTTGCTGGACTCCAC	62°C
OSTVint-R4	GGCACTTCTCTGACAGATCATG	68°C
OSTVint-F4	CAGGGAGCTGGCACTGAAGG	68°C
OSTVint-R5	CCTCCAGGGCTGGACTCAGC	72°C
OSTVint-F5	GAAGAATGGCTCGCTGCTCGAGC	74°C
OSTVex1-R	GCTCTCACCAGGCTCTGTTC	68°C
OSTVex1-F	GGGAGGGTTTGCTCTGAGCAC	68°C
OSTV5UT-R	GGACAGGCTGGGCAGGGCT	70°C
OSTV5UT-F	GAATCCTGCCCTCTCTCCCAAGC	70°C
OSTV3gen-F1	AAGAGTCTATTATGGCTGAC	58°C
OSTV3gen-R1	TCCTGCAGGCTTTCATATGT	58°C
OSTV3gen-F2	GTTTTAAACAGAAGCACATGAC	60°C
OSTV3gen-R2	GAGTGATACAATGAGAACAGC	60°C
OSTV5UT-R	GGACAGGCTGGGCAGGGCT	70°C
OSTV5UT-F	GAATCCTGCCCTCTCTCCCAAGC	70°C
OSTVprom-R1	CTCTTGGTATTCTCTGGAAGG	62°C
OSTVprom-F1	GCCTCTTACAGGAGCTGC	62°C
OSTVprom-R2	AGGATTACACCTGAGGTGC	62°C
OSTVprom-F2	ATAAGCATCCATCTACCTGC	62°C

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/98491 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, A61P 19/08

(21) International Application Number: PCT/EP01/06795

(22) International Filing Date: 15 June 2001 (15.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00112867.7 19 June 2000 (19.06.2000) EP

(71) Applicants (for all designated States except US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH], 124 Grenzachstrasse, CH-4070 Basle (CH). UNIVERSITAIRE INSTELLING ANTWERPEN (U.I.A.) [BE/BE], Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BALEMANS, Wendy [BE/BE], 30 Prins Boudewijnlaan bus 3, B-2610 Antwerpen (Wilrijk) (BE). EBELING, Martin [DE/DE], 1 Heideggerstrasse, 79639 Grenzach-Wyhlen (DE). FOERNZLER, Dorothee [DE/CH], 4 Rathausgasse, CH-5600 Lenzburg (CH). PATEL, Neela [US/US], 512 Old La Honda Road, Woodside, CA 94062 (US). VAN HUL, Wim [BE/BE], 2 Heesterweg, B-3191 Hever (BE). VICKERY, Brian, Henry [GB/US], 27977 Via Ventana, Los Altos Hills, CA 94022 (US).

(74) Common Representative: WITTE, Hubert, 124 Grenzachstrasse, CH-4070 Basle (CH).

(81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,

[Continued on next page]

(54) Title: OSTEOLEVIN GENE POLYMORPHISMS

Primer name	Nucleotide sequence	Annealing temperature
OSTV3UT-R	TCTGTTTGTCTTTTCATCTTGGCTGTC	74°C
OSTV3UT-F	ACCTTCAGGGGCTGAGGAATCC	74°C
OSTVint-R1	CACCTGGCGGAGACACACAGCTC	70°C
OSTVint-F1	AGCCTGGCGGACACAGCTGGC	70°C
OSTVint-R3	CTGAGCTCTGACCCMAAACC	62°C
OSTVint-F3	CAGCTTGTCTGGACTCCAC	62°C
OSTVint-R4	GGCAGCTTCTCTGAGATCATG	68°C
OSTVint-F4	CAGGGAGCTGGCACTTGAAGG	68°C
OSTVint-R5	CCTCAGGGGCTGAGCTCAGC	72°C
OSTVint-F5	GAGAGATGGCTGGCTGGTGGAGG	74°C
OSTVint-R	GCTCTCAGCAGGCTCTGTTCG	68°C
OSTVint-F	GGGAGGGTGTGCTCTGAGCAC	68°C
OSTV3UT-R	GGACAGGCTGGGGAGGGCT	70°C
OSTV3UT-F	GAATCTGGGCTCTCTCCAGG	70°C
OSTV3gen-F1	AAGAGTCTATTATGGCTGAC	58°C
OSTV3gen-R1	TGCTGAGGCTTTCATATGT	58°C
OSTV3gen-F2	GTTTTAAACAGAGCAGATGAC	60°C
OSTV3gen-R2	GAGTGATACATGAGACAGC	60°C
OSTV3UT-R	GGACAGGCTGGGGAGGGCT	70°C
OSTV3UT-F	GAATCTGGGCTCTCTCCAGG	70°C
OSTV3prom-R3	CTCTTGATATTCTGTGGAAGG	62°C
OSTV3prom-F3	GCCTCTTACAGAGCTGC	62°C
OSTV3prom-R2	AGGATTACACCTGAGGTGC	62°C
OSTV3prom-F2	ATAAGCATCATCTACCTGC	62°C

(57) Abstract: The present invention relates generally to genetic polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region. In particular, the present invention relates to genetic polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region that are associated with disorders resulting in either net excess bone formation or insufficient bone formation in humans. Furthermore, isolated nucleic acid molecules encoding human osteolevin are provided. Osteolevin polypeptides are also provided as are vectors, host cells and recombinant methods for producing the same.

WO 01/98491 A2

WO 01/98491 A2



RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 1 -

Osteolevin gene polymorphisms

5 The present invention relates generally to genetic polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region. In particular, the present invention relates to genetic polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region that are associated with disorders resulting in either net excess bone formation or insufficient bone formation in humans.

10 Over 2000 human pathological syndromes are known to result from DNA polymorphisms including insertions, deletions, duplications and nucleotide substitutions. Finding genetic polymorphisms in individuals and following these variations in families provides a means to confirm clinical diagnoses and to diagnose both predispositions and disease states in carriers, as well as preclinical and subclinical affected individuals. Counselling based upon accurate diagnoses
15 allows patients to make informed decisions about potential parenting, ongoing pregnancy, and early intervention in affected individuals.

Polymorphisms associated with pathological syndromes are highly variable and, consequently, can be difficult to identify. Because multiple alleles within genes are common, one must distinguish disease-related alleles from neutral (non-disease-related) polymorphisms. Most alleles are neutral polymorphisms that produce indistinguishable, normally active gene products or express normally variable characteristics like eye color. In contrast, some polymorphic alleles are associated with clinical diseases such as sickle cell anemia. Moreover, the structure
20 of disease-related polymorphisms are highly variable and may result from a single point mutation such as occurs in sickle cell anemia, or from the expansion of nucleotide repeats as occurs in fragile X syndrome and Huntington's chorea. Additionally, some polymorphic alleles may be associated with a phenotype which is manifested as a particular response to treatment with drug(s).

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 2 -

Once a polymorphism or region of interest is identified, a wide variety of technologies exist which may be employed to diagnose a disease or pre-disposition to the disease. Traditionally, the diagnosis of such syndromes relied upon enzyme activity testing, statistical analysis, or invasive diagnostic procedures. More recently, advances in DNA and related technologies including restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, the polymerase chain reaction (PCR), and monoclonal or polyclonal antibody based assays provide rapid and highly accurate methods to screen for the presence of polymorphisms associated with heritable pathologies.

Genetic variants may be involved in a number of genetic disorders including pathologies associated with bone formation disorders such as Van Buchem's disease. Van Buchem disease (Hyperostosis Corticalis Generalisata; OMIM 239100) and sclerosteosis (OMIM 269500) are two autosomal recessive conditions belonging to the group of endosteal hyperostoses and are both characterized by a generalized hyperostosis most pronounced in the skull (both the calvarium and the skull base) and the mandible. In addition the ribs, clavicle and the diaphyses of the long bones are sclerotic. Clinical complications include facial nerve palsy, sensorineural hearing loss and sometimes visual problems. Differential diagnosis between Van Buchem disease and sclerosteosis is mainly based on the presence of syndactyly and gigantism in sclerosteosis. Sclerosteosis also has in most cases a more severe phenotype. Genetic localization of the Van Buchem's disease gene in a Dutch family and the sclerosteosis disease gene in a Brazilian and an American family led to the assignment of both disease genes to the same region on chromosome 17q12-q21. The co-localization of both conditions to the same linkage interval supports the hypothesis that Van Buchem disease and sclerosteosis are caused by mutations in the same gene.

The identification and characterization of specific polymorphisms associated with heritable disorders resulting in either net excess bone formation or insufficient bone formation, such as osteoporosis and/or sclerosing diseases, is necessary for the design of informative diagnostic assays. By identifying specific regions in the human genome which contain disease related polymorphisms, statistical analysis of the prevalence and penetrance of the syndrome is possible. Further, as different statistical formulas are utilized for the assessment of autosomal recessive, autosomal dominant, and X-linked genetic diseases, the identification of the

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 3 -

chromosomal location of the polymorphism is a crucial factor in the assessment of pedigree-related risk analysis. Such information allows accurate risk assessments to take into account 1) the number of different alleles at each gene locus, 2) the relative frequency of each allele in the Population (the most informative have more than one common allele), and 3) whether alleles are distributed randomly throughout the Population. As technologies for assessing the presence or absence of a specific polymorphism or polymorphic region are well developed, the primary limitation for diagnostic assays is the lack of information regarding polymorphisms associated with different pathologies.

What is needed in the art is the identification of regions in the human genome containing disease-associated polymorphisms. The identification of such regions allows for the design of informative assays and diagnostic tests for susceptibility factors associated with the occurrence of such syndromes. Informative assays which can detect the disease associated polymorphism will allow the accurate diagnosis of affected individuals and provide these individuals and health care professionals with the knowledge necessary to make informed decisions.

The present invention is directed to the identification of polymorphisms in the osteolevin gene (also referred to as SOST gene) which is located in the Van Buchem-sclerosteosis disease region of human chromosome 17, a region that is associated with abnormal bone formation. Polymorphisms in this region were identified by sequencing a large number of samples of DNAs from a diverse population of different ethnic origin. The present invention also relates to the use of the polymorphic regions disclosed herein for the diagnosis and assessment of osteoporosis or sclerosis. Since such pathologies can now be detected earlier (i.e., before overt symptoms appear) and more definitively, better treatment options will be available for those individuals identified as having disease-associated polymorphisms.

In one embodiment, the invention provides isolated nucleic acid molecules that encode osteolevin region polymorphisms. Isolated nucleic acid can include osteolevin region polymorphisms having the sequences identified above or having sequences that are complementary to these nucleic acid sequences,

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 4 -

preferentially hybridize to them and remain stably bound to them under at least moderate, and optionally, under high stringency conditions.

5 In another embodiment, the invention provides a construct where the polymorphic osteolevin region sequences have been inserted in a vector to make a recombinant plasmid. A recombinant cell comprising such a plasmid inserted into a host cell is also provided.

10 In another embodiment, the present invention provides a recombinant osteolevin polypeptide and its variants due to the osteolevin region polymorphisms as well as isolated nucleic acid molecules encoding the osteolevin polypeptide and its variants.

15 In yet another embodiment, the invention provides antibodies capable of specifically binding a polymorphic epitope on a polypeptide encoded by the osteolevin gene and the region polymorphisms. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody. In yet another embodiment, the invention provides animals having osteolevin region transgenes.

20 In other embodiments, the invention provides methods for screening for osteolevin region polymorphisms. In one embodiment, the invention provides a method for screening for a polymorphism associated with abnormal bone formation in a subject. The subject's DNA is analyzed for the presence or absence of the osteolevin polymorphism. The polymorphism which is an insertion, deletion, duplication, or base substitution is associated with abnormal bone formation. In a specific embodiment of this method the polymorphism may be one or several of the osteolevin polymorphisms disclosed herein. In a more specific embodiment of the invention, the presence of a polymorphism in the osteolevin
25 nucleic acid sequence is determined by a differential nucleic acid analysis technique such as restriction fragment length polymorphism analysis, direct mass-analysis of PCR products using mass spectrometry, direct analysis of invasive cleavage products, extension-based techniques such as ARMSTM (amplification refractory mutation system), ALEXTM (amplification refractory mutation system linear extension) and COPS (competitive oligonucleotide priming system), OLA (oligonucleotide ligation assay), Invader assay, direct sequence analysis or
30 polymerase chain reaction analysis.

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 5 -

In another embodiment, the invention provides a method for identifying a patient's susceptibility to pathologies associated with abnormal bone formation by determining the patient's osteolevin polymorphism pattern, comparing it to the wild type osteolevin pattern and then looking for differences indicative of a susceptibility to pathologies associated with abnormal bone formation. In a related embodiment, the invention provides a method of identifying a polymorphism associated with abnormal bone formation by comparing a osteolevin gene sequence isolated from a subject with abnormal bone formation to a known wild type osteolevin gene sequence and identifying recurrent polymorphisms. In specific embodiments of these methods, the presence of a polymorphism in osteolevin nucleic acid sequences is determined by a differential nucleic acid analysis technique such as restriction fragment length polymorphism analysis, direct mass-analysis of PCR products using mass spectrometry, direct analysis of invasive cleavage products, direct sequence analysis, extension based techniques such as ARMSTM (amplification refractory mutation system), ALEXTM (amplification refractory mutation system linear extension) and COPS (competitive oligonucleotide priming system), OLA (oligonucleotide ligation assay), Invader Assay, DNA chip analysis or polymerase chain reaction analysis.

Other embodiments of the invention include kits and articles of manufacture for use in the methods disclosed herein as well as assays for assessing the effects of candidate agents on the activity of genes from the Van Buchem-sclerosteosis disease region.

Figure 1A shows a schematic representation of the genomic organization of the osteolevin gene.

Figure 1B shows the nucleotide sequence of osteolevin cDNA (SEQ ID NO. 1)

Figure 2 shows a PCR analysis of osteolevin mRNA expression in various human tissues. The transcript appears widely expressed as demonstrated by observed signals in human cDNA from heart, kidney (strongest expression), pancreas, placenta, prostate, spleen and peripheral blood lymphocytes. Expression was also demonstrated in human osteoblasts.

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 6 -

Figure 3 shows the genomic osteolevin region (SEQ ID NO. 3). Sequence is derived from a HTS large insert clone (EMBL ACCESSION NO. AC003098). Osteolevin sequence is located on the complementary strand. Therefore, reverse complement DNA sequence of genomic osteolevin is shown below.

5 Figure 4 shows the amino acid sequence of the osteolevin polypeptide (SEQ ID NO. 2).

Figure 5 shows the primers used to amplify the osteolevin regions prior to the screen for polymorphisms by DNA sequencing (SEQ ID No. 4 to 27).

10 The term "abnormal bone formation" when used herein is broadly defined as net increased or decreased bone formation.

The term "polymorphisms" is broadly defined to include all variations that are known to occur in nucleic and amino acid sequences including insertions, deletions, substitutions and repetitive sequences including duplications.

15 The term "osteolevin region" is defined as the area of chromosome 17 which contains the nucleic acid sequences shown in Figure 3 (SEQ ID NO. 3).

The term "wild-type sequence" when used herein refers to a sequence in the osteolevin region which does not contain polymorphisms.

20 "Variant" means a variant as defined below having at least about 80% amino acid sequence identity with the deduced osteolevin polypeptide shown in Figure 4 (SEQ ID NO. 2) including osteolevin nucleotide polymorphisms that occur with a frequency of at least 1% in a certain population. Such variants include polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, deleted, or changed anywhere within the sequence, including the N- or C-termini. Ordinarily, an osteolevin variant will have at least about 80% or 85% amino acid sequence identity with the corresponding osteolevin sequence of Figure 4 (SEQ ID NO. 2), more preferably at least about 90% amino acid sequence identity. Most preferably an osteolevin variant will have at least about 95% amino acid sequence identity with the corresponding osteolevin sequence of Figure 4 (SEQ ID NO. 2).

25

“Percent (%) amino acid sequence identity” with respect to the amino acid sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the osteolevin sequences, after aligning the sequences in the same reading frame and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Conservative substitutions are not considered to be identical. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST software (see e.g. Altschul et al., J. Mol. Biol., 5; 215(3): 403-410 (1990)). Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. “Percent (%) nucleic acid sequence identity” with respect to the osteolevin sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in the osteolevin sequences, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST software (see e.g. Altschul et al., J. Mol. Biol., 5; 215(3): 403-410 (1990)). Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared.

“Isolated”, when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified to a degree sufficient to obtain N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or to homogeneity as assessed by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide in situ within recombinant cells, since at least one component of the osteolevin natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 8 -

prepared by at least one purification step (referred to herein as an "isolated and purified polypeptide").

5 An "isolated" osteolevin nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the osteolevin nucleic acid. An isolated osteolevin nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated osteolevin nucleic acid molecules therefore are distinguished from the osteolevin nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated osteolevin nucleic acid molecule includes
10 osteolevin nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express osteolevin where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally,
20 "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking may be accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers may be used in accordance with conventional practice.
25

"Polynucleotide" and "nucleic acid" refer to single or double-stranded molecules which may be DNA, comprised of the nucleotide bases A, T, C and G, or RNA, comprised of the bases A, U (substitutes for T), C, and G. The polynucleotide may represent a coding strand or its complement. Polynucleotide molecules may be
30 identical in sequence to the sequence which is naturally occurring or may include alternative codons which encode the same amino acid as that which is found in the naturally occurring sequence (See, Lewin "Genes V" Oxford University Press Chapter 7, pp. 171-174 (1994). Furthermore, polynucleotide molecules may

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 9 -

include codons which represent conservative substitutions of amino acids as described. The polynucleotide may represent genomic DNA or cDNA.

5 "Polypeptide" refers to a molecule comprised of amino acids which correspond to those encoded by a polynucleotide sequence. The polypeptide may include conservative substitutions where the naturally occurring amino acid is replaced by one having similar properties, where such conservative substitutions do not alter the function of the polypeptide (See, Lewin "Genes V" Oxford University Press Chapter 1, pp.: 9-13 (1994).

10 The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers single anti-osteolevin monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies) and anti-osteolevin antibody compositions with polypepitopic specificity. The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for
15 possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

The present invention relates to a method for screening for osteolevin polymorphism in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject.

20 Polymorphisms in the osteolevin gene were identified a) by sequencing sclerosteosis patients and comparing the sequence to controls (see Example 2b) and b) by PCR-amplification of 400-600 base pair overlapping fragments (covering the whole genomic region of osteolevin as defined by nucleotide position 4'000 – 11'000 in EMBL ACCESSION NO. AC003098, Release 62.0) in the DNA of 47
25 unrelated individuals of 5 different ethnic origin (obtained from Coriell Institute, Hamden, New Jersey). Fragments have been sequenced in these 47 samples with a forward and reverse primer, polymorphisms were detected by using the PolyPhred software (licensed from University of Washington) and allele frequencies for the variants were established.

30 Three different and independent mutations could exclusively be detected in sclerosteosis patients and not in more than 150 control individuals;

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 10 -

- 5 A) G to A at position 6136 defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098, resulting in a change from Arg(CGA) to a stop codon (TGA). This mutation was found in an homozygous status in two sclerosteosis patients from an American family. Patients were previously described in Balemans et al. (Am. J. Hum. Genet. 64:1661-1669; 1999). One individual from this family, previously identified as disease carrier based on haplotype analysis, was proven to carry the mutation heterozygously.
- 10 B) C to T at position 6140 defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098, resulting in a change from Trp (TGG) to a stop codon (TGA). This mutation was found in an homozygous status in two sclerosteosis patients from a Brazilian family. Patients were previously described in Balemans et al. (Am. J. Hum. Genet. 64:1661-1669; 1999). Six individuals from this family, previously identified as disease carriers based on haplotype analysis, were proven to carry the mutation heterozygously.
- 15 C) T to A at position 9047 defined by the position in EMBL ACCESSION NO.AC003098, resulting in a splice mutation at the begin of intron 1. This mutation was homozygously found in one Italian sclerosteosis patient previously described in Tacconi et al. (Clinical Genetics, 53:497-501; 1998).

20 Additionally, a number of genetic variants in the osteolevin region have been identified in a standard population panel. 11 base pair substitutions and 1 insertion were detected in 5' flanking and promoter regions:

Polymorphism	Position*
C to T	10877
A to G	10876
T to C	10817
C to A	10687
TCC insertion between	10668 and 10669
C to G	10424
C to G	10342
A to G	10020

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 11 -

T to C	9783
C to T	9723
C to T	9646
G to A	9616

*defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098

One amino-acid changing polymorphism was found in exon 1:

Polymorphism	Position*	Effect
C to T	9242	Changes Valin at position 10 to Isoleucine

*defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098

5 polymorphisms were found in intron 1:

Polymorphism	Position*
A to G	8375
C to T	7894
G to T	7489
T to G	6358

5 *defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098

4 polymorphisms were detected in 3' flanking region:

Polymorphism	Position*
C to T	5308
G to A	5004
C to T	4866
G to C	4475

*defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098

The sequence for EMBL ACCESSION NO. AC003098 is derived from a large insert and is the reverse complement to the 5' to 3' osteolevin DNA sequence. Consequently the genetic polymorphisms for the osteolevin cDNA are the reverse complement of the variants described above.

10

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 12 -

The Van Buchem-sclerosteosis disease interval was previously mapped to an interval of 0.7 cM on human chromosome 17 (Balemans et al., Am. J. Hum. Genet. 64:1661-1669; 1999). Within this interval, a gene encoding osteolevin was identified in silico by analysis of the genomic sequence using GenScan (Burge & Karlin, J. Mol. Biol. 268: 78-94; 1997). With GenScan's default parameter settings, a gene structure with four exons is predicted, of which the two internal ones are assigned lower quality scores than the other two. Homology studies using human protein sequences remotely related to osteolevin revealed that the two internal exons are wrongly predicted by GenScan. Subsequently, comparison to the mouse syntenic region on chromosome 11 (EMBL: AC012296) by dot-plot analysis ("dotter" program: Sonnhammer & Durbin, Gene 167: GC1-10; 1995) identified the mouse homologue and unambiguously established the two-exon gene structure.

The genomic organization of the osteolevin gene is illustrated in Figure 1B. The gene consist of 2 exons, 220 bp and 421 bp in size beginning at bp 9269 and ending at bp 5870 of the sequence shown in Figure 3 . Both exons obey the GT-AG splicing rule. The first in frame ATG occurs in exon 1 (bp 9269) while the TAG stop codon occurs in exon 2 (bp5870) for the putative 213 amino acid protein.

The present invention provides compositions of matter and diagnostic and prognostic methods related to the discovery that polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region may be associated with abnormal bone formation. According to the methods of the present invention, alteration of wild-type osteolevin sequences is detected. "Alteration of wild-type sequences" encompasses all forms of polymorphisms including deletions, insertions and point mutations in the coding and noncoding regions. Polymorphisms may occur anywhere in this region of chromosome 17 including coding and noncoding regions.

A key component of this invention is the delineation of a specific chromosomal region having polymorphisms associated with abnormal bone formation as clearly illustrated by the fact that the above described two nonsense mutations and one splice site mutation in the osteolevin gene all result in sclerosteosis, a condition with highly increased bone density as the major hallmark.

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 13 -

The present invention therefore provides methods of identifying novel osteolevin polymorphisms which are correlated with a predisposition for abnormal bone formation by determining one or more sequences in the osteolevin region from individuals known to have abnormal bone formation and then comparing these sequences to that of known osteolevin region wild type sequences.

The presence of the identified osteolevin polymorphisms associated with abnormal bone formation may be ascertained by testing a biological sample from an individual. Biological samples are those samples of materials which have cells containing nucleic acid sequences. Biological samples may be obtained from a variety of sources including blood, tissue, and cell lines. Most simply, blood can be drawn and DNA extracted from the cells of the blood. In addition, prenatal diagnosis can be accomplished by testing fetal cells, placental cells or amniotic cells. Alteration of wild-type osteolevin sequences, whether, for example, by substitution, insertion or deletion, can be detected by any of a variety of means known in the art including the illustrative protocols discussed herein. Further, once a polymorphism is identified, its association with a pathology may be assessed by a variety of statistical and pedigree analyses that are well known in the art. See e.g. Handbook of Human Genetic Linkage (Joseph D. Terwilliger & Jurg Ott eds., 1st ed. 1994); Fundamentals of Biostatistics (Bernard Rosner ed., 1st ed., 1982). For example, evidence that polymorphisms in osteolevin region are associated with abnormal bone formation can be obtained by finding sequences in DNA extracted from affected kindred members that may encode abnormal osteolevin gene products or result in abnormal levels of the gene products. Such abnormal bone formation susceptibility alleles will co-segregate with the disease in large kindreds. They will also be present at a much higher frequency in non-kindred individuals with abnormal bone formation than in individuals in the general population. Moreover, association studies with cases and controls from unrelated individuals may be performed for similar purposes.

The present invention provides isolated nucleic acid molecules comprising a polynucleotide encoding the osteolevin polypeptide having the amino acid sequence shown in Figure 4 (SEQ ID NO. 2). The nucleotide sequence determined by sequencing the osteolevin cDNA (Figure 1B; SEQ ID NO. 1) contains an open reading frame encoding a polypeptide of 213 amino acid residues

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 14 -

(in bold), including an initiation codon (ATG) at positions 13-15 (cursive type, underlined), with a leader sequence of about 19 amino acid residues, and a predicted molecular weight of about 24 kDa. The stop codon (TAG) appears in cursive type, underlined. The amino acid sequence of the mature osteolevin polypeptide is shown in Figure 4, amino acid residues 1 to 213 (SEQ ID NO. 2).

Thus, in one embodiment the present invention provides isolated nucleic acid molecules encoding osteolevin selected from the group consisting of a) the nucleic acid molecule or a complement of the nucleic acid molecule set forth in SEQ ID No. 1, b) a nucleic acid molecule or a complement of a nucleic acid molecule encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO. 2, c) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to a nucleic acid molecule of above a) or b) and remain stably bound to them under at least moderate, and optionally, under high stringency conditions.

Further embodiments of the present invention include isolated nucleic acid molecules that comprise a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 60% identical, preferably at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to the nucleic acid molecule set forth in SEQ ID NO. 1.

In another embodiment, the invention provides a recombinant osteolevin polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of a) the amino acid sequence encoded by anyone of the above nucleic acid molecules, b) an amino acid sequence which is at least 80% identical, preferably at least 90% identical, still more preferably at least 95% identical with the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 2, c) the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 2.

The polypeptides of the present invention also include polypeptides having an amino acid sequence with at least 90% similarity, preferably at least 95% similarity to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 2, as well as polypeptides having an amino acid sequence at least 60% identical, preferably at least 80%, 85%, 90% or 95%, more preferably at least 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 2.

Furthermore, the present invention provides isolated nucleotide sequences from the osteolevin region having polymorphisms that may be associated with abnormal bone formation. The invention further provides variations and

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 15 -

modifications of these sequences and molecules that they encode using methods that are well known in the art such as site-directed PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), cassette mutagenesis (Wells et al., Gene, 34:315 (1985)), restriction selection mutagenesis (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the variant DNA. Covalent modifications of the sequences disclosed herein are included within the scope of this invention. See, e.g., Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Units 10, 11 and 14, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, § 12, Tom Maniatis et al. eds., 2nd ed. 1989.

The description below relates primarily to production of the sequences of the invention by culturing cells transformed or transfected with a vector containing polymorphic sequences of the osteolevin region. It is contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare these molecules. For instance polymorphic sequences or portions thereof may be produced by direct oligomer or peptide synthesis using solid-phase techniques (see, e.g., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)). In vitro protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) and following the manufacturer's instructions. Various portions of the osteolevin sequences may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods.

DNA having polymorphic sequences of the present invention may be obtained from genomic or cDNA libraries prepared from tissue from individuals having these sequences or by oligonucleotide synthesis as outlined above. Libraries can be screened with probes (such as oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the sequence of interest or the protein encoded by it. Illustrative libraries include λ TriplEx human kidney cDNA library (Clontech Laboratories, Inc.) and λ TriplEx human spleen cDNA library (Clontech Laboratories, Inc.). Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook et al.,

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 16 -

Molecular Cloning. A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate a gene encoded by the osteolevin region is to use PCR methodology [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

The Examples below describe techniques for screening DNA libraries. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ³²P-labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook et al., *supra*.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined through sequence alignment using computer software programs that employ various algorithms to measure homology.

Nucleic acid having protein coding sequences may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook et al., *supra*, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

Large amounts of the polynucleotides of the present invention may be produced by replication in a suitable host cell using any of a variety of techniques that are well known in the art. Natural or synthetic polynucleotide fragments coding for a desired fragment will be incorporated into recombinant polynucleotide constructs, usually DNA constructs, capable of introduction into and replication in a prokaryotic or eukaryotic cell. Usually the polynucleotide constructs will be suitable for replication in a unicellular host, such as yeast or

bacteria, but may also be intended for introduction to (with and without integration within the genome) cultured mammalian or plant or other eukaryotic cell lines. The purification of nucleic acids produced by the methods of the present invention are described, e.g., in Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992.

5 Polynucleotide constructs prepared for introduction into a prokaryotic or eukaryotic host may comprise a replication system recognized by the host, including the intended polynucleotide fragment encoding the desired polypeptide, and will preferably also include transcription and translational initiation regulatory sequences operably linked to the polypeptide encoding segment. Expression vectors
10 may include, for example, an origin of replication or autonomously replicating sequence (ARS) and expression control sequences, a promoter, an enhancer and necessary processing information sites, such as ribosome-binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, transcriptional terminator sequences, and mRNA stabilizing sequences. Such vectors may be prepared by means of standard
15 recombinant techniques well known in the art and discussed, for example, in Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992. An appropriate promoter and other necessary vector sequences will be selected so as to be functional in the host and may include, when appropriate, those naturally associated with the osteolevin region. Examples of workable combinations of cell lines and expression vectors are
20 described in Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992. Many useful vectors are known in the art and may be obtained from such vendors as Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, Invitrogen, Pharmingen and others. Promoters such as the trp, lac and phage promoters, tRNA promoters and glycolytic enzyme promoters may be used in prokaryotic hosts. Useful yeast promoters include
25 promoter regions for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes such as enolase or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enzymes responsible for maltose and galactose utilization, and others. Vectors and promoters suitable for use in yeast expression are further described in Hitzeman et al., EP 73,675A. Appropriate non-native mammalian promoters might include the
30 early and late promoters from SV40 or promoters derived from murine Molony leukemia virus, mouse tumor virus, avian sarcoma viruses, adenovirus II, bovine papilloma virus or polyoma. In addition, the construct may be joined to an amplifiable gene (e.g., DHFR) so that multiple copies of the gene may be made. For appropriate enhancer and other expression control sequences, see also Enhancers
35 and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor,

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 18 -

N.Y. (1983). Sequences encoding strong secretion signal peptides may also be operably linked to the sequence of the mature osteolevin protein, in which the osteolevin signal peptide sequence has been eliminated. For example, the signal sequence for gp67 may be included in a baculoviral vector to promote the secretion of the polypeptide from insect cells. Such vectors are commercially available from Pharmingen and other sources. While such expression vectors may replicate autonomously, they may also replicate by being inserted into the genome of the host cell, by methods well known in the art.

Expression and cloning vectors will likely contain a selectable marker, a gene encoding a protein necessary for survival or growth of a host cell transformed with the vector. The presence of this gene ensures growth of only those host cells which express the inserts. Typical selection genes encode proteins that a) confer resistance to antibiotics or other toxic substances, e.g. ampicillin, neomycin, methotrexate, etc., b) complement auxotrophic deficiencies, or c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*. The choice of the proper selectable marker will depend on the host cell, and appropriate markers for different hosts are well known in the art.

The vectors containing the nucleic acids of interest can be transcribed in vitro, and the resulting RNA introduced into the host cell by well-known methods, e.g., by injection, or the vectors can be introduced directly into host cells by methods well known in the art, which vary depending on the type of cellular host, including electroporation; transfection employing calcium chloride, rubidium chloride calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; infection (where the vector is an infectious agent, such as a retroviral genome); and other methods. See generally, Sambrook et al., 1989 and Ausubel et al., 1992. The introduction of the polynucleotides into the host cell by any method known in the art, including, inter alia, those described above, will be referred to herein as "transformation." The cells into which have been introduced nucleic acids described above are meant to also include the progeny of such cells.

Large quantities of the nucleic acids and polypeptides of the present invention may be prepared by expressing osteolevin nucleic acids or portions thereof in vectors or other expression vehicles in compatible prokaryotic or eukaryotic host cells. The most commonly used prokaryotic hosts are strains of

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 19 -

Escherichia coli, although other prokaryotes, such as Bacillus subtilis or Pseudomonas may also be used. Mammalian or other eukaryotic host cells, such as those of yeast, filamentous fungi, plant, insect, or amphibian or avian species, may also be useful for production of the proteins of the present invention. Propagation of mammalian cells in culture is per se well known. Examples of commonly used mammalian host cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, and WI38, BHK, and COS cell lines, although it will be appreciated by the skilled practitioner that other cell lines may be appropriate, e.g., to provide higher expression, desirable glycosylation patterns, or other features.

Clones are selected by using markers depending on the mode of the vector construction. The marker may be on the same or a different DNA molecule, preferably the same DNA molecule. In prokaryotic hosts, the transformant may be selected, e.g., by resistance to ampicillin, tetracycline or other antibiotics. Production of a particular product based on temperature sensitivity may also serve as an appropriate marker.

Prokaryotic or eukaryotic cells transformed with the polynucleotides of the present invention will be useful not only for the production of the nucleic acids and polypeptides of the present invention, but also, for example, in studying the characteristics of osteolevin polypeptides. The probes and primers based on sequences disclosed herein can be used to identify homologous sequences and proteins in other species such as the murine osteolevin gene. Furthermore, homologous sequences from other species can be identified in silico by querying databases of such species' genomic or cDNA sequence with human osteolevin sequence. The species-specific clone can then be obtained using polymerase chain reaction (PCR). These gene sequences and proteins are used in the diagnostic/prognostic, therapeutic and drug screening methods described herein for the species from which they have been isolated.

Nucleic acid sequences having polymorphisms associated with abnormal bone formation can be detected by hybridization with a polynucleotide probe which forms a stable hybrid with that of the target sequence, under stringent to moderately stringent hybridization and wash conditions. The present invention allows for the design of probes which preferentially hybridize to polymorphic regions. The design of probes which preferentially target specific sequences and hybridization conditions for their use is well known in the art. See e.g. Current

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 20 -

Protocols In Molecular Biology, Volumes I-III, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995. For example, if it is expected that the probes will be perfectly complementary to the target sequence, stringent conditions will be used. Hybridization stringency may be lessened if some mismatching is expected, for example, if variants are expected with the result that the probe will not be completely complementary. Conditions are chosen which rule out nonspecific/adventitious bindings in order to minimize noise.

Probes for polymorphisms in the osteolevin region may be of any suitable length, which are proximal to or span all or a portion of the polymorphism, and which allow preferential hybridization to the region. If the target sequence contains a sequence identical to that of the probe, the probes may be short, e.g., in the range of about 8-30 base pairs, since the hybrid will be relatively stable under even stringent conditions. If some degree of mismatch is expected with the probe, i.e., if it is suspected that the probe will hybridize to a variant region, a longer probe may be employed which hybridizes to the target sequence with the requisite specificity.

The probes can include an isolated polynucleotide attached to a label or reporter molecule and may be used to isolate other polynucleotide sequences, having sequence similarity or being proximal to the sequences of interest by standard methods. For techniques for preparing and labeling probes see, e.g., Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1992. Other similar polynucleotides may be selected by using homologous polynucleotides. Alternatively, polynucleotides encoding these or similar polypeptides may be synthesized or selected by use of the redundancy in the genetic code. In expressed sequences, various codon substitutions may be introduced, e.g., by silent changes (thereby producing various restriction sites) or to optimize expression for a particular system. Polymorphisms may be introduced to modify the properties of the polypeptide, perhaps to change the polypeptide degradation or turnover rate. Probes comprising synthetic oligonucleotides or other polynucleotides of the present invention may be derived from naturally occurring or recombinant single- or double-stranded polynucleotides, or be chemically synthesized. Probes may also be labeled by nick translation, Klenow fill-in reaction, or other methods known in the art.

The design of probes with the appropriate size and sequence for preferential binding to target specific sequences as well as hybridization conditions

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 21 -

for their use is well known in the art. See, e.g., Current Protocols In Molecular Biology, Volumes 1, units 2, 4, and 6, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995. Portions of polynucleotide sequences having at least about eight nucleotides, usually at least about 15 nucleotides, and fewer than about 6 kb, usually fewer than
5 about 1.0 kb, from a polymorphic sequence are preferred as probes. Also contemplated are probes having a specific portion of a polymorphic sequence. Moreover, probes which are proximal to a polymorphic region may also be used in evaluating nucleic acid samples. In addition to their use in evaluating genomic sequences, the probes may also be used to determine whether mRNA such as that
10 encoding osteolevin is present in a cell or tissue.

In order to detect the presence of a polymorphism associated with abnormal bone formation, a biological sample such as blood is prepared and analyzed for the presence or absence of polymorphic sequences. Results of these
15 tests and interpretive information are returned to the health care provider for communication to the tested individual. Such diagnoses may be performed by diagnostic laboratories, or, alternatively, diagnostic kits are manufactured and sold to health care providers or to private individuals for self-diagnosis.

The identification of the association between polymorphisms in the osteolevin region and abnormal bone formation permits the early presymptomatic screening of individuals to identify those at risk for having pathologies associated with abnormal bone formation. To identify such individuals, the osteolevin region is screened for polymorphisms either directly or after cloning the sequences of interest. There are a number of different methods of the invention which may be
20 employed both to evaluate individuals for potentially pathogenic polymorphisms and to specifically characterize those polymorphisms which are associated with abnormal bone formation. For example, the invention provides a method for screening for a polymorphism associated with abnormal bone formation in an individual. Moreover, the invention also provides a method of identifying a
25 polymorphism associated with abnormal bone formation by comparing a osteolevin sequence isolated from an affected subject to a known wild type osteolevin sequence and identifying recurrent polymorphisms that are associated with abnormal bone formation.
30

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 22 -

As discussed below, samples can be tested for the presence of nucleic acid sequences which are different from normal sequences using any one of a wide variety of differential nucleic acid analysis techniques that are well known in the art. Differential nucleic acid analysis techniques include, but are not limited to:

5 fluorescent in situ hybridization (FISH), direct DNA sequencing, single stranded conformational analysis (SSCP), Southern blotting including restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), the polymerase chain reaction (PCR), polymorphism specific oligonucleotide hybridizations and PCR-SSCP analysis. As discussed below, for sequences coding for expressed molecules and polypeptides,

10 additional techniques may also be utilized. For a review of techniques for evaluating and manipulating nucleic and amino acid sequences, see Current Protocols In Molecular Biology, Volumes I-III, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995.

Alteration of osteolevin mRNA expression can be detected by any

15 techniques known in the art. These include Northern blot analysis, quantitative PCR amplification (TaqMan), and RNase protection. Diminished mRNA expression indicates an alteration of the wild-type gene locus. Alteration of wild-type genes can also be detected by screening for alteration of wild-type osteolevin protein. For example, monoclonal antibodies immunoreactive with specific

20 osteolevin epitopes can be used to screen a tissue. Lack of cognate antigen would indicate a polymorphism. Antibodies specific for products of mutant alleles could also be used to detect mutant gene product. Such immunological assays can be done in any convenient formats known in the art. These include Western blots, immunohistochemical assays and ELISA assays. Any means for detecting an altered

25 protein can be used to detect alteration of wild-type osteolevin. Functional assays, such as protein binding determinations, can be used. In addition, assays can be used which detect the biochemical function of genes in the osteolevin region. Typically, finding an alteration in the biochemical function of a polypeptide encoded by a gene in this region can indicate alteration of a wild-type gene in this

30 region.

Protein localization at the cellular level and subcellular levels can be determined by epitope tagging, a method that utilizes antibodies against guest peptides. Epitope tagging begins with a cloned gene and an antibody that recognizes a known peptide (the epitope). Using recombinant DNA technology, a

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 23 -

sequence of nucleotides encoding the epitope is inserted into the coding region of the cloned gene, and the hybrid gene is introduced into a cell by a method such as transformation. When the hybrid gene is expressed the result is a chimeric protein containing the epitope as a guest peptide. If the epitope is exposed on the surface of the protein, it is available for recognition by the epitope-specific antibody, allowing the investigator to observe the protein within the cell using immunofluorescence or other immunolocalization techniques. Therefore, operably linked sequences which encode peptide tags may be included in the vector. The peptide tags are typically 8-12 amino acids but may be longer. The tags can be recognized by specific antibodies (e.g. the myc epitope) or may bind particular metals (e.g. His6 tag binds nickel columns). The tags facilitate the purification of the osteolevin protein from its source.

A number of methods can be used to directly detect DNA sequence variation. Direct DNA sequencing, either manual sequencing or automated fluorescent sequencing can detect sequence variation. The allele(s) of genes in the osteolevin region in an individual to be tested can be cloned using conventional techniques. For example, a blood sample is obtained from the individual, osteolevin genomic DNA is isolated from the cells in this sample and ligated into an appropriate vector for amplification. The sequences of the clones can then be determined and compared to the normal osteolevin sequences. Techniques involving DNA cloning and sequencing are well known in the art, see e.g. Current Protocols In Molecular Biology, Volume 1, unit 7, Frederick M. Ausubul et al. eds., 1995.

Another approach to detect variations in DNA sequences is the single-stranded conformation polymorphism assay (SSCP) (Orita et al., 1989). This method does not detect all sequence changes, especially if the DNA fragment size is greater than 200 bp, but can be optimized to detect most DNA sequence variation. The reduced detection sensitivity is a disadvantage, but the increased throughput possible with SSCP makes it an attractive, viable alternative to direct sequencing for polymorphism detection on a research basis. The fragments which have shifted mobility on SSCP gels are sequenced to determine the exact nature of the DNA sequence variation. Other approaches based on the detection of mismatches between the two complementary DNA strands include clamped denaturing gel electrophoresis (CDGE) (Sheffield et al., Am. J. Hum. Genet., 49: 699-706 (1991)),

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 24 -

heteroduplex analysis (NA) Mite et al., Genomics 12: 301-306 (1992)) and chemical mismatch cleavage (CMC) (Grompe et al., P.N.A.S. 86: 5855-5892 (1989)). Other methods which might detect these classes of polymorphisms such as a protein truncation assay or the asymmetric assay, detect only specific types of polymorphisms and would not detect missense polymorphisms. A review of currently available methods of detecting DNA sequence variation can be found in a recent review by Grompe et al., Nature Genetics 5: 111-117, (1993) and Landegren et al., Genome Research 8: 769-776, (1998).

A rapid preliminary analysis to detect polymorphisms in DNA sequences can be performed using RFLP, where DNA is cut with one or more restriction enzymes, preferably with a large number of restriction enzymes and analyzed with osteolevin specific probes in a series of Southern blots. Each blot contains a series of normal individuals and a series of cases with abnormal bone formation. Southern blots displaying hybridizing fragments (differing in length from control DNA when probed with sequences near or including known polymorphic loci) indicate a possible polymorphism. Techniques involving RFLP are well known in the art, see, e.g., Current Protocols In Molecular Biology, Volume 1, unit 2, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995.

Restriction fragment length polymorphism analysis is a preferred method of analysis due to its ability to identify uncharacterized polymorphisms. Specifically, by simply using sequences from various regions in osteolevin as probes, the skilled practitioner may evaluate nucleic acid samples for a wide variety of polymorphisms including those which have yet to be identified. Probes in these analyses may include sequences having the illustrative polymorphisms (e.g. such as the T/C promoter polymorphism at position 10877 in the EMBL ACCESSION NO. AC003098) disclosed herein or alternatively, may include proximal sequences identified herein or isolated by chromosomal walking techniques that are well known in the art. See e.g. Ueghara et al., Mamm Genome 1(2): 92-99 (1991).

A particularly preferred method of nucleic acid analysis using polymerase-driven amplification is the polymerase chain reaction (PCR). The polymerase chain reaction and other polymerase-driven amplification assays can achieve over a million-fold increase in copy number through the use of polymerase-driven amplification cycles. Once amplified, the resulting nucleic acid can be analyzed by restriction endonuclease digestion, sequenced or used as a

substrate for DNA probes. When the sequences encompassing a specific polymorphism are known, a variety of PCR primers targeting these sequences may be generated. For example, sequences flanking the polymorphism may be used to amplify those sequences. For a variation of sequence-specific PCR, primers can be used which hybridize at their 3' ends to a particular osteolevin polymorphism. If the particular polymorphism is not present, an amplification product is not observed. Amplification Refractory Polymorphism System (ARMS) can also be used, as disclosed in European Patent Application Publication No. 0332435 and in Newton et al., 1989. Alternatively, polymerase chain reactions (PCRs) can be performed with primer pairs for the 5' region or the exons of the osteolevin gene. PCRs can also be performed with primer pairs based on any sequence of the normal osteolevin region. For example, primer pairs for one of the introns can be prepared and utilized. Finally, PCR can also be performed on the mRNA, following conversion of the mRNA to cDNA by reverse transcription. The amplified products are then analyzed by single stranded conformation polymorphisms (SSCP) using conventional techniques to identify any differences and these are then sequenced and compared to the normal gene sequence.

Primer pairs of the present invention are useful for determination of the nucleotide sequence of a particular osteolevin sequence using PCR. For example, the pairs of single-stranded DNA primers can be annealed to sequences within or surrounding osteolevin sequences on chromosome 17 in order to prime amplifying DNA synthesis of the gene itself. A complete set of these primers allows synthesis of all of the nucleotides of the gene coding sequences, i.e., the exons. The set of primers preferably allows synthesis of both intron and exon sequences. In addition, allele-specific primers can also be used. Such primers anneal only to particular osteolevin mutant alleles, and thus will only amplify a product in the presence of the mutant allele as a template.

In order to facilitate subsequent cloning of amplified sequences, primers may have restriction enzyme site sequences appended to their 5' ends. For example, all nucleotides of the primers can be derived from sequences adjacent to one or more osteolevin polymorphisms, except for the few nucleotides necessary to form a restriction enzyme site. Such enzymes and sites are well known in the art. The primers themselves can be synthesized using techniques which are well known in the art. Generally, the primers can be made using oligonucleotide synthesizing

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 26 -

machines which are commercially available. Given the level of skill in the art, the design of particular primers is well within the skill of the art. See, e.g., *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume II, unit 15, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995.

5 DNA sequences of the osteolevin region which have been amplified by use of PCR may also be screened using allele-specific probes. These probes are nucleic acid oligomers, each of which contains a region of the gene sequence harboring a known polymorphism. For example, one oligomer may be about 20 nucleotides in length, corresponding to a portion of the osteolevin polymorphic sequence. By use of a battery of such allele-specific probes, PCR amplification
10 products can be screened to identify the presence of a previously identified polymorphism in the gene. Hybridization of allele-specific probes with amplified osteolevin sequences can be performed, for example, on a nylon filter. Hybridization to a particular probe under stringent hybridization conditions
15 indicates the presence of the same polymorphism in the tissue as in the allele-specific probe. Individuals can be quickly screened for common osteolevin variants by amplifying the individual's DNA using suitable primer pairs and analyzing the amplified product, e.g., by dot-blot hybridization using allele-specific oligonucleotide probes. Once a polymorphism has been characterized, an allele
20 specific detection approach such as allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization can be utilized to rapidly screen large numbers of samples.

Another preferentially applied method to detect polymorphisms include the use of mass spectrometry. After the PCR amplification of a DNA sequence that contains a polymorphism as e.g. T/ C at position 9783 defined by EMBL
25 ACCESSION NO. AC003098, an internal primer extension reaction is carried out with a primer ending one base upstream from the polymorphism of interest. Using only dideoxynucleoside triphosphates (ddNTPs) in the primer extension reaction the primer will be extended by only one base which represents the polymorphic site (e.g. position 9783). The exact mass of the extended primer is determined directly
30 with MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) mass spectrometry and heterozygotes generate 2 peaks that can be unambiguously distinguished.

Invasive cleavage products may also be detected by mass spectrometry or by fluorescent based methods. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are detected

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 27 -

based on the ability of special structure-specific endonucleases (cleavases) to recognize specific DNA structures (created by a specific hybridisation). An invader probe and a labeled signal probe are designed to hybridize to the target DNA so that the Invader probe overlaps the signal probe by at least one base representing the SNP site. This invasion of the signal-probe target duplex displaces a single-stranded flap containing the label. The juncture between the flap and the partially invaded duplex is recognized and cleaved by the enzyme only in case of complementary bases at the cleavage site, releasing the unhybridized region of the signal probe. Detection of the cleaved fragment can be accomplished as described above or by direct gel analysis or enzyme-linked antibody to a tag on the fragment. After cleavage, a new signal probe hybridizes and the process repeats, so that the cleaved signal probe accumulates. The signal is therefore amplified in this method and this amplification increases the overall sensitivity of the technique.

Vice versa, several polymorphism-containing oligonucleotides may be immobilized on a nylon filter ("SNP strip") and hybridized with the products of a multiplex PCR reaction obtained from the DNA of an individual for allele-specific hybridisation (Cheng et al., Clin. Chem. Lab. Med. (1998) 36(8): 561-566, RMS, Alameda).

The majority of the diagnostic assays described above incorporate nucleic acid probes as a crucial element. When the probes are used to detect the presence of the target sequences, the biological sample to be analyzed, such as blood or serum, may be treated to extract the nucleic acids. As discussed above, the sample nucleic acid may be prepared in various ways to facilitate detection of the target sequence, e.g., denaturation, restriction digestion, electrophoresis or dot blotting. The targeted region of the analyte nucleic acid usually must be at least partially single-stranded to form hybrids with the targeting sequence of the probe. If the sequence is naturally single-stranded, denaturation will not be required. However, if the sequence is double-stranded, the sequence will probably need to be denatured. Denaturation can be carried out by various techniques known in the art.

Target nucleic acids, probe and analyte can be incubated under conditions which promote stable hybrid formation of the target sequence in the probe with the putative targeted sequence in the analyte. The region of the probe which is used to bind to the analyte can be made completely complementary to the

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 28 -

targeted region of human chromosome 17. Therefore, high stringency conditions are desirable in order to prevent false positives. However, conditions of high stringency are used only if the probes are complementary to regions of the chromosome which are unique in the genome. The stringency of hybridization is
5 determined by a number of factors during hybridization and during the washing procedure, including temperature, ionic strength, base composition, probe length, and concentration of formamide. These factors are outlined in, for example, Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, 1982 and Sambrook et al., 1989. Under certain circumstances, the
10 formation of higher order hybrids, such as triplexes, quadruplexes, etc., may be desired to provide the means of detecting target sequences.

Nucleic acid hybridization will be affected by such conditions as salt concentration, temperature, or organic solvents, in addition to the base composition, length of the complementary strands, and the number of nucleotide
15 base mismatches between the hybridizing nucleic acids, as will be readily appreciated by those skilled in the art. Stringent temperature conditions will generally include temperatures in excess of 30°C., typically in excess of 37°C, and preferably in excess of 45°C. Stringent salt conditions will ordinarily be less than 1000 mM, typically less than 500 mM, and preferably less than 200 mM. However,
20 the combination of parameters is much more important than the measure of any single parameter. Probe sequences may also hybridize specifically to duplex DNA under certain conditions to form triplex or other higher order DNA complexes. The preparation of such probes and suitable hybridization conditions are well known in the art.

Detection, if any, of the resulting hybrid is usually accomplished by the
25 use of labeled probes. Alternatively, the probe may be unlabeled, but may be detectable by specific binding with a ligand which is labeled, either directly or indirectly. Suitable labels, and methods for labeling probes and ligands are known in the art, and include, for example, radioactive labels which may be incorporated
30 by known methods (e.g., nick translation, random priming or kinasin), biotin, fluorescent groups, chemiluminescent groups (e.g., dioxetanes, particularly triggered dioxetanes), enzymes, antibodies and the like. Variations of this basic scheme are known in the art, and include those variations that facilitate separation of the hybrids to be detected from extraneous materials and/or that amplify the

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 29 -

signal front the labeled moiety. A number of these variations are reviewed in, e.g., Matthews & Kricka, *Anal. Biochem.*, 169: 1, 1988; Landegren et al., *Science*, 242: 229, 1988; Mittlin, 1989; U.S. Pat. No. 4,868,105; and in EPO Publication No. 225,807.

5 As noted above, a number of non-PCR based screening assays are contemplated in this invention. One procedure hybridizes a nucleic acid probe (or an analog such as a methyl phosphonate backbone replacing the normal phosphodiester), to the DNA target present at a low concentration. This probe may have an enzyme covalently linked to the probe, such that the covalent linkage does not interfere with the specificity of the hybridization. This enzyme-probe-conjugate
10 target nucleic acid complex can then be isolated away from the free probe enzyme conjugate and a substrate is added for enzyme detection. Enzymatic activity is observed as a change in color development or luminescent output resulting in an increase in sensitivity. For an example relating to the preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes, see Jablonski et al., *N.A.R.*, 14: 6115-6128, 1986. Two-step label amplification methodologies are known in the art. These assays work on the principle that a small ligand (such as digoxigenin, biotin, or the like) is attached to a nucleic acid probe capable of specifically binding an osteolevin region sequence.
15 Allele specific probes are also contemplated within the scope of this example and exemplary allele specific probes include probes encompassing the predisposing polymorphisms of this patent application.

In one example, the small ligand attached to the nucleic acid probe is specifically recognized by an antibody-enzyme conjugate. In one embodiment of
25 this example, digoxigenin is attached to the nucleic acid probe. Hybridization is detected by an anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase conjugate. The alkaline phosphatase modifies a chemiluminescent substrate which can then be detected. For methods for labeling nucleic acid probes according to this embodiment see Martin et al., *BioTechniques* 9: 762-768, 1990. In a second
30 example, the small ligand is recognized by a second ligand-enzyme conjugate that is capable of specifically complexing to the first ligand. A well known embodiment of this example is the biotin-avidin type of interaction. For methods for labeling nucleic acid probes and their use in biotin-avidin based assays see Nguyen et al., *BioTechniques* 13: 116-123, 1992. It is also contemplated within the scope of this

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 30 -

invention that the nucleic acid probe assays of this invention will employ a combination of nucleic acid probes capable of detecting osteolevin polymorphisms. Thus, in one example to detect the presence of polymorphisms in a cell sample, more than one probe complementary to the gene is employed and in particular the number of different probes is alternatively two, three, or five different nucleic acid probe sequences. In another example, to detect the presence of polymorphisms in the osteolevin region sequence in a patient, more than one probe complementary to the genes in the region is employed. The cocktail includes probes capable of binding to the allele-specific polymorphisms identified in populations of patients with alterations in this region. In this embodiment, any number of probes can be used, and will preferably include probes corresponding to the major polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region identified as being associated with abnormal bone formation.

Any sequence differences found by one of the techniques discussed above will identify an individual as having a molecular variant of the osteolevin region that may associate with abnormal bone formation. These variants can take a number of forms and can occur in both coding and non-coding regions. Certain polymorphisms associated with an expressed gene could generate an abnormal protein or could significantly alter protein expression. Additional disruptive polymorphisms could include small in-frame deletions and non-conservative base pair substitutions which could have a significant effect on the protein produced, such as changes to or from a cysteine residue, from a basic to an acidic amino acid or vice versa, from a hydrophobic to hydrophilic amino acid or vice versa, or other polymorphisms which would affect secondary or tertiary protein structure. Silent polymorphisms or those resulting in conservative amino acid substitutions would not generally be expected to disrupt protein function.

The methods and osteolevin sequences disclosed herein also provide for a variety of assays using DNA chip technology (see e.g. Wang et al., Science 15; 280: 1077-1082 (1998) and U.S. Patent Nos. 5,858,661 and 5,837,832 which are incorporated herein by reference). In particular, the present invention provides arrays of osteolevin specific oligonucleotide probes immobilized on a solid support (or "chip"). In this context, DNA chips containing arrays of oligonucleotide probes can be used to determine whether a target nucleic acid sample contains a nucleotide sequence identical to, or different from, a specific reference sequence.

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 31 -

An exemplary array comprises probes exactly complementary to the reference sequence (such as the TCC insertion at position 10668 defined by EMBL ACCESSION NO. AC003098 in the osteolevin sequence), as well as probes that differ by one or more bases from the exactly complementary probes. In a typical
5 embodiment, an array will comprise a set of oligonucleotide probes such that, for each base in a specific reference sequence, the set includes a probe that is exactly complementary to a section of the reference osteolevin sequence and additional probes which are related to this reference sequence except that one or more
10 nucleotides within this sequence been replaced by a predetermined set of nucleotides (typically encompassing a portion of a polymorphic region). The detection of sequences binding to such arrays can be carried out by a variety of methods that are known in the art (see e.g. U.S. Patent No. 5,837,832).

The present invention further provides antibodies to polymorphic
15 regions of proteins encoded by genes in the osteolevin region. Exemplary antibodies include polyclonal, monospecific polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies well known in the art. In particular, the presence of abnormal bone formation can also be detected on the basis of the alteration of wild-type osteolevin polypeptide. While such alterations can be
20 determined by sequence analysis in accordance with conventional techniques, more preferably, antibodies (polyclonal or monoclonal) are used to detect differences in, or the absence of osteolevin peptides. Techniques for generating and purifying antibodies are well known in the art and any such techniques may be chosen to achieve the preparations claimed in this invention. In a preferred embodiment of
25 the invention, antibodies will immunoprecipitate polymorphic osteolevin proteins from solution as well as react with these proteins on Western or immunoblots of polyacrylamide gels. In another preferred embodiment, antibodies will detect osteolevin proteins in paraffin or frozen tissue sections, using immunocytochemical techniques.

Preferred embodiments relating to methods for detecting osteolevin
30 polypeptides or their polymorphisms include enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), radioimmunoassays (RIA), immunoradiometric assays (IRMA) and immunoenzymatic assays (IEMA), including sandwich assays using monoclonal and/or polyclonal antibodies. Exemplary sandwich assays are described

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 32 -

by David et al., in U.S. Pat. Nos. 4,376,110 and 4,486,530, hereby incorporated by reference.

5 Nucleic acids which encode genes in the osteolevin region or their modified forms can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene. The transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a piece of DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, cDNA encoding osteolevin can be used to clone genomic DNA encoding osteolevin protein (including the osteolevin allele containing the 3 base pair insertion at position 10668 defined by EMBL ACCESSION NO. AC003098) in accordance with established techniques. The genomic fragment can then be used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding osteolevin (for example a murine osteolevin protein having the 3 base pair insertion at position 10668 defined by EMBL ACCESSION NO. AC003098 seen in the human protein). Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for osteolevin transgene incorporation with tissue-specific enhancers. However, transgenic animals may also be generated in which the osteolevin transgene is expressed ubiquitously, for example under the control of the beta-actin promoter. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding various osteolevin sequences introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding osteolevin sequences. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression. In accordance with this facet of the invention, if transgenic animals treated with the reagent exhibit a reduced incidence of the pathological condition compared to untreated transgenic animals, then the reagent would be a candidate for potential therapeutic intervention for the pathological condition.

10

15

20

25

30

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 33 -

Alternatively, non-human homologues of osteolevin can be used to construct an osteolevin "knock out" animal. The knockout animal has a defective or altered gene in the osteolevin region as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding osteolevin region sequences and altered genomic DNA encoding osteolevin sequences introduced into an embryonic cell of the animal. For example, cDNA encoding osteolevin can be used to clone genomic DNA encoding osteolevin in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding osteolevin can be deleted or replaced with another gene such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector (see e.g., Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors). The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected (see e.g., Li et al., Cell 69:915 (1992)). The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras (see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock-out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance for their development of pathological conditions due to absence of the osteolevin polypeptide.

The methods and osteolevin sequences disclosed herein also provide for a variety of drug screening assays using recombinant osteolevin sequences, typically osteolevin sequences having one or more polymorphisms that are associated with a pathological condition. Such proteins are particularly useful in the pharmacological characterization of novel modulators (i.e. inhibitors or activators) of the activity of proteins and protein complexes. Moreover, a variety of drug screening assays are known in the art, the methods of which are readily adapted for evaluating the osteolevin sequences disclosed herein (see e.g. Vinggaard et al., *Toxicol. Appl.*

Pharmacol. 155(2): 150-160 (1999); Fernandes et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2(5): 597-603 (1998); Gonzales et al., Curr. Opin. Biotechnol. 9(6): 624-31 (1998) and U.S. Patent Nos. 5,877,007 and 5,780,258, the contents of which are incorporated herein by reference).

5 In an illustrative embodiment of such assays, recombinant polymorphic osteolevin protein can be introduced into the media of cells which are known to respond to wild type osteolevin protein. The response may be quantified for example, by measuring alterations in the pH of the media with Cytosensor microphysiometer system (manufactured by Molecular Dynamics), or by
10 measuring changes in intracellular calcium concentrations, cyclic AMP or GMP levels, phosphorylation of proteins on a signaling pathway, or by a reporter gene assay. Such responsive changes in a particular activity or other cellular characteristic may be utilized in many useful ways, including the discovery, development or characterization of substances suitable for the treatment of diseases
15 or other conditions in human beings or animals. Such osteolevin proteins and associated cell assays may also be useful for studying diseases or other biological processes, for determining the effects of various drugs alone or in combination, as well as for identifying or characterizing substances which may be useful in reducing or preventing the occurrence of a disease or other condition.

20 A specific embodiment of the invention provides methods and compositions for screening for agents which regulate osteolevin activity or osteolevin-induced activity. Such agents can find use in modulating a wide variety of physiological manifestations of osteolevin expression including the pathologies which are associated with osteolevin polymorphisms.

25 A cell-based assay to test the pharmacological activity of various agents can then be performed by exposing cells that respond to osteolevin to a candidate agent under conditions where the presence of the agent may cause a change in the response of the cell to osteolevin. In a closely related embodiment, a comparison between the responses of cells to (1) mutant and (2) wild type osteolevin can be
30 characterized.

 The cells to produce recombinant osteolevin for the assay described herein may be generated from individuals having polymorphisms in the osteolevin region or by a variety of protocols that are well known in the art including the

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 35 -

transfection methods described above. Alternatively such cells can be generated by utilizing transgenic or genetic knock-out animals made by homologous recombination, e.g. recombination of a wild type osteolevin sequence with a transgene comprising a polymorphic or modified osteolevin sequence. Similarly, the cells for the assay itself may be cells that endogenously express the osteolevin receptor or may have been transfected with the receptor. In addition, a wide variety of reporter genes and assays that are known in the art can be adapted to the cell-based screening assays disclosed herein. For example, a reporter gene can encode an enzyme which produces colorimetric or fluorometric change in the host cell which is detectable by in situ analysis and which is a quantitative or semi-quantitative function of transcriptional activation. Exemplary enzymes include esterases, phosphatases, proteases (tissue plasminogen activator or urokinase) and other enzymes capable of being detected by activity which generates a chromophore or fluorophore as will be known to those skilled in the art. A preferred example is E.coli beta-galactosidase disclosed herein. This enzyme produces a color change upon cleavage of the indigogenic substrate indolyl-B-D-galactoside by cells bearing beta-galactosidase (see, e.g., Goring et al., Science, 235:456-458 (1987) and Price et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84:156-160 (1987)). This enzyme is preferred because the endogenous beta-galactosidase activity in mammalian cells ordinarily is quite low, the analytic screening system using β -galactosidase is not hampered by host cell background.

Regulators of osteolevin activity or osteolevin-induced activity as identified in the method described herein before are also object of the present invention as are pharmaceutical compositions comprising such regulators and a pharmaceutically acceptable carrier.

Medicaments containing an osteolevin polypeptide are also an object of the present invention, as is a process for the manufacture of such medicaments, which process comprises bringing osteolevin polypeptide and, if desired, one or more other therapeutically valuable substances into a galenical administration form. The pharmaceutical compositions may be administered orally, for example in the form of tablets, coated tablets, dragées, hard or soft gelatine capsules, solutions, emulsions or suspensions. Administration can also be carried out rectally, for example using suppositories; locally or percutaneously, for example

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 36 -

using ointments, creams, gels or solutions; or parenterally, for example using injectable solutions.

For the preparation of tablets, coated tablets, dragées or hard gelatine capsules the compounds of the present invention may be admixed with pharmaceutically inert, inorganic or organic excipients. Examples of suitable excipients for tablets, dragées or hard gelatine capsules include lactose, maize starch or derivatives thereof, talc or stearic acid or salts thereof. Suitable excipients for use with soft gelatine capsules include for example vegetable oils, waxes, fats, semi-solid or liquid polyols etc.; according to the nature of the active ingredients it may however be the case that no excipient is needed at all for soft gelatine capsules. For the preparation of solutions and syrups, excipients which may be used include for example water, polyols, saccharose, invert sugar and glucose. For injectable solutions, excipients which may be used include for example water, alcohols, polyols, glycerine, and vegetable oils. For suppositories, and local or percutaneous application, excipients which may be used include for example natural or hardened oils, waxes, fats and semi-solid or liquid polyols. The pharmaceutical compositions may also contain preserving agents, solubilising agents, stabilising agents, wetting agents, emulsifiers, sweeteners, colorants, odorants, salts for the variation of osmotic pressure, buffers, coating agents or antioxidants. They may also contain other therapeutically valuable agents.

Therefore, in accordance with the invention, osteolevin polypeptides may be used for the manufacture of a medicament for the treatment of diseases associated with abnormal bone formation, such as sclerosteosis, Van Buchem's disease, Paget disease and the like. The dosage can vary within wide limits and is, of course, fitted to the individual requirements in each particular case.

In a further embodiment of the invention, there are provided articles of manufacture and kits containing probes, oligonucleotides or antibodies which can be used, for instance, for the diagnostic applications described above. The article of manufacture comprises a container with a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which includes an agent that is effective for diagnostic applications, such as described

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 37 -

above. The label on the container indicates that the composition is used for a specific diagnostic application. The kit of the invention will typically comprise the container described above and one or more other containers comprising materials desirable from a commercial and user standpoint, including buffers, diluents, filters and package inserts with instructions for use.

The present invention is further detailed in the following Examples, which are offered by way of illustration and are not intended to limit the invention in any manner. Standard techniques well known in the art or the techniques specifically described below are utilized. All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

Examples

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated.

5

Example 1

Cloning and sequencing of osteolevin cDNA

A cDNA library derived from human kidney tissue (Clontech) was screened by hybridization. The probe used was obtained by PCR, using primers derived from the predicted 3' UTR of the osteolevin gene. Positive clones were grown and plasmid DNA was isolated using high pure Plasmid Isolation kit (Roche). Sequencing on an automated sequencing apparatus (ABI377) using vector primers and internal primers for the gene revealed the presence of four clones. Sequencing according to standard procedures revealed the full-length cDNA clone shown in Figure 1B.

10
15

Example 2

Detection of polymorphisms

a) To detect polymorphisms the osteolevin gene was PCR-amplified from 47 unrelated individuals of 5 different ethnic origins. Using fragment-specific primer pairs (length: 18-27 bp), 200-700 bp fragments were amplified e.g. a 588 PCR product was generated with the primer pair OSTVprom-F2 (Fig. 5) and OSTVprom-R2 (Fig. 5). Fragments were designed overlapping and covered the whole genomic region of osteolevin. After a column purification of the PCR products, the DNA was sequenced on an ABI capillary sequencer using ABI Dye terminator chemistry (fluorescence based sequencing). Polymorphisms in the DNA sequences were detected using Polyphred software (Nickerson, D. et al. 1997: NAR 25(14): 2745-2751), which operates on the basis of Phred, Phrap and Consed (programs all licensed from the University of Washington, USA). This program is

20

25

able to automatically detect the presence of heterozygous single nucleotide substitutions by fluorescence-based sequencing. In the example above the following 5 polymorphisms were detected in the 588 bp fragment:

C to T	10877
A to G	10876
T to C	10817
C to A	10687
TCC insertion between	10668 and 10669

*defined by the position in EMBL ACCESSION NO. AC003098

5

b) The three disease-associated polymorphisms were detected by PCR-amplification of the appropriate genomic DNA-fragment from Van Buchem's and sclerosteosis patients, followed by sequencing of the fragments and comparison to DNA of healthy individuals. To make high throughput screening possible a PCR-based assay was developed for two mutations. For the mutation in the Brazilian patients, a modified primer was designed creating a MboI restriction site in the mutated allele. After MboI restriction digest and electrophoresis the mutated allele can be differentiated from the normal. The mutated allele in the American patients contains a BstEII restriction site that is absent in the wild type allele making differentiation between mutated and normal allele possible.

15

Example 3

Expression of recombinant osteolevin

Three types of recombinant osteolevin were produced. The first has a carboxy terminal tag, the second an amino terminal tag, and the third has no tag. The epitope tags were incorporated for purification of the protein. Constructs were made by standard methods (cite Maniatis or Protocols in Molecular Biology here). Primers were designed to the appropriate region of the osteolevin sequence with restriction sites at the 5' end of each sequence as detailed below. Human osteolevin

20

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

- 40 -

sequence was amplified by PCR, the product digested with appropriate enzymes, and ligated into a vector which had been similarly digested.

5 The construct for expression of the carboxy-terminal tagged protein was made in the pBlueBac4.5/V5-His vector (Invitrogen) using the BamHI and HindIII sites. The entire osteolevin coding sequence was amplified for insertion into the vector, including the endogenous putative secretion signal. The vector includes a V5 epitope. This permits the expression of the fusion protein to be monitored by Western analysis with an anti-V5 epitope antibody (Invitrogen). In addition the vector encodes a His6 tag which allows purification of the polypeptide on a nickel column (available from many sources).

15 The construct for expression of an amino-terminal tagged protein was made in the pAcSecG2T vector (Pharmingen) using the BamHI and EcoRI sites. The putative mature osteolevin coding sequence (i.e. not including the signal sequence) was amplified for insertion into the vector. The vector itself encodes a secretion signal taken from the gp67 protein for high levels of secretion. Additionally, the vector includes a glutathione S-transferase tag which allows for both monitoring of expression with anti-GST antibody (Pharmingen) and purification with glutathione agarose beads (Pharmingen). Finally, there is a thrombin cleavage site between the GST tag and osteolevin so that the protein can be separated from the tag following purification.

20 The construct for expression of an untagged protein was made in the pBlueBac4.5 vector (Invitrogen) using the BamHI and EcoRI sites. The entire coding sequence for osteolevin, including the putative signal sequence, was amplified for insertion into the vector.

25 Each construct was completely sequenced to verify that no nucleotide changes had been inadvertently introduced during the amplification or cloning process.

30 Transformation of suitable host cells, growing of the transformed cells as well as specific expression of osteolevin have been performed following the manufacturer's instructions.

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

-41-

Claims

1. A method for screening for osteolevin polymorphisms in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject.
- 5 2. A method according to claim 1, wherein the polymorphisms are associated with abnormal bone formation.
3. A method for screening for the presence of a heritably linked form of abnormal bone formation in a subject, comprising determining the presence of a polymorphism associated with abnormal bone formation
- 10 in an osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject.
4. The method according to any of claims 1 or 3, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence.
- 15 5. The method according to any of claims 1 to 4, wherein the polymorphism effects the expression or function of the osteolevin protein.
6. The method according to any of claims 1 or 3, wherein the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence is determined by an assay comprising a differential nucleic acid analysis technique such as restriction fragment length polymorphism analysis, direct mass-analysis
- 20 of PCR products using mass spectrometry, direct analysis of invasive cleavage products, direct sequence analysis, extension based techniques such as ARMSTM (amplification refractory mutation system), ALEXTM (amplification refractory mutation system linear extension) and COPS (competitive oligonucleotide priming system), OLA (oligonucleotide ligation assay), Invader Assay, DNA chip analysis or polymerase chain reaction analysis.
- 25 7. The method according to claim 4, wherein a PCR product is amplified with a forward primer selected from the group consisting of OSTV3UT-F, OSTVint-F1, OSTVint-F3, OSTVint-F4, OSTVint-F5, OSTVex1-F, OSTV5UT-F, OSTV3gen-F1, OSTV3gen-F2, OSTV5UT-F, OSTVprom-
- 30

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

-42-

F1 and OSTVprom-F2, and a reverse primer selected from the group consisting of OSTV3UT-R, OSTVint-R1, OSTVint-R3, OSTVint-R4, OSTVint-R5, OSTVex1-R, OSTV5UT-R, OSTV3gen-R1, OSTV3gen-R2, OSTV5UT-R, OSTVprom-R1 and OSTVprom-R2.

- 5 8. A method of identifying a patient's susceptibility to a pathology associated with abnormal bone formation comprising the step of determining a genetic polymorphism pattern for an osteolevin nucleic acid sequence obtained from the patient and comparing the patient's genetic polymorphism pattern and the wild type osteolevin sequence,
 - 10 wherein differences between the patient's genetic polymorphism pattern and the wild type sequence indicate a susceptibility to the pathology.
9. A method of identifying a polymorphism associated with abnormal bone formation in one or more subjects, comprising comparing an osteolevin sequence isolated from the subjects to a known wild type osteolevin sequence and identifying a recurrent polymorphism in the osteolevin
 - 15 sequence isolated from the subjects being associated with abnormal bone formation.
10. A nucleic acid molecule encoding osteolevin, said nucleic acid molecule being selected from the group consisting of
 - 20 a) the nucleic acid molecule or a complement of the nucleic acid molecule set forth in SEQ ID NO. 1.
 - b) a nucleic acid molecule or a complement of a nucleic acid molecule encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO. 2.
 - 25 c) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to a nucleic acid molecule of above a) or b).
11. A nucleic acid molecule encoding osteolevin region polymorphisms comprising the nucleic acid as defined by nucleotide position 4'000 - 11'000 in EMBL ACCESSION NO. AC003098, Release 62.0, or parts thereof, with one or more of the nucleotide exchanges or insertion
 - 30 selected from the group consisting of:

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

-43-

G to A	at position 6136
C to T	at position 6140
T to A	at position 9047
C to T	at position 10877
A to G	at position 10876
T to C	at position 10817
C to A	at position 10687
TCC between	position 10668 and 10669
C to G	at position 10424
C to G	at position 10342
A to G	at position 10020
T to C	at position 9783
C to T	at position 9723
C to T	at position 9646
G to A	at position 9616
C to T	at position 9242
A to G	at position 8375
C to T	at position 7894
G to T	at position 7489
T to G	at position 6358
C to T	at position 5308
G to A	at position 5004
C to T	at position 4866
G to C	at position 4475

and combinations thereof as well as their reverse complements.

12. A vector, comprising a nucleic acid molecule according to claim 10 or 11.

13. An expression vector, comprising a nucleic acid molecule according to claim 10 or 11 operatively linked to a transcriptional regulatory sequence.
14. A host cell transfected with a vector of any of claims 12 or 13.
- 5 15. A recombinant osteolevin polypeptide encoded by a nucleic acid molecule of claim 10 or 11.
16. A compound according to claim 15 for use in the treatment of diseases associated with abnormal bone formation, such as sclerosteosis, Van Buchem's disease, Paget disease and the like.
- 10 17. The use of a compound according to claim 15 for the manufacture of a medicament for the treatment of diseases that are associated with abnormal bone formation, such as sclerosteosis, Van Buchem's disease, Paget disease and the like.
- 15 18. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a pharmaceutically effective amount of a polypeptide as defined in claim 15.
19. A method of preparing a recombinant osteolevin polypeptide of claim 15, comprising the steps of
- 20 a) culturing the cell of claim 14 in an appropriate culturing medium to produce an osteolevin polypeptide; and
- b) isolating the osteolevin polypeptide.
20. A method for screening for regulators of osteolevin activity or osteolevin-induced activity, said method comprising the step of:
- 25 a) determining the expression level of a reporter gene or downstream signaling molecule such as intracellular calcium which is modulated by osteolevin in a particular cell type,
- b) contacting the cell with a candidate agent,

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

-45-

- c) determining the expression level of the reporter gene or downstream signaling molecule in response to the candidate agent; and
- d) comparing the first expression level of the reporter or the downstream signaling molecule with the expression level observed in response to the candidate agent, wherein an alteration indicates that the candidate agent modulates osteolevin activity.
21. An antibody which binds specifically to a polypeptide according to claim 15.
22. The antibody of claim 21, which is a monoclonal antibody.
23. The antibody of any of claims 21 to 22, labelled with a detectable label.
24. A kit for identifying polymorphism in the osteolevin region, comprising at least one reagent for use in characterizing a nucleic acid sequence in the osteolevin region, instructions setting forth a procedure according to any of the methods of claims 1 to 9, and a container for contents of the kit.
25. A kit according to claim 24, wherein the reagent for use in characterizing a nucleic acid sequence in the osteolevin region comprises a polynucleotide capable of specifically hybridizing to the osteolevin region.
26. A regulator of osteolevin activity or osteolevin-induced activity as identified in the method of claim 20.
27. A pharmaceutical composition comprising a regulator of claim 26 and a pharmaceutically acceptable carrier.
28. The invention as described herein before.

WO 01/98491

1/13

PCT/EP01/06795

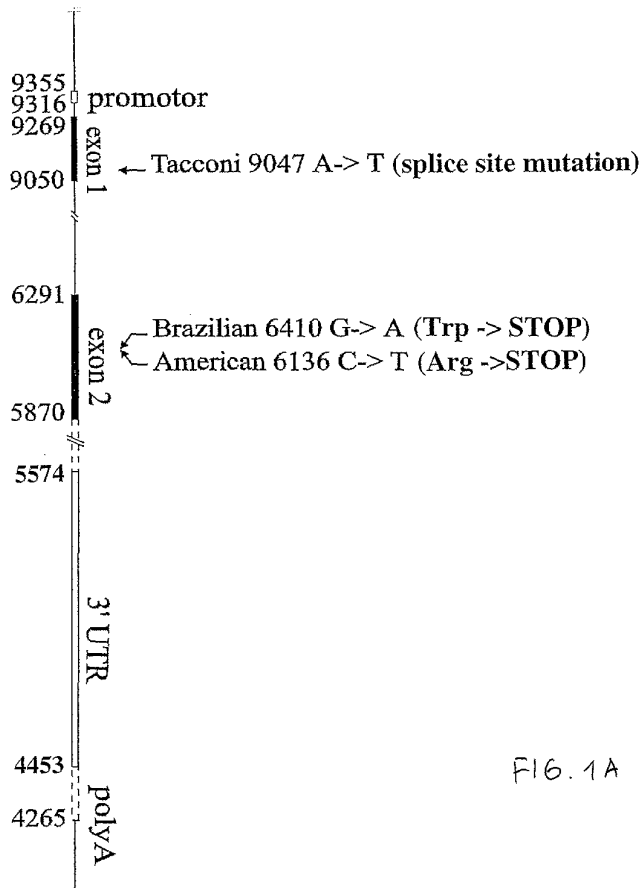


FIG. 1A

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

2/13

Fig. 1B

CTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGCCTGCTGGTAC
5 ACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGC
CACGAAATCATCCCCAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAG
AACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCCC
TTTGAGACAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTACCCGCT
AOGTGACCGATGGGCCGTGCCGACGCCAAGCCGCTACCGAGCTGGTGTGCT
10 CCGGCCAGTGCGGCCCGCGCGCTGCTGCCAACGCCATCGGCCGCGCAAGT
GGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCA
GGCGGTGCAGCTGTGTGTCCCGTGGTGAGGCGCGCGCGCGCAAGGTGCG
CCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAAGTCGGAG
CTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGAGAAAGGCCGGAAGCCGCGG
15 CCCCCGCCCCGAGCGCCAAAGCCAACCAAGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAG
AGCCCGCCCGCGCCCTCCCCACCGCGGGCGCCCGGCCCTGAACCCGCGCCC
CACATTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTCATGTAAATGCCTGC
AAGCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGG
CAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTGAGGGGTCCACGGGGCAGGGGAGGGAAT
20 TGAGAGTCAAGACACTGAGCCACGCAGCCCGCCTCTGGGGCCGCTACCTTTG
CTGGTCCCCTTACAGAGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTCACCGCCCTGGGGTTT
TAAGGGAGCGGTGTGGAGTGGGAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATA
AGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGCCAGAGCA
CAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTTGCCACTAAGTTG
25 CTGTGTAAACCTTGAACACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAA
AATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTATTGGCATATGATTCCA
AGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAG
AGAATGAATGCAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAAGGTCACTTCCAGAAATTCAGAGTT
GTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAACAAACAGAAAAAAAAAGTAAA
30 GAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAAGCTATGC
TGCTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAA
GAAAATACATCATCCATTGGGGTAGAAAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGG
GATAGAAATCACATCCGCCCACTTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCGACCCA
TAGCCATGTTTTAAAGTCACCTTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGC
35 CTTCAGGCCCCGAGGAGCAGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTT

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

3/13

Fig. 1B (continued)

GAGACACCGCCTTCTGCCCACCACTCACGGACACATTTCTGCCTAGAAAACAGCTT
CTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGA
5 AAAACTACAAGTGCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATACTGCCACCC
AAAAATCTTTTGAAAAATCATTTCCAGACAACCTCTTACTTTCTGTAGTTTTTAA
TTGTTAAAAAAGTTTTAAACAGAAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGA
CTGGTCGTTTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTA
GTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACATATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAA
10 AAGTTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAACAGTCTGT
TCTTCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGAAAAAAAAAA
AAA

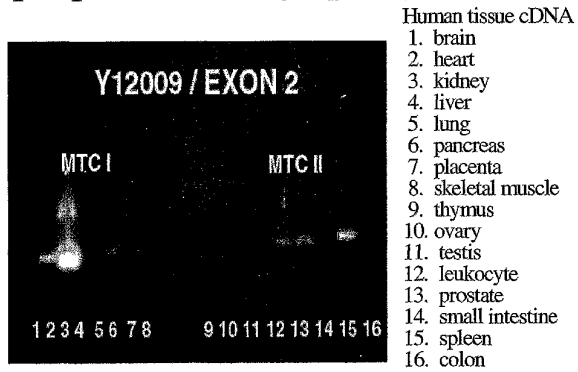
WO 01/98491

PCT/EP01/06795

4/13

Fig. 2

Osteolevin is expressed in kidney and peripheral blood lymphocytes



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

5/13

Fig. 3

3951 GGAGCTATGG AAGGCTTTTG AGCAGGGGAG TGATACAATG AGAACAGCAT
4001 TTTGGAAGCC AGCATGGAGG GAGGGCTGCT AAAAGGATAC AAGGCTGAGG
5 4051 TTATTACCAT GCCCTGGGTG AAGAAATCGG GTCTGGGTTT GGAAAGGAAG
4101 GGATAAACAT GACTTTTCAA AGGAAGACAT AATTGCCACA AGGGCCACCA
4151 GAGAGCAGTC AAAGGTGTGT CCAAGGTTGG AGCTCTAGTG ACCAAGAGAA
4201 GGGTGTCAAC TTTGACAGAA ATGACGTCAT GTGTGGTTGA CAAATGAGA
4251 CCACATCCTT TCGGTCAATG TTCATTGTCT TTATTACAA TGTCCTTGGA
10 4301 CTCTGGAAGA ACAGACTGTT AATTCATATA GCAATATTA CATTGTCTATT
4351 CTCATCAAGA AAAACTTTTG CATAAATAAC TTAAGTGAGA AAATAAATAT
4401 GTAACTTAAC TCTTTAAAA CCACTACTTT CATTCTTGTG GACAAGTCCC
4451 ACGTGGAGA ATTGCCAAA AAACGACCAG TCCTGCAGGC TTTCATATGT
4501 CATGTGCTTC TGTTTAAAC TTTTTTTTTT TAACAAATAA AAACACACA
15 4551 GAAAGTAAGA GGTGTCTGG AAATGATTTT CAAAAAGATT TTTGGGTGGC
4601 AGCTATATG CTCTGCAGTT TCTCAGCATA TGTACAGCAC TTGTAGTTTT
4651 TCCCCAATA ATATCTTTTT AGTGTAGAT ATGCCATCAC ATGTAAGAGC
4701 AGTAAGAAGC TGTTTCTAG GCAGAAATGT GTCCGTGAGT GGTGGGCAGA
4751 AGGCGGTGTC TCAAAAGGGA TGTGCTGGTC TGTGAATTTG TGATGGCTGC
20 4801 TCCCTCGGGC CTGCAAGGCC AGTGTCTTTG AACCTTTTAC TTCTCTTCGG
4851 AAGGTGACTT TAAACATGG CTATGGGTCG GGGGAGGGAT GCTGCTCTTT
4901 GGGAGTTGG GCGGATGFG ATTTCTATCC CTCCCACCAC CCTCGGACCC
4951 TCTCTTTTC TACCCCAATG GATGATGTTA TTTCTTTGAG ATGGAGGGGT

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

6/13

Fig. 3 (continued)

```
5001 GGAGGTAGCC AAACATCCGG GGAAGCCAGG CTGGGAAGCA GCATAGCTTC
5051 TTCCAGGAGT TTGTCAGCCG TAAATATGTC AGCCATAAAT AGACTCTTTA
5 5101 CTTTTTTTTT TCTGTTTGT TTTCATCTTT GGCTGTCAGA AGAGAGCATC
5151 ACAACTCTGA ATTCTGGAAG TGACCTTGGC ACTGAAATCA TGCAACTGCA
5201 TTCATCTCTCT CTCTTCTCTCT CTCCTCTCTCT CACCTCTGCC CATTCAAAAG
5251 GCACGTGAGT CTTTGAATC ATATGCCAAT AGTCTCCTCG AGATCCTATT
5301 CCCACCTCCA CCTCATTTT ACAAAAGTGA AATTGAGGTC CCGAAGGAGA
10 5351 ATTGTGTAGT TCAAGGTTAC ACAGCAAGTT AGTGGCAGAG CCAGGACTAG
5401 AAACCACATC TACAGTTGCC CCCAGTCTTG TGCTCTGGGC ACGCCTCAGG
5451 CTTTCTGATG GGCAGCGAGG TGCAAGGGGG AATCTTATCC AACTTTCTTA
5501 ACCAGTCCCT GGACTTTCCC ACTCCACAC CGCTCCCTTA AAACCCAGG
5551 GCGGTGAAAA TGCTTCCATT TCTGCCTCCT CTGAAAGTGG ACCAGCAAAG
15 5601 GTAGSGGGCC CCAGAGGCGG GGCTGCGTGG CTCAGTGTCT GTGACTCTCA
5651 ATTCCCTCCC CTGCCCGGTG GGAACCCCTCA GCTGGCGGGC TGAGGGGGGC
5701 CTGCGGGCG CCCGGGATTC CTCAGGGCCT GGAAGGTCTC AGCCCCCTGC
5751 CCTGGGTTGC AGGCATTAC AATGAAATAT AAACAATCAA ACCACGCGCA
5801 GAGGACAGAA ATGTGGGGCG CGGGTTGAG GCCGGGGCG CCGCCGGTGG
20 5851 GGAGGGGCGC GGGCGGGCTC TAGTAGGCGT TCTCCAGCTC GGCTGTGTTG
5901 GCTTTGSCGC TCCGGGCGCG GGGCCGCGGC TTCCGSCCCT TCTGCGGCCG
5951 AGCGCCCTCG GTCCCGAAGT CTTGAGCTC CGACTGGTTG TGGAAAGCGG
6001 TGAGGCGCTT GCACTTGAC GAGGCCACCA GCGCACCTT GCGCGCGCGC
```

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

7/13

Fig. 3 (continued)

6051 GGCSCCTCAC CACCGGGACA CAGCAGCTGC ACGCGCTGCG CGCGGTAGCG
6101 GTCGGGGATG CAGCGGAAGT CGGGCCCACT AGGTCGCCAC CACTTGCCGC
5 6151 GGCCGATGGC GTTGGGCAGC AGGCGCGCCG GCGCCGACTG GCCGAGCAC
6201 ACCAGCTCGG TGACCGGCTT GCGCTGCGG CACGGCCCAT CGGTACGTA
6251 GCGGGTGAAG TGCAGCTCGC GGCAGCTGTA CTCGGACACG TCTGTGGAGA
6301 GAGGCGCGCG TGAGGGTGGC CGCCCGCCTG GCCACCCCTG CCCTGGACCG
6351 GCCCCTCTCT CTCCACCCCA GCCCTGCTTT TGCCAAGCCT GTCTCCAGAG
10 6401 GCTTTTGCCC CTGAACATCT ATTCAGGAA GGTCCAGAT GCTCTAGAGC
6451 TGGTGGAAAG CTCTCTGCG CACCTGTCC CCTCGGAGCC AAATGACTGC
6501 TGGGTTCAA ACACGAGGC TCATCGCTC ACTGCAGGTG TCATCTTGGG
6551 CAAGTTCCTT AACCTCTCTC TTCCTCTGT CTGCAAAATG GGCGGCCCA
6601 AGCATTCGA GTTAATCCAT TACACACGCA ATGCAGAAA TACCATTTGG
15 6651 CACATATAGC TGAAAGCGTC GCGTGTATG TATTATTATT ATCATTTCTC
6701 TTCTGGGGTC TTCTTATGAT TTAAGCCACA CTTGTGCCGC AGGGTCCCTG
6751 GCCTGGGCG GGTAAAGTACT CAGCACACCT TCTGCCTGGC TCTGGCTTCT
6801 CCCAAATTC TTTTCCAGCC ACTTGGGAGG GGTGGACAGG GGATGGAGAA
6851 AGGAGTAGAG GTTAATTGAA GGTAAATAAT CAGGGCAGCT GCTGTGGAGG
20 6901 CGAGGGACTG AAGGGGAGGT GATCAGGACA GGAATTCATT AGACTTGAAA
6951 GGAATCAAAG GCAGTGTGTC CAACCCCTC ATTATCAATG AGAATACTGA
7001 GGGCCAGCCA GAGAAAAGAA CTTGCCCAA AGGCTGGGCT GCATCTCCGG
7051 ACTCCACTTC CCTGGGTCC CAGCACCTT TGCTCCGC AAGAGTGGAG

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

8/13

Fig. 3 (continued)

7101 GCTCTGCGTT CGAGCATCCA TGGGAGGCTG GGCTGGGGGA TGGAGCTGAG
7151 GGCTGCTTTT TACTGTCGTT ACTTTCCTAC CATAGGGGCC CTGAGCTCTG
5 7201 ACCCAAAACC TACAGGTTCA GCTGCCACAA ACATTGACCT GGCTCTCTGC
7251 TGGGCACATT TCTTGTCTG TGTATCTGA ATGGGCGCCT CATGSGTATA
7301 CTCCTTGGGC AGGCAGAGAT TGGGCTCCGA GGCTTGGCCT GATCCCTGTC
7351 ACACACCTTG ACCATGTCTC CTATGGTGA CTTAGATGGG TGGGAGCTTT
7401 TTAANTAGCT GGTGTCGTG TGAGTACCAG TCCACCCCA AAGGTTTCAT
10 7451 GGGGATAGTT CCAATGTGAC AAGAAAGAAT GAAAAATAGT CTTAAGACCA
7501 AACCAGAGAG GGGACAGAGA AGGCCACCCC CCACCCACAC TCTGAAGAGC
7551 AAGCACAGCA GGGGAGATGT GGCCACTGCC ATCGTCTGGG GCTGCTTTCT
7601 GGTCTGTGGG CTGGTTTGCA TCCTCACCTC TGCAGGCTG GAATGTGTGT
7651 GTGGTCAGGG GGGCATTGTC CCAGGGAAGG GGGCATTTTG CGGCTTTTCG
15 7701 AGAATAGCGC CCTAGGCCA GGCACTTCCT CTGCAGATCA TGACTTTGTT
7751 TTGAGCATGT GGCCTCCTCA GGGGCTGTGG CCTCTCGTGG GAGTCCAGCA
7801 AGGTGGACAT TTTGTGTTTG GGTTCCTTAC AGCCCTTCAG GCAGTCGCTG
7851 GAGCCAGCT GACCTTGCCT AGAAGGGGAG CTGTGGGGG AGGCGCCCTT
7901 GTCCTCCATT TTGAAGACGG AGGGTCTTGG CTGGCTCCC ATGCAGTTGC
20 7951 CCTTTTAGC ACCCCATAGT CCCAACAGGT TGTGAGGCGG GGAGGGCTGG
8001 GGTCCAGGAG CCTGGGAGT GGACTTCTCT GCCACCTGGA TAATGGCCAG
8051 AGGACAGGGA AGCTCTTAGT CTGAAGTGTG ATTTCAAGACG CCCCATGGC
8101 CTCAGGATTC CTGCCAATTA TAGAGCCAGA TGCACACTGT CACCTGGGCT

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

9/13

Fig. 3 (continued)

8151 TCTCTGTGCA GGCTGACCA GGAACCCAGG GTTCTCTTC CTTCCTCCTC
 8201 CCCTGGAAATG AGGCAAGGTT GGGACTGGGG TGGCTGCTGA GGACAGATGT
 5 8251 CCCTACTCCT GCACAGAGGA TGCTGCTCTC CCCTCCAGGG CCTGGACTCA
 8301 GCTGCACCCA TGTGAGGGC TAAAACTGTG CCGAAACTC CCATTCCTTC
 8351 AAGTGCCAGC TCCCTGGGCA GGCCATGGGC AATGCACACT GCAGGGGTGC
 8401 CTCTCTGGCC TTCCTCCCA CTGCTTTGTG GAGATCTGTC CCCACACCC
 8451 CCCCACACAC CAGGGCTATC TTGCAGTTGG ATCAAACAG GTTCACACCT
 10 8501 CAGCTCTTCT CACTACCAAG TTACTGAGTG CCTGGAACCT GTTCTTCCC
 8551 CTTCGAGCTG GGGGTTACCC TCCTGGGGAT TCCATGATGT GGGTCTGTGT
 8601 GGTGGGGACA GCCACCACA GCATAGAGTG TCCGGTGCCC CACAGGTGCT
 8651 GTTCTGTGGA TGGGAGGCTC CTTACCTTG TTCCCTTCCC AGTGGTACCA
 8701 GCAGCTGGAC GTGGCTCCTA TATTCCCAGG AGGAGATTCT TTGAAACCTT
 15 8751 TTCTTTTCTG AGCCCCTGAG CCTGTCTTGA TGCCCTGATG CCATACCTTC
 8801 ACCACCCCAG CGTCTCCCT GCCCTGGGCT CTCACCAAGC TCTGTTCCTC
 8851 CATGCCCTCTG CACCTGAATT TGAAGGCTGC ACCAGCGAGC CATTCCTCCC
 8901 CCACCTCCAG GCAAGACTGT TCTCGACCA GTGCTGGCAG AGGCCAGCAA
 8951 TCTTCACTGG GTCTACCCCA GTCTTCCAAG CCTCCCAAAG AGAAGTTTCT
 20 9001 AAAACCTCCC CAGGATCTTT TACTAAGAAT TCTCTCTTCC ACCCCATACC
 9051 TTGGGTCTCA AAGGGGTGCT GGGGAGGCCG CCTCCGTTT TCCGCCCGGT
 9101 TCATGGTCTT GTTGTCTCC AGCTCCGGTG GAGGCTCGGG GTACTCTCCG
 9151 AGCTCGGGGA TGATTTCCTT GGCATCATTC TTGAACGCTT GCCACCCCTG

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

10/13

Fig. 3 (continued)

```
9201  GCCCTCCACT ACACGGAAGG CTGTGTGTAC CAGCAGGCAG ACGAGACACA
9251  GGGCCAGTGG GAGCTGCATG GTACCAGCCA GAGGAGGACA CGCCACCTTC
5   9301  CAGTAGCACA GGCTCTGGTC TCCAGCCGAG ACACGGTCGC CTTTTTAAAG
9351  CCCCTCTCTG CTTCATGCCA GCCAATGAGG ACAGGCTGGG GCAGGGGCTGG
9401  TCCCATGTTT CCTCAGCCC CGGAGGGAGG GAAAGGGGTG TGCTCAGAGC
9451  AAACCCFCCC CAAAGACTTC TCCTCTAGCT CAGCAAACTT CCAAATGCT
9501  GCTGGCACTC CCAGGTGACC CAGAGAGAGG GGGCGTGTGA GGCAGGCCCC
10  9551  AAGCCTGCTC TCCGGCACCT CCCACGTGCT GCGCGCTGTG GTTTTCAGAT
9601  ATCAAAATGA GCTCCGGCTT TTAATTGTCT GTCTCCCTGG GCCCTCGGGC
9651  ATTCTCAAAA CAAACTGTGG ACCCGCTCAA CAAAGAAAT GTGCAGTTCT
9701  GAGTGCTTCG CGGGGCTGAG CCCGGCTAT TCCATTCTC AGSCCAAGTT
9751  CATTTGTAC CCCACCAACA AATGGCCCAA GGTGTTTCTG TTTGACCCCC
15  9801  ATAGACCCAG CCAGAGGCAA AAAGATGCTT TTAAGAAAT CCCATTGGTC
9851  CCAACTCCAC AAGTCTCAGC ATTCATTGTC CTAACCAAGA AAGCCTCTCT
9901  TGGTATTCTC TGGAAGGCAA GAGAGAGAAC TAGAGGGTCA GAGCAAGGGT
9951  GCGCGCTTGG GAGAGAGGGC AGGATTCCTG TTACAAATCG AGGATGCGCT
10001 GGTCACTCAG GCTCCTGTGA TGGACAGCAC AGAGGAAATC CCAGCTCATG
20  10051 CTCTCAGGG ATCCTGTGCA CTGTGACAG CACTTCTGAG CCAGGGCACT
10101 CACTGTGGCT CGCAGGGTGA TGTGCTGAAG ACAGTCATTT CCCCACCAG
10151 TCTGTGTGTG TGAGAAGACA ACACCAAATT CCTTCCTTA GCAAAAGCCA
10201 CAGCCAGCGT TTTTAGTGCT GACATTTTAT TTTCTGTACT TCCAGCTGGT
```

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

11/13

Fig. 3 (continued)

10251 TACATTTTTC AAAAACAGTT TTGAGTCCTG TATGGAAAGC TTCATTGGTG
10301 CACACCCACAG GATGTGTTC ATGAAGCCAT CCCAGGACCA ACTGGTCACA
5 10351 AAGAAGCTAA GAGAAAATGC TGCCTTGGCC CTGCATATAA TGAGCCACAC
10401 AGGGCCGGG CGGGGGGCGG GGGCGCAGT AGAGGCGTGG GGGAGAAGGA
10451 TTCACACCTG AGGTGCAAGA AGAGAAAGGA AGGCCAGAGG AATCTTTCAT
10501 TGAAGACAGA TTGTTTGAGG ACAAGCAGCT CCTGTGAAGA GGCTGCCCAG
10551 ATCCTCTGGT ATTTTAACTG GGCAATGAAT CAGCATGCC CACCTGCAGA
10 10601 GCCTCTGCAA GTCTTTTGCC ACCTGCCCTCA ACTTGCAAGT CGCTGTGTCC
10651 ATCTGCAGCC GACTGTCCCTT TCCATCATCC ATCATCCGAC ACATGAATGC
10701 AGCTGCTCTG ACAGTTTAC AAGCCAGACA GAAGCCCCCT CAGGAAGGGC
10751 CCTCTCTGAT ACCTGCCTCC TAAGTCAGTT TCCTTCAGGG CAGATGAAAA
10801 CAGCTGTGGC CATTGTGGG GTGATCTAT CTCTCCAGC AGAGCCGGTA
15 10851 GTGTTGTGAG AAGCTGGCCC TCCGCACCAC CTCCCCTTGT CTATGACCCT
10901 CCAGCCTCCT TTTCCTTGC TCTGGAATGT GGACTGTAA CCCTCTCATG
10951 ACCAGACGAC TGCCTTCTTG CAATGGACTT GGGAGAGAGC AGTTCTGATG
11001 CCTGGGTCC TTGAGCAGGT AGGATGGATG CTTATAGCCC CACCTGCTG

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

12/13

Fig. 4

MQPLPLALCLVCLLVHTAFRVVEGGQGWQAFKNDATETIPELGEYPEPPPELENNKTMNR
AENGGRPPHHPFETKDVSEYSCRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVCSGQCQGPALLPN
AIGRGKWWRPSPGDFRCIPDRYRAQRVQLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHN
QSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

WO 01/98491

PCT/EP01/06795

13/13

Fig. 5

Primer name	Nucleotide sequence	Annealing temperature
OSTV3UT-R	TCTGTITGTTTTTCATCTTTGGCTGTC	74°C
OSTV3UT-F	ACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCC	74°C
OSTVint-R1	CACTGGCCGGAGCACACCAGCTC	70°C
OSTVint-F1	ACCTGCGGCACAAGTGTGGC	70°C
OSTVint-R3	CTGAGCTCTGACCCAAAACC	62°C
OSTVint-F3	CACCTTGCTGGACTCCAC	62°C
OSTVint-R4	GGCACTTCCTCTGCAGATCATG	68°C
OSTVint-F4	CAGGGAGCTGGCACTTGAAGG	68°C
OSTVint-R5	CCTCCAGGGCCTGGACTCAGC	72°C
OSTVint-F5	GAAGAATGGCTCGCTGGTGGAGC	74°C
OSTVex1-R	GCTCTCACCAGCGTCTGTTC	68°C
OSTVex1-F	GGGAGGGTTTGCTCTGAGCAC	68°C
OSTV5UT-R	GGACAGGCTGGGGCAGGGCT	70°C
OSTV5UT-F	GAATCCTGCCCTCTCTCCAAGC	70°C
OSTV3gen-F1	AAGAGTCTATTTATGGCTGAC	58°C
OSTV3gen-R1	TCCTGCAGGCTTTCATATGT	58°C
OSTV3gen-F2	GTTTTAAACAGAAGCACATGAC	60°C
OSTV3gen-R2	GAGTGATACAATGAGAACAGC	60°C
OSTV5UT-R	GGACAGGCTGGGGCAGGGCT	70°C
OSTV5UT-F	GAATCCTGCCCTCTCTCCAAGC	70°C
OSTVprom-R1	CTCTTGGTATTCTCTGGAAGG	62°C
OSTVprom-F1	GCCTCTTCACAGGAGCTGC	62°C
OSTVprom-R2	AGGATTCACACCTGAGGTGC	62°C
OSTVprom-F2	ATAAGCATCCATCCTACCTGC	62°C

WO 01/98491

1

PCT/EP01/06795

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Genetic polymorphisms in the osteolevin gene in the Van
 Buchem-sclerotosis disease region
 5 <130> Case 20512 (V & P ref. PA-1469/12)
 <140>
 <141>
 <150> 00 11 2867.7
 <151> 2000-06-19
 10 <160> 27
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 2271
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ctggctggta ccatgcagct cccactggcc ctgtgtctcg tctgectgct ggtacacaca 60
 gccttccgtg tagtgagggg ccagggggtgg caggcggtca agaatgatgc caccgaaatc 120
 atccccgagc tcggagagta ccccgagcct ccaccggagc tggagaacaa caagaccatg 180
 20 aacccggcgg agaactggag gccgcctccc caccacccct ttgagaccaa agacgtgtcc 240
 gagtacagct gcccgagct gcacttcacc cgctacgtga ccgctggggc gtgcccagc 300
 gccagccggc tcaccagctt ggtgtgtctcc gccagtgcc gcccgccggc cctgctgccc 360
 aacgccatcg gcccgggcaa gtggtgtcga cctagtgggc ccgacttccg ctgcatcccc 420
 gcccgctacc gcccgagcgg cgtgcagctg ctgtgtcccg gtgtgtgggc gccgcgcgcg 480
 25 cgcaaggctc gccgtgtggc ctggtgcaag tgcagagccc tcaccgcctt ccacaaccag 540
 tcggagctca aggaactcgg gcccgagccc gctcgccgcg agaaaggccc gaagccgcgg 600
 ccccgccccc tcaccacggc cggcgccccc gccctgtaac ccgcccacca catttctgtc 720
 ctctgcgcgt ggtttgattg ttatatcttc attgtaaat cctgcacccc agggcagggg 780
 30 gctgagacct tccacgcctt gaggaaatcc ggccgcggc aaggccccc tcagcccgcc 840
 agctgagggg tccacgggg caggggaggg aattgagagt cacagacact agaacacgca 900
 gcccgccctc tggggccgcc taccttctgt ggtccactt cagagagggc agaactggaa 960
 gcattttcac cgccttgggg tttaaaggga gcgtgtgtgg agtgggaag tcacgggact 1020
 ggtaagaaa gttgataag attcccccct gcacctgct gccactaga aagcctgagg 1080
 35 cgtgcccaga gcacaagact gggggcaact gtagatgtgg ttctctgtcc tggctctgcc 1140
 actaaatgc tgtgtaacct tgaactaca aattctcctt cgggacctca atttccactt 1200
 tgtaaaatga ggttggaggt gggatagga tctcgaggag actattggca tatgattcca 1260
 aggaactcag tgccctttga atgggcagag gtgagagaga gagagagaaa gagagagaat 1320
 gaatgcagtt gcaattgatc agtgcccaag tcacttccag aattccagat tgtgatgtcc 1380
 40 tcttctgaca gccaaagatg aaaaacaaac agaaaaaaa aagtaagag tctatttatg 1440
 gctgacatat ttacggctga caaactcctg gaagaagcta tgctgtctcc cagcctggct 1500
 tccccgatg ttgtgtacc tcacccctc catctcaag aataacatc atccattggg 1560
 gtagaanaag agagggctcc aggttgggtg gagggataga aatcacatcc gccccaactt 1620
 cccaaagagc agcatccctc ccccgaccca tagccatgtt ttaaagtcac cttccgaaga 1680
 45 gaagtgaagc gttcaaggac actggccttg caggcccgag gggcagcca tcacaaactc 1740
 acagaccagc acatcccttt tgagacacg ccttctgccc accactcacg gacacatttc 1800
 tgcttagaaa scagcttctt actgctctta catgtgtagg catatcttac actaaaagaa 1860
 tattattggg ggaaaaaacta caagtgtctg acatagtctg agaaactgca gaggcataata 1920
 ctgccaccca aaaaactttt tgaatatcat ttccagacaa cctcttactt tctgtgtagt 1980
 50 ttttaattgt taataaaaaa aagtttttaa cagaagcaca tgacatatga aagcctgcag 2040
 gactggctgt ttttttgga attcttccac gtgggacttg tccacaagaa tgaaagtagt 2100

WO 01/98491

2

PCT/EP01/06795

```

ggtttttaaa gagttaagtt acatatattat tttctcactt aagttattta tgcaaaagtt 2160
tttctgttag agaatgacaa tgtttaattt gctttatgaa ttaacagtct gttcttcag 2220
agttccagaga cattgttaat aaagacaatg aatcatgaaa aaaaaaaaaa a 2271
5      <210> 2
      <211> 213
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens
10     <400> 2
      Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
          1           5           10          15
      Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
          20           25           30
15     Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
          35           40           45
      Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
20           50           55           60
      Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
          65           70           75           80
25     Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
          85           90           95
      Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
          100          105          110
30     Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
          115          120          125
      Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
35           130          135          140
      Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
          145          150          155          160
40     Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
          165          170          175
      Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
          180          185          190
45     Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
          195          200          205
      Leu Glu Asn Ala Tyr
50           210
      <210> 3
      <211> 7099
      <212> DNA
      <213> Homo sapiens
55

```

WO 01/98491

3

PCT/EP01/06795

<400> 3
 5 ggagctatgg aaggcttttg agcaggggag tgatacaatg agaacagcat ttggaagcc 60
 agcatggagg ggaggctgct aaaaggatag aaggctggag ttattaccat gccctgggtg 120
 aagaastgag gtctgtgttt ggaagggaag ggataaacat gacttttcaa aggaagacat 180
 aattggccaca agggccacca gagagcagtc aaagggtgtg ccaaggtttg agctctagt 240
 accaagagaa ggtgtctaac tttagacaga atgagctcat gttgtgttga caaaatgaga 300
 ccacatctct tcgtgtcatga ttcatgtct ttattacaa tgtctctgga ctctggaaga 360
 acagactggt aattcataaa gcaatattaa catgttcatt ctctacaaga aaactcttg 420
 10 cataaataac ttaagtga aaataaata gtacttaac tctttaaaa ccactactt 480
 cattctgtg gatcagtcac agtgggaaga attgccaata aaacgaccag tctgagagg 540
 ttctcatgt catgtgtctc ttttttttt taacatttaa aaactacaca 600
 gaagtaaga ggtgtgtctg aaatgatttt caaaaagatt ttgggtggc agctattatg 660
 ctctgagctt tctcagcata tgtacagcac ttgtagtttt tccccaata atattctttt 720
 agtctaagat atgcatcac atgtaagagc agtaagaagc tgtttcttag gcgaatatg 780
 15 gtccgtgagt ggtgggcaga aggggtgtc tcaaaaggga tgtgtgtgtc tgtgagttg 840
 tgatggctgc tccctcgggc ctgcaaggcc agtgccttg aacctttcac ttctctcgg 900
 aaggtgactt taaaacatgg ctatgggtcg ggggagggat gctgctcttt ggggaagtgg 960
 ggcgagtgtg attctctacc ctcccacac cctcgagcc tctcttttc taccoccatg 1020
 20 gatgatgta ttcttttag atggagggtg ggaggtagcc aaacatccgg ggaagccagg 1080
 ctgggaagca gcatagcttc ttccaggagt ttgtcagccg taatatgtc agccataat 1140
 agactcttta ctttttttt tctgtttgtt ttcatcttt gctgtctaga agagagcatc 1200
 acaactctga attctggaag tgacctggc actgaatcaa tgcactgca ttcatctct 1260
 ctctctctct ctctctctct cactctgccc cattcaaaag gcaactggat ccttggaaatc 1320
 25 atatgccaat agtctctctg agatctatt cccactcca cctcatctt acaaatggga 1380
 aatggaggtc ccgaaggaga atbtgttagt tcaaggttac acagcaagtt agtggcagag 1440
 ccaggactag aaaccacatc tacagtgtcc ccaagtctg tgcctggggc acgctcagg 1500
 cttctgtatg ggcagcgagg tgcaaggggg aatcttatcc aactttctta accagtcct 1560
 ggaactttccc actcccacac cgtctcttta aaacccagg cgggtgaaaa tgcctccatt 1620
 tctgctctct ctgaagtggg accagcaaaag gtaggcgccc ccagagccgg ggtcggtgg 1680
 30 ctcaagtgtc gtgactctca attcctccc ctgcccgtg ggaacctca gctgcccggc 1740
 tgaagggggc ctgcccggc ccggggtatc ctgagggcct ggaaggtctc agcccctgc 1800
 cctgggttgc aggcatttac aatgaatat aaacaatcaa accacgcgca gaggacagaa 1860
 atgtaggggc cgggttcagg gccggggcgc ccggcggtg ggaaggcgcc gggcggttc 1920
 tagtaggcgt tctcagctc ggctgtgtg gctttgggc tccggggcgc ggcgcgcgc 1980
 35 ttccggccct tctgcccgc agcgccctcg gtcccgaagt gcttcgaagt ccttgagctc cgaactggtg 2040
 tgaagcggg tgaggcgctt gcaattgcaac gaggccacca ggcgcacatt gcgcgcgcgc 2100
 ggcgcctcac caccgggaca cagcagctgc acgctgtcg cgcggtacg gtccgggatg 2160
 cagcgggaag cggccctact aggtcgccac cacttgccgc ggcgcagtc gttgggcagc 2220
 aggcgcgcgc ggcgcactg gcgggagcac accagctcgg tgaccggctt ggcgctgcgc 2280
 40 cagggcccat cgttcacgta gcgggtgaag tgagctcgc gcagcgtga ctgcgacag 2340
 tctgtggaga gaggcgcgcg tgagggtgac cggccgctg gccacccctg cctgggaccg 2400
 gccgctctct ctccacccca gccctgcttt tgccaagcct gctccagag gcttttgccc 2460
 ctgaacatct attgcaggaa ggtccagat gctctagag tgggtgaaag ctctctgcgc 2520
 caccctgtcc cctcgagcc aaatgactgc tggggttcaa acacacagggc tccatcgctc 2580
 45 actgcagggt tcatcttggg caagtctctt aacctctctc ttcttctgt ctgcaaaatg 2640
 ggcgcgccca agcatttgga gttaatccat tacacacgca atgcaaaaa taccatttgg 2700
 cacatatagc tgaagcgctc ggtgttatg tattattatt atcatttctc ttctgggggtc 2760
 ttcttatgat ttaagccaca ctgtgtccgc agggctccctg gcttgggcag ggttaagtact 2820
 cagcacacct tctgctggc tctgtctct cccaaattcc ttttcagcc acttggggag 2880
 50 ggtggacagg ggttggaaga aggagtagag gttaattgaa ggtataaat cagggcagct 2940
 gctgtggagg cgaaggactg aaggggagg gtatcaggaca ggaattcaat agacttgaaa 3000
 ggaatcaaa gcactgtgtc caacccctcc attatcaatg agaattctga ggcagacca 3060
 ggaataaaga cttgcccaca aggcgtggct gcatctccgc actccacttc cctggggctc 3120
 cagcaccttt tggtccggc aagagtgagg gctctgctgt cagactacca tgggaggctg 3180
 55 ggctggggga tggagctgag ggtgctttt tactgtctgt acttctctac cataggggccc 3240
 ctgagctctg acccaaaac tacagggtca gctgccacaa acattgacct ggtctctgc 3300
 tgggacattt tctgttctg tgatatctga atggcgccct catgggtgata ctccctgggc 3360

WO 01/98491

4

PCT/EP01/06795

aggcagagat tgggctccga ggccctggcct gatccctgc acacaccttg accatgtctc 3420
 ctatgggtgga cttagatggg tgggagcttt ttaaatagct ggtcgtcgtg tgagtaccag 3480
 tccaccccga aaggtttcat ggggatagtt ccaatgtac aagaagaat gaataatagt 3540
 cttaaagacca aaccagagag gggacagaga aggcacccc ccaccccac tctgaagagc 3600
 aagcacagca ggggagatgt ggccactgcc atcgtctggg gctcgtttct ggtcgtgggg 3660
 ctggttttga tcttcacctc tgcagggtct gaatgtgtgt gtggtcaggg gggcatttgc 3720
 ccagggaagg gggcattttg cggcttttgc agaatacgc ccctaggcca ggcacttctc 3780
 ctgcagatca tgacttttgt ttgagcatgt ggtctctca ggggctctgg cctcgtctgg 3840
 gactccagca aggtgacatc ttgtgtttgt ggttctctac agccctctag gcagtgcgtg 3900
 gagccacgct gaacttgctt agaggggag ctgtgggggg aggcctcctt gttctccatt 3960
 ttgaagacgg aggttctctg ctggcctccc atgcagttgc ccttttttag accccatagt 4020
 cccaacaggt tgtgagggcg gggaggtctg ggtccaggg cctgggcagt ggaacttctc 4080
 gccacattga taatggcctg aggcacggga agctcttagt ctgaagtgtc atttcagagc 4140
 ccccatlgtc ctacagatbc ctgccaatta tagagccaga tgcacagtct cacttgggct 4200
 tctctgtgca ggcctgacca ggaacccagg gtctctcttc ctctctcttc ccttggagtg 4260
 aggcgaaggtt gggactgggg tggctgtgta ggcagatgtc cctactcctt gcacagagga 4320
 tgcgtctctc cctccagggg cctggactca gctgcacca tgcacagggc taataactgtg 4380
 ccgaaaaactc ccatctcttc aagtgccagc tccctgggca ggcactgggc aatgcacact 4440
 gcaaggggtgc ctctctggcc tctctcccca ctgctttgtg gagatctgtc cccacacccc 4500
 cccacacacac cagggtctatc ttgcagtggg atcaaacagg gttcaacact cagctctctc 4560
 cactacacag ttaactgagt cctggaaact gtttctctcc cttgcagctg ggggttccac 4620
 tctctgggat tcaatgatgt ggggtctgtg ggtggggaca gccacaccca gcataagagt 4680
 tccgtgtccc caacgtgtct gttctgtgta tgggaggtct ccttaacctg ttcccttccc 4740
 agtggatcca gcaagtgagc gtggctctca tatteccagg agggatctct ttgaaacctt 4800
 ttctttctct agccctgagc cctgttctga tgccttgatg ccataccctc accacccccc 4860
 cgtctctccc gcccctgggt ctcaccagcg tctgttgcct catgctctcg cacttgaatt 4920
 tgaaggtctc accagcgagc catctctccc ccacctccag gcaagactgt tcttcgacca 4980
 gtgctggcag aggcacagca tcttacttgg gtctacccca gtcttccaa cctcccaag 5040
 agaagttctc aaaaacctcc caggatcttt tactaagaat tctctctcc accccatacc 5100
 tttgtctcca aagggttgtt ggggagggcg cctctcgttc tccgcccggg tcatgggtct 5160
 gttgttctcc agctccgttg gaggctcggg gtactctcgg agctcgggga tgatttctct 5220
 ggcatcattc ttgaacgctt gccacccctg gcctccact acacggaaag ctgtgtgtac 5280
 cagcaggcag acgagacaca gggccagctg gactgtcatg gtaccgcca gaggagggca 5340
 cgcacacttc cagtgcacca ggtctgtgta tccagccag acacggctgc ctttttaag 5400
 cccctctctg ctctatgcca gccaatgagg acaggctggg gcagggtctg tcccatgttt 5460
 cccctcagcc cggagggaag gaaagggtgt tgcacagagc aaacctccc caaagacttc 5520
 tctctagctc cagcaaacct ccaaatgtct gctggcactc ccaggtgacc cagagagagg 5580
 gggcgtgtga ggcacagccc aagcctgtct tccggcactc cccacgtgct ggcggctgtg 5640
 gtttccagat atccaaatga gctccggttt ttaattgtct gttccctgtg gccctggggc 5700
 attctcaaaa cnaactgttg acccgtcca caaagaaaat gtgcagttct gactgtcttg 5760
 cggggctlgag cccggcctat tcatcttcac aggcacagtt catttgtcac cccacacaca 5820
 aatggcccaa ggtgtttctg tttagacccc atagacccag ccagaggcca aaagatgctt 5880
 tttaagaaat ccatgtgttc ccaactccac aagtctcagc altcatgttc ctaaccaaga 5940
 aagcctctct tggatctctc tgaaggcaa gagagagaac tagagggtca gagcaagggt 6000
 gcccgcttgg gagagagggc aggatcttgg ttacaaatcg agyatgcgt ggtcactcag 6060
 gctcctgtga tggacagcac agaggaaatc ccagctcatg ctctccaggc atcctgtgca 6120
 ctgtgacagg cactcttgag ccaggggcact cactgtggtc cgcagggtga tgtgtgaag 6180
 acagtcatct ccccaaccag tctgtgtgtg tgaagagaca acaccaaat cctttctcta 6240
 gcaaaagcca cagccacgtt ttttagtctg gacattttat ttcttgtct tccagctggt 6300
 gatgtgttcc atgaagccat cccaggacca actggtcaca aagaagctaa gagaaaaatc 6360
 tgccttggcc ctgcataata tgaaccacac agggccgggg cggggggggg gggcgaggt 6420
 agaggcgttg gggagaagga ttcacacctg aggtgcaaga agagaagga aggccagagg 6480
 aatctttcat tgaagacaga ttgtttgagg acaagcagct cctgtgaaga ggtcgcccag 6540
 atcctctggt attttaactg ggcnaatgat cagcatgccc cacttgacga gccctgtgca 6600
 gtcctttgac acctgctcca acttgcaagt cgtctgttcc atctgcagcc gactgtcctt 6660
 tccatcatcc atcatccgac acatgaatgc agctgtctcg acagttttac aagccagaca 6720

WO 01/98491

5

PCT/EP01/06795

gaagccccct caggaagggc cctctctgat acctgettec taagtcagtt tccttcaggg 6840
 cagatgaaaa cagctgtggc catgtttggg ggtgatctat ctctccagc agagccggt 6900
 gtgtttgtgag aagctggccc tcgcaccac ctcctctgt ctatgacct ccagctccct 6960
 ttccctctgc tctggaatgt ggaactgttaa cctctctatg accagacgac tgcctctctg 7020
 caatggactt gggagagagc agttctgatg cctgggttcc ttgagcaggt aggatggatg 7080
 cttatagccc cactctgtg 7099

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
 natural origin

<400> 4
 tctgtttgtt ttctatcttt ggcgtgc 27

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
 natural origin

<400> 5
 accttcacgg cctgaggea tcc 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
 natural origin

<400> 6
 cactggccgg agcacaccag ctc 23

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
 natural origin

<400> 7
 acctgcggc acaagtgtg c 21

WO 01/98491

6

PCT/EP01/06795

5 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

10 <400> 8
ctgagctctg acccaaaacc 20

15 <210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

25 <400> 9
caccttgctg gactccacc 19

30 <210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

35 <400> 10
ggcacttcct ctgcagatca tg 22

40 <210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

50 <400> 11
cagggagctg gcactgaag g 21

55 <210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 01/98491

7

PCT/EP01/06795

5 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

10 <400> 12
cctccagggc ctggactcag c

15 <210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

25 <400> 13
gaagaatggc tcgctggtcg agc

30 <210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

40 <400> 14
gctctcacca ggcctctgttg c

45 <210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

55 <400> 15
gggagggttt gctctgagca c

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

21

23

21

21

WO 01/98491	8	PCT/EP01/06795
	<400> 16 ggacaggctg gggcagggct	20
5	<210> 17 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
10	<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin	
15	<400> 17 gaatcctgcc ctctctccca agc	23
20	<210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
25	<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin	
30	<400> 18 aagagtcctat ttatggctga c	21
35	<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
40	<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin	
45	<400> 19 tcctgcaggc tttcatatgt	20
50	<210> 20 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
55	<220> <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin	
	<400> 20 gttttaaacga gaagcacatg ac	22
	<210> 21	

WO 01/98491

9

PCT/EP01/06795

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

10 <400> 21
gagtgatata atgagaacag c 21

15 <210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

20 <400> 22
ggacaggctg gggcagggct 20

25 <210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

35 <400> 23
gaatcctgccc ctctctccca agc 23

40 <210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no
natural origin

50 <400> 24
ctcttggtat tctctggaag g 21

55 <210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no

WO 01/98491		PCT/EP01/06795
	10	
	natural origin	
	<400> 25	
5	gcctcttcac aggagctgc	19
	<210> 26	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no	
	natural origin	
15		
	<400> 26	
	aggattcaca cctgaggtgc	20
	<210> 27	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
25	<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no	
	natural origin	
	<400> 27	
30	ataagcatcc atectacctg c	21

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/098491 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, A61P 19/08 VICKERY, Brian, Henry [GB/US]; 27977 Via Ventana, Los Altos Hills, CA 94022 (US).

(21) International Application Number: PCT/EP01/06795 (74) Common Representative: WITTE, Hubert; 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle (CH).

(22) International Filing Date: 15 June 2001 (15.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00112867.7 19 June 2000 (19.06.2000) EP

(71) Applicants (for all designated States except US): E. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle (CH). UNIVERSITAIRE INSTELLING ANTWERPEN (U.I.A.) [BE/BE]; Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk (BE).

(81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CI, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BALEMANS, Wendy [BE/BE]; 30 Prins Boudewijnlaan bus 3, B-2610 Antwerpen (Wilrijk) (BE). EBELING, Martin [DE/DE]; 1 Heideggerstrasse, 79639 Grenzach-Wyhlen (DE). FOERNZLER, Dorothee [DE/CH]; 4 Rathhausgasse, CH-5600 Lenzburg (CH). PATEL, Neela [US/US]; 512 Old 1st Honda Road, Woodside, CA 94062 (US). VAN HUL, Wim [BE/BE]; 2 Heesterweg, B-3191 IJever (BE).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 2 October 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/098491 A3

(54) Title: OSTEOLEVIN GENE POLYMORPHISMS

(57) Abstract: The present invention relates generally to genetic polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region. In particular, the present invention relates to genetic polymorphisms in the Van Buchem-sclerosteosis disease region that are associated with disorders resulting in either net excess bone formation or insufficient bone formation in humans. Furthermore, isolated nucleic acid molecules encoding human osteolevin are provided. Osteolevin polypeptides are also provided as are vectors, host cells and recombinant methods for producing the same.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/06795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 A61P19/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 32773 A (DARWIN DISCOVERY LTD ; GALAS DAVID J (US); BRUNKOW MARY E (US); MUL) 8 June 2000 (2000-06-08) the whole document	1-10, 12-25
Y	BALEMANS WENDY ET AL: "Localization of the gene for sclerosteosis to the van Buchem disease-Gene region on chromosome 17q12-q21." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 64, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 1661-1669, XP002221634 ISSN: 0002-9297 the whole document	2,3,8,9

	-/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 November 2002		Date of mailing of the international search report 27.02.2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstrasse NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2010, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hagermaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Final Application No PCT/EP 01/06795
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BALEMANS W ET AL: "INCREASED BONE DENSITY IN SCLEROSTEOSIS IS DUE TO THE DEFICIENCY OF A NOVEL SECRETED PROTEIN (SOST)" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 5, 2001, pages 537-543, XP001058218 ISSN: 0964-6906 the whole document	1-10, 12-25
P,X	BRUNKOW M E ET AL: "BONE DYSPLASIA SCLEROSTEOSIS RESULTS FROM LOSS OF THE SOST GENE PRODUCT, A NOVEL CYSTINE KNON-CONTAINING PROTEIN" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, CHICAGO, IL, US, vol. 68, no. 3, 2001, pages 577-589, XP001052847 ISSN: 0002-9297 the whole document	1-10, 12-25
P,X	WO 00 55193 A (ECONOMIDES ARIS N ; REGENERON PHARMA (US)) 21 September 2000 (2000-09-21)	1,4-7, 10,12-25
P,Y	See human DAN/Cerberus-related protein 6 (hDCR6) gene the whole document	2,3,8,9
P,X	WO 00 75317 A (GENENTECH INC ; GODDARD AUDREY (US); GURNEY AUSTIN L (US); SMITH VI) 14 December 2000 (2000-12-14) See sequence 19 and sequence 20, "PRO7476" the whole document	1,4-7, 10,12-25
E	WO 02 24888 A (GODDARD AUDREY ; STEPHAN JEAN PHILIPPE (US); BAKER KEVIN P (US); EA) 28 March 2002 (2002-03-28) See Pro peptide #32 the whole document	1,4-7, 10,12-25
E	WO 01 92308 A (AMGEN INC ; GAO YONGMING (US); PASZTY CHRISTOPHER J (US)) 6 December 2001 (2001-12-06) See "human cloaked-2 polypeptide" the whole document	1,4-7, 10,12-25

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/06795
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	BALEMANS W ET AL: "Lack of association between the SOST gene and bone mineral density in perimenopausal women: analysis of five polymorphisms." BONE. UNITED STATES OCT 2002, vol. 31, no. 4, October 2002 (2002-10), pages 515-519, XP002221636 ISSN: 8756-3282 the whole document -----	1-10, 12-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 01/06795
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. ☒ Claims Nos.: 26-28 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 3, 4, 7, 24, 25 (all partially) 2, 5, 6 (all completely)	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially) 2,5, 6 (all completely)

Invention 1:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTV3UT-F and the reverse primer OSTV3UT-R.

2. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 2:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVint-F1 and the reverse primer OSTVint-R1.

3. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 3:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVint-F3 and the reverse primer OSTVint-R3.

4. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 4:

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVint-F4 and the reverse primer OSTVint-R4.

5. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 5:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVint-F5 and the reverse primer OSTVint-R5.

6. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 6:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVex1-F and the reverse primer OSTVex1-R.

7. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 7:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTV5UT-F and the reverse primer OSTV5UT-R.

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 8:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTV3gen-F1 and the reverse primer OSTV3gen-R1.

9. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 9:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTV3gen-F2 and the reverse primer OSTV3gen-R2.

10. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 10:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTV5UT-F and the reverse primer OSTV5UT-R.

11. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 11:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVprom-F1 and the reverse primer OSTVprom-R1.

12. Claims: 1,3,4,7,24,25 (all partially)

Invention 12:

Method and kit for screening for osteolevin polymorphisms or the presence of a heritable linked form of abnormal bone formation in a subject, said method comprising determining the presence of a polymorphism in the osteolevin nucleic acid sequence obtained from the subject, wherein the polymorphism is characterized as an insertion, deletion, substitution or a repetitive nucleotide sequence and wherein a PCR product is amplified with the forward primer OSTVprom-F2 and the reverse primer OSTVprom-R2.

13. Claim : 8 (completely)

Invention 13:

A method of identifying a patient's susceptibility to a pathology associated with abnormal bone formation comprising the step of determining a genetic polymorphism pattern for a osteolevin nucleic acid sequence obtained from the patient and comparing the patient's genetic polymorphism pattern and the wild type osteolevin sequence, wherein differences between the patient's genetic polymorphism pattern and the wild type sequence indicate a susceptibility to the pathology.

14. Claim : 9 (completely)

Invention 14:

A method of identifying a polymorphism associated with abnormal bone formation in one or more subjects, comprising comparing a osteolevin sequence isolated from the subjects to a known wild type osteolevin sequence and identifying a recurrent polymorphism in the osteolevin sequence isolated from the subjects being associated with abnormal bone formation.

15. Claims: 10 (completely) 12-19,21-23 (all partially)

Invention 15:

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A nucleic acid molecule encoding osteolevin, said nucleic acid molecule being selected from the group consisting of

- a) the nucleic acid molecule or a complement of the nucleic acid molecule set forth in SEQ ID NO. 1
- b) a nucleic acid molecule or a complement of a nucleic acid molecule encoding a polypeptide set forth in SEQ ID NO. 2
- c) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to a nucleic acid molecule of above a) or b), as well as a vector, comprising such a nucleic acid molecule and a host cell transfected with such a vector; a recombinant osteolevin polypeptide encoded by such a nucleic acid molecule and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a pharmaceutically effective amount of such a polypeptide; method of preparing a recombinant osteolevin polypeptide and an antibody which binds specifically to such a recombinant osteolevin polypeptide.

16. Claims: 11-19,21-23 (all partially)

Invention 16:

A nucleic acid molecule encoding osteolevin region polymorphisms comprising the nucleic acid as defined by nucleotide position 4'000 11'000 in EMBL ACCESSION NO. AC003098, Release 62.0, or parts thereof, with G to A at position 6136, as well as a vector, comprising such a nucleic acid molecule and a host cell transfected with such a vector; a recombinant osteolevin polypeptide encoded by such a nucleic acid molecule and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a pharmaceutically effective amount of such a polypeptide; method of preparing a recombinant osteolevin polypeptide and an antibody which binds specifically to such a recombinant osteolevin polypeptide.

17. Claims: 11-19,21-23 (all partially)

Inventions 17-39:

A nucleic acid molecule encoding osteolevin region polymorphisms comprising the nucleic acid as defined by nucleotide position 4'000 11'000 in EMBL ACCESSION NO. AC003098, Release 62.0, or parts thereof, with C to T at position 6140, as well as a vector, comprising such a nucleic acid molecule and a host cell transfected with such a vector; a recombinant osteolevin polypeptide encoded by such a nucleic acid molecule and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a pharmaceutically effective amount of such a polypeptide; method of preparing a recombinant osteolevin polypeptide and an antibody which binds specifically to such

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

a recombinant osteolevin polypeptide.

...idem for inventions 18-39 wherein each invention comprises one of the specific polymorphisms as listed in claim 11.

18. Claim : 20 (completely)

Invention 40:

A method for screening for regulators of osteolevin activity or osteolevin induced activity, said method comprising the step of : a) determining the expression level of a reporter gene or downstream signaling molecule such as intracellular calcium which is modulated by osteolevin in a particular cell type, b) contacting the cell with a candidate agent, c) determining the expression level of the reporter gene or downstream signaling molecule in response to the candidate agent; and d) comparing the first expression level of the reporter or the downstream signaling molecule with the expression level observed in response to the candidate agent, wherein an alteration indicates that the candidate agent modulates osteolevin activity.

International Application No. PCT/EP 01/06795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 219

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 26-28

~~Present claims 26 and 27 relate to a product defined by reference to a~~
desirable characteristic or property, namely regulating osteolevin activity or osteolevin induced activity. The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search for these claims is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search for these claims impossible. Consequently, no search has been carried out for these claims.

Present claim 28 lacks clarity (Article 6 PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/06795

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0032773	A	08-06-2000	AU 2031300 A	19-06-2000
			BR 9915679 A	05-03-2002
			CN 1333828 T	30-01-2002
			EP 1133558 A1	19-09-2001
			JP 2002531090 T	24-09-2002
			WO 0032773 A1	08-06-2000
			US 6395511 B1	28-05-2002
			US 6495736 B1	17-12-2002
			US 6489445 B1	03-12-2002
WO 0055193	A	21-09-2000	AU 3511100 A	04-10-2000
			WO 0055193 A2	21-09-2000
WO 0075317	A	14-12-2000	AU 4851900 A	28-12-2000
			EP 1185642 A2	13-03-2002
			JP 2003501087 T	14-01-2003
			WO 0075317 A2	14-12-2000
			AU 3774300 A	18-12-2000
			AU 5152700 A	02-01-2001
			EP 1210418 A1	05-06-2002
			EP 1208195 A2	29-05-2002
			WO 0073454 A1	07-12-2000
			WO 0077037 A2	21-12-2000
			US 2002177165 A1	28-11-2002
WO 0224888	A	28-03-2002	AU 1661002 A	02-04-2002
			WO 0224888 A2	28-03-2002
			AU 2055401 A	12-06-2001
			AU 2590901 A	03-07-2001
			AU 3434601 A	12-06-2001
			AU 6531101 A	17-12-2001
			AU 7197301 A	05-02-2002
			AU 7315001 A	30-01-2002
			EP 1250426 A2	23-10-2002
			EP 1240325 A2	18-09-2002
			EP 1234036 A2	28-08-2002
			US 2002182673 A1	05-12-2002
			US 2002192209 A1	19-12-2002
			US 2002119130 A1	29-08-2002
			WO 0140466 A2	07-06-2001
			WO 0146420 A2	28-06-2001
			WO 0193983 A1	13-12-2001
			WO 0200690 A2	03-01-2002
			WO 0208288 A2	31-01-2002
			WO 0208284 A2	31-01-2002
			US 2003009012 A1	09-01-2003
			US 2003009013 A1	09-01-2003
			US 2003027992 A1	06-02-2003
			US 2002183493 A1	05-12-2002
			US 2003027993 A1	06-02-2003
			US 2003027212 A1	06-02-2003
			US 2002183505 A1	05-12-2002
			US 2002182638 A1	05-12-2002
			US 2003027986 A1	06-02-2003
			US 2002183494 A1	05-12-2002
			US 2003018168 A1	23-01-2003
			US 2003013855 A1	16-01-2003
			US 2003022239 A1	30-01-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/06795

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0224888	A	US 2003022328 A1	30-01-2003
		US 2003022331 A1	30-01-2003
		US 2003017563 A1	23-01-2003
		US 2003006815 A1	09-01-2003
		US 2003003546 A1	02-01-2003
		US 2002177188 A1	28-11-2002
		US 2003004102 A1	02-01-2003
		AU 6802801 A	24-09-2001
		AU 7011801 A	04-03-2002
		AU 3490601 A	04-03-2002
		AU 8678501 A	04-03-2002
		EP 1259614 A2	27-11-2002
		WO 0216429 A2	28-02-2002
		WO 0216581 A2	28-02-2002
		WO 0216602 A2	28-02-2002
		WO 02070706 A2	12-09-2002
		US 2003008348 A1	09-01-2003
WO 0192308	A	AU 6519801 A	11-12-2001
		WO 0192308 A2	06-12-2001
		US 2002106650 A1	08-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 Q 1/68	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CO,CU,CZ,DE,DK,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100108774

弁理士 橋本 一憲

(72)発明者 バレマンズ ウェンディ

ベルギー国 アントウェルペン プリンス ボーデウィジラン バス 3 3 0

(72)発明者 エベリング マーチン

ベルギー国 グレンザッチェーウィンヘレン ハイデッガーシュトラッセ 1

(72)発明者 フォエルンチェラー ドロシー

スイス国 レンツバーク ラスハウスガッセ 4

(72)発明者 パテル ニーラ

アメリカ合衆国 カルフォルニア州 ウッドサイド オールド ラ ホンダ ロード 5 1 2

(72)発明者 バンハル ウィム

ドイツ連邦共和国 ヒーバー ヘッシュターウェグ 2

(72)発明者 ビッケリー ブライアン ヘンリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アルトス ヒルズ バイア ベンタナ 2 7 9 7 7

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 GA11 HA12

4B063 QA12 QA19 QA20 QQ02 QQ42 QR32 QR55 QS34 QX01

4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 BA21 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 AA17 BA22 BA44 CA53 ZA96 ZA97

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 EA50 FA74