

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5346216号
(P5346216)

(45) 発行日 平成25年11月20日(2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月23日(2013.8.23)

| | | |
|----------------|-----------|--------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 | |
| A 61 K 38/00 | (2006.01) | A 61 K 37/02 Z N A |
| A 61 K 48/00 | (2006.01) | A 61 K 48/00 |
| A 61 K 31/7088 | (2006.01) | A 61 K 31/7088 |
| A 61 K 39/395 | (2006.01) | A 61 K 39/395 N |
| A 61 P 19/08 | (2006.01) | A 61 P 19/08 |

請求項の数 13 (全 26 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2008-557821 (P2008-557821) |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年3月6日(2007.3.6) |
| (65) 公表番号 | 特表2009-532334 (P2009-532334A) |
| (43) 公表日 | 平成21年9月10日(2009.9.10) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/GB2007/000772 |
| (87) 國際公開番号 | W02007/101988 |
| (87) 國際公開日 | 平成19年9月13日(2007.9.13) |
| 審査請求日 | 平成22年3月3日(2010.3.3) |
| (31) 優先権主張番号 | 0604460.6 |
| (32) 優先日 | 平成18年3月6日(2006.3.6) |
| (33) 優先権主張国 | 英國(GB) |

(73) 特許権者 505395858
ザ・ユニバーシティ・オブ・マンチェスター
THE UNIVERSITY OF MANCHESTER
英國エム13・9ピーエル、マンチェスター
一、オックスフォード・ロード
(74) 代理人 100096024
弁理士 柏原 三枝子

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨粗鬆症の治療のための薬品の製造における、腫瘍壞死因子刺激遺伝子 (TSG-6) ポリペプチド又はTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 2】

前記TSG-6ポリペプチドが、
(a) 配列番号2のアミノ酸配列；
(b) 前記配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも97%の同一性を有し、NF-B受容体活性化因子(RANKL)との結合活性を有する(a)の変異体；又は、
(c) RANKLとの結合活性を有する(a)又は(b)の断片を含む、請求項1に記載の使用。 10

【請求項 3】

前記ポリペプチドが配列番号2、5、又は9に示す前記配列からなる、請求項2に記載の使用。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが、
(a) 配列番号1若しくは8のコーディング配列；
(b) (a)に示された配列に対し遺伝コードの結果により縮重している配列；
(c) (a)若しくは(b)に示された配列と少なくとも99%の同一性を有し、RANKLとの結合活性を有するポリペプチドをコードする配列；又は、

(d) RANKLとの結合活性を有するポリペプチドをコードする、(a)、(b)若しくは(c)に示すいずれか1の配列の断片を含む、請求項1に記載の使用。

【請求項5】

前記ポリヌクレオチドが配列番号1、4、又は8に示す核酸配列からなる、請求項4に記載の使用。

【請求項6】

前記薬品が、薬学的若しくは予防医学的に有効な量のオステオプロテゲリン(Osteoprotegerin)(OPG)ポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は該OPGの模倣体であるAMG-162と併用して投与される、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の使用。

10

【請求項7】

前記OPGポリペプチドが、
(a)配列番号15のアミノ酸配列；
(b)配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも99%の同一性を有し、RANKLとの結合活性を有する(a)の変異体；又は、
(c)RANKLとの結合活性を有する(a)若しくは(b)の断片を含む、請求項6に記載の使用。

【請求項8】

前記OPGポリペプチドが配列番号15の前記配列からなる、請求項7に記載の使用。

【請求項9】

前記OPGポリヌクレオチドが、
(a)配列番号14のコーディング配列、
(b)(a)に示された配列に対し遺伝コードの結果により縮重している配列；
(c)(a)若しくは(b)に示された配列と少なくとも99%の同一性を有し、RANKLとの結合活性を有するポリペプチドをコードする配列；又は、
(d)RANKLとの結合活性を有するポリペプチドをコードする、(a)、(b)若しくは(c)に示すいずれか1の配列の断片を含む、請求項6に記載の使用。

20

【請求項10】

該TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドが長いペントラキシン3(PTX3)と併用して投与されない、請求項1ないし9のいずれか1項に記載の使用。

30

【請求項11】

骨粗鬆症を治療又は予防する薬品の製造における、
(a)TSG-6ポリペプチド、又はTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
(b)OPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は該OPGの模倣体であるAMG-162；
の使用。

【請求項12】

骨粗鬆症の治療又は予防における、同時、個別又は逐次的使用のための、
(a)TSG-6ポリペプチド、又はTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
(b)OPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は該OPGの模倣体であるAMG-162；を含有する製剤。

40

【請求項13】

(a)TSG-6ポリペプチド、若しくはTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は
(b)OPGポリペプチド、若しくはOPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
若しくは該OPGの模倣体であるAMG-162のうちの1つ；
を同時、個別又は逐次的に投与し、(a)及び(b)の併用により骨粗鬆症を治療又は予
防するための薬品の製造における、(a)及び(b)の使用。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療又は予防するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壞死因子 (TNF) 刺激遺伝子 6 (TSG-6) は関節炎の保護機能を有する炎症に誘導されるタンパクである。TNF 刺激遺伝子 6 の、~35 キロダルトンの分泌産物である前記 TSG-6 は、炎症誘起物及び成長因子に呼応して発現されるが、健康な組織においては前記タンパクは殆んど全く発現しないことが知られている (Milner & Day (2003) *J. Cell Sci.* 116, 1863-1873)。

【0003】

TSG-6 は炎症に対応して誘導されるが、抗炎症性及び関節保護特性を有し、関節損壊に対する内在的抑制材とされている。この点に関して TSG-6 は、好中球移動の抑制、プラスミン活性の下方制御、及びヒアルロン酸 (hyaluronan) (HA) 鎮のクロスリンク等、すべてその関節保護特性に寄与するであろう広範な生物学的活性を有することが知られてきた (Wisniewski et al., (1996) *J. Immunol.* 156, 1609-1615; 及び Milner et al., (2006) *Biochem. Soc. Trans.* 34, 446-450)。

【0004】

TSG-6 は、隣接する Link 及び CUB_C 領域の殆んどすべてを含み、種々のタンパク及びグリコサミノグリカン リガンド (HA、コンドロイチン-4-硫酸、アグレカン、インタ- - インヒビター (I-I)、ペントラキシン-3、トロンボスpongin-1、フィブロネクチン、及びヘパリン / 硫酸ヘパランを含む) に結合するが、これらの相互作用の大半は、その Link モジュール領域を通じて仲介される。突然変異研究によれば、Link モジュールには少なくとも 3 の非重複リガンド結合表面が存在することが分かった (Mahoney et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 27044-27055; 及び Kuznetsova et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30899-30908)。現在、CUB_C 領域で同定されている唯一のリガンドはフィブロネクチンである (DJ Mahoney & AJ Day, 未発表データ)。

更に、この領域は 2 個のカチオン結合サイトを含んでいる (Rugg et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 25674-25686)。

【0005】

TSG-6 は、リューマチ性関節炎 (RA) 等の炎症性疾病の研究において検出され、関節滑液、軟骨及び滑液に存在する。その発現が培養ヒト軟骨細胞中で TNF、IL-1、IL-6、TGF- 及び PDGF により誘導され得ること、及び RA 患者の滑液細胞により構成的に発現され、その生産が IL-1、TNF 及び IL-17 処理により更に増強されることから、TSG-6 は関節組織で局所的に生産されると見られる (Milner et al., (2006) *Biochem. Soc. Trans.* 34, 446-450)。

【0006】

重要なことには、多くの最近の研究において、TSG-6 が関節炎の実験モデルで保護的な役割を果たしていることが明らかにされた。例えば、コラーゲン誘導関節炎 (CIA; ヒト RA と同様な皮膚病理を伴う自己免疫性多発関節炎) のモデルにおいては、TSG-6 組換えマウス又は組換えヒト TSG-6 により全身的に処理された野生型マウスで発症が遅延し、病状と関節の炎症 / 損壊の双方の軽減がみられた (Mindrescu et al. (2000) *Arthritis Rheum.* 43, 2668-2677; 及び Mindrescu et al. (2002) *Arthritis Rheum.* 46, 2453-2464)。TSG-6 組換え動物では、抗 TNF 抗体処理に比較して改善効果がみられた。更に、軟骨特化 TSG-6 組換えマウスでは、抗体誘導関節炎 (AIA; 単一関節関節炎のモデル) の刺激が、MMP 及びアグレカナーゼ (aggrecanase) によるアグレカン分解の軽減によって、コントロールと比較すると軟骨の損傷を遅延させ、これらの動物では発症後 4 - 5 週で軟骨再生の証拠がみられた (Giant et al. (2002) *Arthr*

10

20

30

40

50

itis Rheum. 46, 2207-2218)。同様な軟骨保護効果が、組換えネズミTSG-6をAIA罹患関節に直接注射、又はプロテオグリカン誘導関節炎に静脈注射した野生型マウスにおいてみられた(PGIA、ヒトRAのモデル)(Bardos et al. (2001) Am. J. Pathol. 159, 1711-1721)。

【0007】

これらの研究で観察されたTSG-6の抗炎症及び軟骨保護効果は、1又は2以上のメカニズムによると思われる。最も重要なことは、TSG-6が好中球の生体内噴出に対する強力な抑制剤であって、プラスミンが例えばそのMMP活性化を通じて、炎症中のタンパク分解のキー制御因子となっている場面で、I₁I₂の抗プラスミン効果を強化することによるプロテアーゼネットワークの抑制に関与していることである(Wisniewski et al. (1996) J. Immunol. 156, 1609-1615; 及びGetting et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 51068-51076)。この点では、TSG-6を欠くマウスは、急速かつ広範な軟骨損傷と骨崩壊によりコントロールより加速的ではるかに激しい形のPGIAを展開する(Szanto et al. (2004) Arthritis Rheum. 50, 3012-3022)。好中球の浸透及びプラスミン効果の増加がTSG-6^{-/-}マウスにおけるこれらの効果を説明していると示唆される。

【0008】

発明の開示

本発明によりTSG-6が破骨細胞による骨吸収を抑制することが示された。破骨細胞は単核白血球マクロファージ系列に由来する大型の多核細胞であり、骨吸収の過程で骨の基質及び鉱物質を分解する。本発明者らは更に、TSG-6ノックアウトマウスにおけるTSG-6の不在が破骨細胞による骨吸収の増加をもたらすことを示した。本発明者らは、TSG-6が破骨細胞による骨吸収に伴う骨疾患又は状態の治療又は予防に有用であることを示した。本発明者らは更に、TSG-6を併用するオステオプロテゲリン(OPG)の投与が相乗的な結果を生ずることを示した。TSG-6及びOPGの併用は、破骨細胞による骨吸収を各要素単独の場合の和より大きく抑制した。

【0009】

本発明に従って、破骨細胞による骨吸収に伴う骨疾病又は状態を治療又は予防するための薬品の製造における、TSG-6ポリペプチド、又はTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。更に好ましい態様では、前記薬品は、治療上又は予防上有効な量のOPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はOPG模倣体と併用して投与される。

【0010】

本発明は更に、対象(者)の破骨細胞による骨吸収に伴う骨疾病又は状態を、必要な場合に治療又は予防する方法を提供するが、その方法は、治療上又は予防上有効な量のTSG-6ポリペプチド、若しくはTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む。更に好ましい態様においては、その方法は、更に治療上又は予防上有効な量のOPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はOPG模倣体を前記対象に投与することを含む。

【0011】

本発明は更に；

破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療又は予防する薬品の製造における、(a)TSG-6ポリペプチド、若しくはTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

(b)OPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド若しくはOPG模倣体の使用、

破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態の治療又は予防における、同時、個別又は逐次的な使用のための、

(a)TSG-6ポリペプチド、又はTSG-6ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

(b)OPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はOP

G 模倣体；を含有する製剤、並びに
破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を、

(a) T S G - 6 ポリペプチド、又は T S G - 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

(b) O P G ポリペプチド、又は O P G ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は O P G 模倣体；を同時、個別又は逐次的に投与し、併用して治療するための薬品の製造における、

(a) 又は (b) の使用；
を提供する。

【0012】

10

本発明の一つの利点は、T S G - 6 ポリペプチド又はポリヌクレオチドは、破骨細胞による骨吸収抑制に加えて、抗炎症性及び／又は軟骨保護効果を持ち得ることである。これらの抗炎症性及び／又は軟骨保護効果は、好中球移動、プラスミン活性の下方制御及び／又は H A 鎖の T S G - 6 仲介によるクロスリンクの結果から生じ得る。

【0013】

20

発明の詳細な説明

本発明は、破骨細胞による骨吸収に伴う骨疾病又は状態を治療又は予防する方法を提供するが、その方法は、治療上又は予防上に有効な量の T S G - 6 ポリペプチド又は T S G - 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを対象に投与することを含む。更に好ましい態様においては、その方法は、更に治療上又は予防上有効な量の O P G ポリペプチド、O P G ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は O P G 模倣体を前記対象（者）に投与することを含む。

【0014】

T S G - 6 ポリペプチド

T S G - 6 ポリペプチドは、好ましくはヒト T S G - 6 、若しくは R A N K L 結合活性を保つヒト T S G - 6 の変異体又は断片である。前記 T S G - 6 ポリペプチドは破骨細胞による骨吸収を抑制する能力がある。前記変異体は靈長類、マウス又はラット等他の生物由来の T S G - 6 ポリペプチドであってもよい。

【0015】

30

前記 T S G - 6 ポリペプチドは、好ましくは、

(a) 配列番号 2 若しくは 5 のアミノ酸配列；

(b) 前記配列番号 2 若しくは 5 のアミノ酸配列と少なくとも 50 % の同一性を有し、N F B 受容体活性化因子 (R A N K L) との結合活性を有する (a) の変異体；又は、

(c) R A N K L との結合活性を有する (a) 若しくは (b) の断片を含む。

【0016】

更に好ましくは、前記ポリペプチドは配列番号 2 若しくは 5 の配列を含むか、又はそれからなる。

【0017】

前記 T S G - 6 ポリペプチドは、更にシグナル配列を欠いていてもよい。従って、T S G - 6 ポリペプチドは、好ましくは：

40

(a) 配列番号 3 若しくは 6 のアミノ酸配列；

(b) 前記配列番号 3 若しくは 6 のアミノ酸配列と少なくとも 50 % の同一性を有し、R A N K L 結合活性を有する変異体；又は、

(c) R A N K L との結合活性を有する (a) 若しくは (b) の断片を含む。

【0018】

更に好ましくは、前記 T S G - 6 ポリペプチドは配列番号 3 又は 6 の配列からなる。

【0019】

前記 T S G - 6 ポリペプチドは更に、C U B _ C 領域を欠いていてもよい。前記 C U B _ C 領域は配列番号 2 又は 5 の 1 2 9 - 2 7 7 残基に相当する。前記 T S G - 6 ポリペプチドはヒト T S G - 6 の L i n k モジュールのみを含むことができる。前記 L i n k モジ

50

ユールは配列番号 2 及び 5 の 37 - 128 残基に相当し、配列番号 7 に示される。前記 L in k モジュールは TSG - 6 とヒアルロナン (HA) との結合活性、コンドロイチン - 4 - 硫酸との結合活性、アグレカンとの結合活性、インター - - インヒビター (I I) との結合活性、ピクニンとの結合活性、ベルシカンとの結合活性、硫酸デルマタンとの結合活性、ペントラキシン 3 との結合活性、トロンボスボンジン - 1 との結合活性、ヘパリン / 硫酸ヘパランとの結合活性及び RANKL との結合活性の要因である。従って、前記 TSG - 6 ポリペプチドは好ましくは：

- (a) 配列番号 7 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 50 % の同一性を保ち、RANKL との結合活性を有する配列番号 7 のアミノ酸配列の変異体；又は
- (c) RANKL との結合活性を有する (a) 若しくは (b) の断片を含む。

【0020】

前記 TSG - 6 ポリペプチドは好ましくは配列番号 7 に示される配列からなる。

【0021】

配列番号 9 は、TSG - 6 の L in k モジュール (L in k_TSG - 6) を含む組換えポリペプチドを示す。従って、本発明で使用される TSG - 6 ポリペプチドは好ましくは：

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 50 % の同一性を保ち、RANKL との結合活性を有する配列番号 9 のアミノ酸配列の変異体；又は
- (c) RANKL との結合活性を有する (a) 若しくは (b) の断片を含む。

【0022】

前記 TSG - 6 ポリペプチドは好ましくは配列番号 9 に示される配列からなる。

【0023】

前記 TSG - 6 ポリペプチドは更に、L in k モジュールを欠いていてもよい。前記 L in k モジュールは配列番号 2 及び 5 の 37 - 128 残基に相当する。前記 TSG - 6 ポリペプチドはヒト TSG - 6 の CUB_C 領域のみを含み得る。前記 CUB_C 領域は配列番号 2 及び 5 の 129 - 277 残基に相当し、配列番号 10 及び 11 に示される。前記 CUB モジュールは更に、TSG - 6 のフィブロネクチン結合活性及び TSG - 6 の RANKL との結合活性の要因となる。従って前記 TSG - 6 ポリペプチドは：

- (a) 配列番号 10 若しくは 11 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 10 若しくは 11 のアミノ酸配列と少なくとも 50 % の同一性を保ち、RANKL との結合活性を有する (a) の変異体；又は
- (c) RANKL との結合活性を有する (a) 若しくは (b) の断片を含む。

【0024】

前記 TSG - 6 ポリペプチドは好ましくは配列番号 10 又は 11 に示される配列からなる。

【0025】

配列番号 13 は TSG - 6 (CUB_C_TSG - 6) の CUB_C 領域を含む組換えポリペプチドを示す。従って、本発明において使用される前記 TSG - 6 ポリペプチドは：

- (a) 配列番号 13 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 50 % の同一性を保ち、RANKL との結合活性を有する (a) の変異体；又は
- (c) RANKL との結合活性を有する (a) 若しくは (b) の断片を含む。

【0026】

前記 TSG - 6 ポリペプチドは好ましくは配列番号 13 に示される配列からなる。

10

20

30

40

50

【0027】

変異ポリペプチドはそのアミノ酸配列が配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号13の配列から異なるが、TSG-6の機能を保っている配列である。それ故、前記変異ポリペプチドは、破骨細胞による骨吸収を抑制する。前記変異ポリペプチドはRANKLと結合する。

【0028】

前記変異ポリペプチドはまた、典型的にHA、コンドロイチン-4-硫酸、アグレカン、インター- - -インヒビター(I-I)、ビクニン、ベルシカン、硫酸デルマタン、ペントラキシン3、トロンボスponジン-1、ヘパリン/硫酸ヘパラン及び/又はフィブロネクチンと結合する。前記変異ポリペプチドはまた、抗炎症及び/又は軟骨保護効果を示すことができる。

10

【0029】

前記変異ポリペプチドの結合能力は、本発明に従って処置された対象に異なる効果を現すよう変更することができる。例えば、インター- - -インヒビター(I-I)に結合することができない変異ポリペプチドは対象に抗炎症効果を与えることができないであろう。あるいはまた、HAに結合できない変異ポリペプチドは対象に軟骨保護効果を出す事ができないかも知れない。

【0030】

典型的には、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号13のアミノ酸配列と、約50%、55%又は65%を超える同一性を、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%の、また特に好ましくは少なくとも95%、少なくとも97%又は少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドはTSG-6タンパクの変異体と考えられる。このような変異体は、前記ペプチドがTSG-6の基本的な機能を保持する限り、アレル変異体及びタンパク配列の中で単一のアミノ酸又はアミノ酸グループの欠失、変更若しくは挿入を含む。配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号13の変異体の同一性は、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号13に示される配列の、少なくとも50、少なくとも75、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200若しくは少なくとも250又はこれを超える範囲にわたる隣接アミノ酸によって、また更に好ましくは、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号13の全長にわたって測定される。

20

【0031】

Mahoney et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22764-22771 及び Blundell et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 49261- 49270によれば、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7又は配列番号9のアミノ酸配列の変異体は、好ましくはヒアルロナン結合に必須とされる残基を含む。配列番号2又は5のアミノ酸配列の変異体は、好ましくは、配列番号2又は5の残基Lys-46及び/又はTyr-47及び/又はTyr-94及び/又はPhe-105及び/又はTyr-113の残基を含む。最も好ましくは、配列番号2又は5の変異体は配列番号2又は5のLys-46、Tyr-47、Tyr-94、Phe-105及びTyr-113の各残基を含む。

30

【0032】

配列番号3又は6のアミノ酸配列の変異体は、好ましくは、配列番号3又は6の残基Lys-29及び/又はTyr-30及び及び/又はTyr-77及び及び/又はPhe-88及び/又はTyr-96の残基を含む。最も好ましくは、配列番号3又は6の変異体は並列番号3又は6のLys-29、Tyr-30、Tyr-77、Phe-88及びTyr-96の各残基を含む。

40

【0033】

配列番号7のアミノ酸配列の変異体は、好ましくは、配列番号7の残基Lys-10及

50

び／又はT y r - 1 1 及び／又はT y r - 5 8 及び／又はP h e - 6 9 及び／又はT y r - 7 7 の残基を含む。最も好ましくは、配列番号7の変異体は配列番号7のL y s - 1 0 、T y r - 1 1 、T y r - 5 8 、P h e - 6 9 及びT y r - 7 7 の核残基を含む。

【0034】

配列番号9のアミノ酸配列の変異体は、好ましくは配列番号9の残基L y s - 1 2 及び／又はT y r - 1 3 及び／又はT y r - 6 0 及び／又はP h e - 7 1 及び／又はT y r - 7 9 の残基を含む。最も好ましくは、配列番号9の変異体は、配列番号9のL y s - 1 2 、T y r - 1 3 、T y r - 6 0 、P h e - 7 1 及びT y r - 7 9 の各残基を含む。

【0035】

アミノ酸の同一性はいずれかの適当なアルゴリズムによっても計算することができる。10 例えば、U W G C G パッケージには、相同性を計算することができる（例えばそのデフォルト設定で使用される）B E S T F I T プログラムが提供されている(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395)。P I L E U P 及びB L A S T のアルゴリズムは、（典型的にはこれらのデフォルト設定で）同一性を計算するため、又は配列を並べるために使用することができる（例えばAltschul (1993) J. Mol. Evol. 36, 290-300; Altschul, et al.(1990) J. Mol. Biol. 215, 403-10に記載されている）。

【0036】

B L A S T 分析を実行するためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t r e f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)により公に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列の中にある同じ長さのワードにアラインメントさせたときに、ある正の値の閾値スコアTに一致する又はこれを満たす、クエリー配列の中の長さWの短いワードを同定することにより、スコアの高い配列ペア (High scoring sequence pair, HSPs) を同定する工程を含む。Tは、近傍ワードスコア閾値 (neighbourhood word score threshold) と呼ばれる (Altschul et al, 1990)。これらの最初の近傍ワードのヒットは、これらを含むH S Pを見つけるために検索を開始するためのシードとして機能する。前記ワードヒットを各配列に沿って両方向に、累積アラインメントスコアができる限り高くなるまで長く伸長させる。各方向へのワードヒットの伸長は、以下の時に停止する：累積アラインメントスコアがその最大達成値よりも量Xだけ低下したとき；1つ以上の負のスコアの残基アラインメント (negative-scoring residue alignment) の累積により累積スコアがゼロ以下になると；又はいずれかの配列の端部に到達したとき。B L A S T アルゴリズムのパラメーターW、T及びXは、アラインメントの感度及び速度を決定する。B L A S T プログラムは、ワード長(W) = 1 1 、B L O S U M 6 2 スコアリングマトリックス (Henikoff及びHenikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919参照) アラインメント(B) = 5 0 、期待値(E) = 1 0 、M = 5 、N = 4 及び両鎖の比較をデフォルトとして使用する。30

【0037】

B L A S T アルゴリズムは、2つの配列間で類似性の統計的分析を行う。例えばKarlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787を参照されたい。B L A S T アルゴリズムにより提供される類似性の1つの基準は、2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列間で一致が偶然起こる確率を示す最小合計確率 (the smallest sum probability) P(N)である。例えば、第1の配列を第2の配列と比較したときの最小合計確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、該配列は他方の配列に類似しているとみなされる。40

【0038】

前記変異体は典型的に、少なくとも1、2、5、10、20、30、50又はそれを超える突然変異（アミノ酸の置換、欠失又は挿入が起こり得る）により異なる。例えば、1から50、2から30、3から20、又は5から10アミノ酸の置換、欠失又は挿入が起こり得る。変更されたポリペプチドは通常、R A N K L 結合性を保持している。前記置換は好ましくは、例えば次の表のような保守的な置換である。第2カラムの同一ブロックの、より好ましくは第3カラムの同一行のアミノ酸が互いに置換される。

10

20

30

40

50

| | | |
|-----|--------|---------|
| 脂肪族 | 非極性 | G A P |
| | | I L V |
| | 極性-非荷電 | C S T M |
| | | N Q |
| 芳香族 | | D E |
| | | K R |
| 芳香族 | | H F W Y |

10

【0039】

本発明において使用される前記TSG-6ポリペプチドの前記断片はTSG-6の機能を保持している。それ故、前記ポリペプチド断片は破骨細胞による骨吸収を抑制する。前記ポリペプチド断片はRANKLに結合する。

【0040】

前記ポリペプチド断片はまた、典型的にHA、コンドロイチン-4-硫酸、アグレカン、インター- - インヒビター(I I)、ビクニン、ベルシカン、硫酸デルマタン、ペントラキシン3、トロンボスポンジン-1、ヘパリン/硫酸ヘパラン及び/又はフィプロネクチンと結合する。前記ポリペプチド断片は更に抗炎症及び/又は軟骨保護効果を示すことができる。

20

【0041】

前記ポリペプチド断片の結合活性は、本発明に従って処置された対象に異なる効果を現すよう変更することができる。例えば、インター- - インヒビター(I I)に結合することができないポリペプチド断片は対象に抗炎症効果を与えることができないであろう。あるいはまた、HAに結合できないポリペプチド断片は対象に軟骨保護効果を出す事ができないかも知れない。

【0042】

本発明で使用される前記TSG-6ポリペプチドの前記断片は、TSG-6のRANKL結合活性を保持する限り、典型的に少なくとも10、例えば少なくとも15、20、25、30、40、50、60、70、80、90又はそれを超える長さのアミノ酸、更に100、150、200、250に至る長さのアミノ酸である。より好ましくは、前記TSG-6ポリペプチドの前記断片は配列番号7に示される配列を含む。Mahoney et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22764-22771及びBlundell et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 49261-49270によれば、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7又は配列番号9のアミノ酸配列の断片は、好ましくはヒアルロナン結合に必須であるとされる残基を含む。配列番号2又は配列番号5のアミノ酸配列の断片は、好ましくは配列番号2又は配列番号5の残基Lys-46及び/又はTyr-47及び/又はTyr-94及び/又はPhe-105及び/又はTyr-113の残基を含む。最も好ましくは、配列番号2又は配列番号5のアミノ酸配列の断片は、配列番号2又は5のLys-46、Tyr-47、Tyr-94、Phe-105及びTyr-113の各残基を含む。

30

【0043】

配列番号7のアミノ酸配列の断片は、好ましくは配列番号7の残基Lys-10及び/又はTyr-11及び/又はTyr-58及び/又はPhe-69及び/又はTyr-77の残基を含む。最も好ましくは、配列番号7のアミノ酸配列の断片は、配列番号7のLys-10、Tyr-11、Tyr-58、Phe-69及びTyr-77の各残基を含む。

40

【0044】

配列番号9のアミノ酸配列の断片は、好ましくは配列番号9の残基Lys-12及び/又はTyr-13及び/又はTyr-60及び/又はPhe-71及び/又はTyr-79の残基を含む。最も好ましくは、配列番号9のアミノ酸配列の断片は、配列番号9の

50

Lys-12、Tyr-13、Tyr-60、Phe-71及びTyr-79の各残基を含む。

【0045】

本発明において使用する好ましい断片は、配列番号1の36-133残基である。

【0046】

本発明において使用する前記TSG-6ポリペプチドは、化学的修飾、例えば翻訳後修飾を受けていても良い。例えば、それらはグリコシル化、磷酸化されていてもよく、修飾アミノ酸残基を含んでいてもよい。その精製を助けるためのヒスチジン残基付加、又は細胞膜への挿入を促進するためのシグナル配列の付加等の修飾を受けても良い。この様な修飾ポリペプチドも本発明で用いる用語“ポリペプチド”的範囲に含まれる。

10

【0047】

前記RANKL結合活性は適切なアッセイ手段により測定される。例えば、TSG-6ポリペプチドの前記RANKL結合活性は、本実施例に記載される方法を用いて測定される。TSG-6ポリペプチドがHA、コンドロイチン-4-硫酸、アグレカン、インター-1-インヒビター(I-I)、ビクニン、ベルシカン、硫酸デルマタン、ペントラキシン3、トロンボスポンジン-1、ヘパリン/硫酸ヘパラン及びフィプロネクチンと結合する能力を測定する適切なアッセイは周知の技術である(Getting et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 51068-51076; Mahoney et al. (2005) J. Biol. Chem. 280, 27044-27055; Salustri et al. (2004) Development 131, 1577-1586; Parkar et al. (1997) FEBS Lett. 410, 413-417; Parkar et al. (1998) FEBS Lett. 428, 171-176; Mahoney et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22764-22771; Nentwich et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15354-15362; 及びKuznetsova et al. (2005) J. Biol. Chem. 280, 30899-30908)。

20

【0048】

本発明に従って前記TSG-6ポリペプチドを使用することにより、その破骨細胞による骨吸収を抑制する能力が示される。破骨細胞の抑制活性は適切なアッセイにより測定することができる。例えば、TSG-6ポリペプチドの破骨細胞抑制活性は下記実施例に記載されるいかなる方法によっても決定することができる。

【0049】

本発明に従うTSG-6ポリペプチドの使用は、実質的に単離された方法であるかも知れない。前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドの意図された目的とは干渉しない基剤又は希釈剤と混合されるかも知れないが、それでもやはり実質的に単離されているとみなされる。本発明において使用されるポリペプチドは、更に実質的に精製された形であり、本発明のポリペプチドは、一般に製剤中50%重量、例えば80%、90%、95%又は99%重量を超えるポリペプチドを含有している。

30

【0050】

本発明において使用されるTSG-6ポリペプチドは、天然のポリペプチドであろう。ポリペプチドはTSG-6ポリペプチドを発現する、適切な生物なら如何なるものから分離されても良い。前記TSG-6ポリペプチドは、ヒト又は靈長類、ラット又はマウス等、他の適切な動物から分離されてよい。本発明において使用されるポリペプチドは、更にこれらの分離されたポリペプチドの断片として調製されても良い。

40

【0051】

更に前記TSG-6ポリペプチドは、合成されたり組換え手法によって作製されても良い。例えば、組換えTSG-6ポリペプチドは、適切な制御配列と実施可能にリンクされたポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現ベクターによって培養細胞をトランスフェクトし、その細胞を培養し、細胞が生産した前記TSG-6ポリペプチドを抽出し、精製することにより生産されても良い。ポリペプチドの組換え生産方法は周知の技術である(例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Harbour Laboratory Pressを参照)。

【0052】

本発明において使用されるTSG-6ポリペプチドのアミノ酸配列は、自然には存在し

50

ないアミノ酸を含んだり、化合物の安定性を増加させたりするため修飾されても良い。前記ポリペプチドが合成手段により生産される場合には、そのようなアミノ酸は生産過程で導入されるかもしれない。前記ポリペプチドは更に、合成又は組換えの後に修飾されても良い。

【 0 0 5 3 】

本発明において使用される T S G - 6 ポリペプチドはまた、D - アミノ酸を用いて製造されても良い。そのような場合には、C から N への方向を逆転してリンクされるであろう。これはそのようなポリペプチドを製造する上で慣用的な技術である。

【 0 0 5 4 】

多くの側鎖修飾法は公知の技術で、前記ポリペプチドが破骨細胞抑制能力を保持する限り、前記 T S G - 6 ポリペプチドの側鎖にも応用されるであろう。 10

【 0 0 5 5 】

T S G - 6 ポリヌクレオチド

本発明に従って、T S G - 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、変異体又は断片が破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療し又は予防するために使用される。特に、前記ポリヌクレオチドは好ましくは、(a) 配列番号 1 、 4 、 8 若しくは 12 のコーディング配列；(b) (a) に示された配列に対し遺伝コードの結果により縮重している配列；(c) (a) 若しくは(b) に示された配列と少なくとも 60 % の同一性を有し、R A N K L との結合活性を有するポリペプチドをコードする配列；又は、(d) R A N K L との結合活性を有するポリペプチドをコードする、(a) 、(b) 若しくは(c) 20 に示されるいづれか 1 の配列の断片；を含むか又はそれからなる。前記ポリヌクレオチドは好ましくは、(a) 配列番号 1 、 4 、 8 若しくは 12 のコーディング配列；(b) (a) に示された配列に対し遺伝コードの結果により縮重している配列；(c) (a) 若しくは(b) に示された配列と少なくとも 60 % の同一性を有し、破骨細胞による骨吸収を抑制する能力を有するポリペプチドをコードする配列；又は、(d) 破骨細胞による骨吸収を抑制する能力を有するポリペプチドをコードする、(a) 、(b) 若しくは(c) に示されるいづれか 1 の配列の断片；を含むか又はそれからなる。

【 0 0 5 6 】

典型的には、前記 T S G - 6 ポリヌクレオチドは D N A である。しかしながら前記ポリヌクレオチドは R N A ポリヌクレオチドであっても良い。前記ポリヌクレオチドは単鎖又は 2 重鎖でもよく、合成又は修飾ヌクレオチドをその中に含んでも良い。 30

【 0 0 5 7 】

本発明のポリヌクレオチドは、典型的に、配列番号 1 、 4 、 8 又は 12 のコーディング配列又はその相補的配列とバックグラウンドを有意に超えるレベルでハイブリダイズする。バックグラウンドハイブリダイゼイションは、例えば、D N A ライブライマーに存在する他の D N A によって起こり得る。本発明のポリヌクレオチドと配列番号 1 、 4 、 8 又は 12 のコーディング配列又はその相補的配列との間で形成される交互作用のシグナルレベルは、典型的には少なくとも 10 倍、より好ましくは少なくとも 100 倍、他のポリヌクレオチドと配列番号 1 、 4 、 8 又は 12 のコーディング配列との間の交互作用よりも強烈である。交互作用の強度は、例えば、プローブを ^{32}P で放射線標識することにより測定され得る。選択的ハイブリダイゼイションは典型的に、培地条件のストリンジエンシーを高めることにより達成される。しかしながら、このようなハイブリダイゼイションは公知技術のすべての適当な条件によって実現することができる(Sambrook et al. , 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Harbour Laboratory Press 参照)。例えば、高ストリンジエンシーが要求される時には、60 - 65 で 0.1 - 0.2 × S S C (標準クエン酸ナトリウム) が適切な条件に含まれる。もし低ストリンジエンシーが要求される時には 60 で 2 × S S C が適切な条件に含まれる。 40

【 0 0 5 8 】

配列番号 1 、 4 、 8 又は 12 のコーディング配列は、ヌクレオチド置換例えば 1 、 2 又は 3 - 10 、 25 、 50 、 100 、 150 又は 200 置換により変更され得る。配列番号 50

1、4、8又は12のコーディング配列は、2者择一に又は付加的に1又は2以上の挿入及び/又は欠失、及び/又はいずれか又は双方の末端の延長により変更され得る。シグナル配列等の付加的な配列もまた含まれる。前記変更ポリヌクレオチドはRANKL結合活性を有するポリペプチドをコードする。前記変更ポリヌクレオチドは、以上で論議されたいかなる変異体や断片をもコードすることができる。縮重置換が可能であり及び/又は前表に示されたように、変更された配列が翻訳されるとき保守的なアミノ酸の置換になるような置換もまた可能である。

【0059】

配列番号1、4、8又は12のDNAコーディング配列に相補的な配列と選択的にハイブリダイズできるヌクレオチド配列は、一般的に 配列番号1、4、8又は12のコーディング配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を、少なくとも20、好ましくは少なくとも30、例えば少なくとも40、少なくとも60、更に好ましくは少なくとも100の隣接ヌクレオチド範囲、又は最も好ましくは配列番号1、4、8又は12の全長、又は配列番号2、5、9又は13に示される配列を有するポリペプチドをコードする配列番号1、4、8又は12の長さにわたる配列に対して有するであろう。配列同一性は例えば、上述した適切ないかなる手法によっても決定することができる。

10

【0060】

本発明のポリヌクレオチドを定義するために、上述した配列同一性の程度及び最小のサイズのあらゆる組み合わせは、より好ましい更に厳しいストリングエント条件（すなわち、より長い範囲にわたるより高い配列同一性）に対しても利用することができる。従って、例えば、20、より好ましくは30ヌクレオチドにわたる少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドも、40ヌクレオチドを超える少なくとも95%の配列同一性と同様に本発明の1態様を示す。

20

【0061】

ポリヌクレオチドの断片は、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも15又は少なくとも20、例えば少なくとも25、少なくとも30又は少なくとも40ヌクレオチドの長さを有するであろう。それらは、典型的には40、50、60、70、100又は150ヌクレオチドに至る長さであろう。断片は、150ヌクレオチドより長くはなく、例えば200、300、400、500、600、700、800、900又は1000ヌクレオチドに至る長さ、あるいは配列番号1、4、8又は12のコーディング配列に数ヌクレオチド、例えば5、10又は15ヌクレオチド及ばない長さも可能である。

30

【0062】

本発明に使用するポリヌクレオチドは、組換えにより、合成により、又はこの技術分野で利用可能ないかなる手法で生産することもできる。それらはまた、標準的な技術でクローニングすることもできる。前記ポリヌクレオチドは、典型的には単離され及び/又は精製された形で提供される。

【0063】

一般に、短いポリヌクレオチドは要求される核酸配列を、一度に1ヌクレオチドのステップワイズ生産法を含む合成手法で製造する。これを自動的に達成する技術は既に利用可能である。

40

【0064】

より長いポリヌクレオチドは一般に、例えばPCR（ポリメラーゼチェイン反応）クローニング技術を利用する組換え手法により製造される。この手法は、クローニングしたいTSG-6遺伝子の範囲に一対のプライマー（約15-30ヌクレオチドの）を作製し、前記プライマーをバクテリア細胞から取得したDNAに接触させ、必要とする範囲の増幅を促す条件下でポリメラーゼチェイン反応を行い、増幅された断片を分離（反応混合物をアガロースゲル上で精製）しそして増幅されたDNAを回収する過程を含む。プライマーは増幅されたDNA適当なクローニングベクターにクローンできるよう、適切な制限酵素

50

認識部位を含むように設計されよう。

【0065】

このような手法は、これまでに記載されたTSG-6遺伝子配列のすべて又は一部を取得するために利用される。一般に、ここに記載された手法は公知の技術ではあるが、特に以下の文献を参照されたいSambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Harbour Laboratory Press。

【0066】

ここに記載されたTSG-6ポリヌクレオチドは、本発明における使用のために、試験管内、生体内又は生体外で前記ポリペプチドを製造するのに有益である。前記ポリペプチドは治療剤としてそれ自身で又は組換えタンパク合成に含まれて使用することができる。

10

【0067】

本発明において使用するための前記ポリペプチドは典型的に組換え複製ベクターに合体する。前記ベクターは、適合したホスト細胞の中で核酸を複製させる。それ故、本発明において使用するためのポリペプチドは、複製ベクターの中にTSG-6ポリヌクレオチドを導入し、適合するホスト細胞の中に前記ベクターを導入しそして前記ベクターの複製を促す条件下でそのホスト細胞を成長させる。

【0068】

好ましくは、前記ベクターはTSG-6ポリペプチドをコードする核酸配列を含む発現ベクターである。そのような発現ベクターは分子生物技術では日常的に構築され、例えばプラスミドDNA及び適切なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー及び他の、例えば、恐らく必要であり、そしてタンパク発現を可能にするために正しい方向に位置づけられているポリアデニレーションシグナル、のような要素の使用を含む。他の適切なベクターはこの分野に習熟した技術者には明らかであろう。この点において更に他の例については以下を引用するSambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Harbour Laboratory Press。

20

【0069】

好ましくは、本発明において使用するためのベクター中におけるポリペプチドは、ホスト細胞によってコーディング配列の発現を提供できるコントロール配列と実施可能にリンクされたベクターである、すなわち前記ベクターは発現ベクターである。“実施可能にリンクした”の用語は並置を意味し、そこでは、記された構成部分（複数）が、それらの企図された態様で機能することが許される関係にある。コーディング配列と“実施可能にリンクした”プロモーターのような調節配列は、コーディング配列の発現が調節配列と適合する条件下で達成されるように位置づけられている。

30

【0070】

前記ベクターは例えば、任意に前記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターであったり、任意に前記プロモーターのレギュレーターであったりしてもよいが、複製の起源から提供されたプラスミド、ウイルス又はファージであり得る。前記ベクターは典型的に生体内での使用に適合している。

【0071】

プロモーター及び他の発現調節シグナルは、発現が設計されているホスト細胞と適合するよう選択できる。アクチンプロモーターのような哺乳類のプロモーターが使用されよう。組織特異的プロモーターが特に好ましい。モロニーネズミ白血病ウイルス長端末リピート(MMLV LTR)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター、SV40プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)IEプロモーター、アデノウイルス、HSVプロモーター(HSV IEプロモーター等のような)、又はHPVプロモーター、特にHPV上流調節領域(URR)等のウイルス性プロモーターも更に利用され得る。ウイルス性プロモーターは技術分野ではただちに利用可能となっている。

40

【0072】

前記ベクターは更に真核ゲノム配列、更に好ましくは哺乳類ゲノム配列と相同な配列を含むポリヌクレオチドを形成するポリヌクレオチドのフランкиング配列を含むことができ

50

る。これにより、本発明のポリヌクレオチドを真核細胞のゲノムに相同組換えによって導入することが可能となる。特に、ウイルス配列がランクインされた発現カセットを含むプラスミドベクターが、本発明のポリヌクレオチドを哺乳類細胞に送達するのに適したウイルスベクターを調製するのに使用可能である。適切なウイルスベクターの他の例としては、ヘルペスシンプレックスウイルスベクター及びレンチウイルス、アデノウイルス、アデノ- 隨伴ウイルス及びH P Vウイルス等を含むレトロウイルスがあげられる。これらのウイルスを利用した遺伝子移転手法はこの技術の習熟者には公知である。例えば、レトロウイルスベクターはホストゲノムに取り込むポリヌクレオチドに前記ポリヌクレオチドを安定して統合するために利用され得る。複製不全なアデノウイルスベクターはこれに反し、エピソームに止まり、それ故一過性な発現を可能にする。

10

【0073】

O P G ポリペプチド

本発明の1の好ましい態様では、O P G ポリペプチドは破骨細胞による骨吸収に伴う疾患又は状態を治療又は予防するためT S G - 6と組み合わせて投与される。O P G ポリペプチドは、好ましくはヒトO P G、又はR A N K L 結合活性を有するヒトO P Gの変異体又は断片である。O P G ポリペプチド破骨細胞による骨吸収を抑制する能力を有する。変異体は靈長類、マウス又はラット等の他の生物からのO P G ポリペプチドであり得る。

【0074】

O P G ポリペプチドは好ましくは：

- (a) 配列番号15のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有する(a)の変異体でR A N K L 結合活性の受容体活性化因子を有する；又は
- (d) R A N K L 結合活性を有する(a)若しくは(b)の断片を含む。

20

【0075】

好ましくは、O P G ポリペプチドは配列番号15の配列を含み、又はそれからなる。

【0076】

典型的には、配列番号15のアミノ酸配列と約50%、55%又は65%を超える、好ましくは、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%そして特に好ましくは、少なくとも95%、少なくとも97%又は少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドはO P Gタンパクの変異体と考えられる。この様な変異体には、前記ペプチドがO P Gの基本的な機能性を有する限り、アレル変異体及びタンパク配列中の単一アミノ酸又はアミノ酸グループの欠失、変更又は挿入が含まれる。配列番号15の変異体の同一性は、T S G - 6について既に論議した通り配列番号15の種々の範囲に及んで測定され得る。変異体の配列は典型的には、T S G - 6について既に論議した通り配列番号15から1又は2以上の突然変異により異なっている。

30

【0077】

本発明で使用される前記O P G ポリペプチドの断片はO P Gの機能を保持している。それ故、前記断片ポリペプチドは破骨細胞による骨吸収を抑制する。前記断片ポリペプチドはR A N K L に結合する。

40

【0078】

前記O P G ポリペプチドの断片の結合活性は、T S G - 6について既に論議した通り変更され得る。

【0079】

本発明において使用される前記O P G ポリペプチドの断片は、T S G - 6について既に論議した通り、典型的に長さが少なくとも10アミノ酸である。

【0080】

本発明で使用される前記O P G ポリペプチドは、T S G - 6について既に論議した通り、化学的に修飾されていても良い。

【0081】

50

前記OPGポリペプチドのRANKL結合活性及び破骨細胞抑制活性は、TSG-6について既に論議した通り、決定することができる。

【0082】

本発明で使用される前記OPGポリペプチドは、TSG-6について既に論議した通り実質的に単離された形であろう。それらはTSG-6について既に論議した通り、天然のポリペプチド又は合成され又は組換え手法で作製されたものであっても良い。

【0083】

本発明において使用されるOPGポリペプチドの前記アミノ酸配列は、TSG-6について既に論議したように、修飾されていても良い。

【0084】

OPGポリヌクレオチド

本発明の好ましい1の態様では、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、変異体又は断片は、TSG-6と併用して、破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療又は予防するために投与される。特に、前記ポリヌクレオチドは好ましくは：(a)配列番号14のコーディング配列；(b)(a)に示された配列に対し遺伝コードの結果により縮重している配列；(c)(a)若しくは(b)に示された配列と少なくとも60%の同一性を有し、RANKLとの結合活性を有するポリペプチドをコードする配列；又は(d)RANKLとの結合活性を有するポリペプチドをコードする、(a)、(b)若しくは(c)に示されるいづれか1の配列の断片；を含むか又はそれからなる。前記ポリヌクレオチドは好ましくは、(a)配列番号14のコーディング配列；(b)(a)に示された配列に対し遺伝コードの結果により縮重している配列；(c)(a)若しくは(b)に示された配列と少なくとも60%の同一性を有し、破骨細胞による骨吸収を抑制する能力を有するポリペプチドをコードする配列；又は、(d)破骨細胞による骨吸収を抑制する能力を有するポリペプチドをコードする、(a)、(b)若しくは(c)に示されるいづれか1の配列の断片；を含むか又はそれからなる。

【0085】

典型的には、前記OPGポリヌクレオチドはDNAである。しかしながら前記ポリヌクレオチドはRNAポリヌクレオチドであっても良い。前記ポリヌクレオチドは単鎖又は2重鎖でもよく、合成又は修飾ヌクレオチドをその中に含んでも良い。

【0086】

OPGポリヌクレオチドは、TSG-6について既に論議した通り、配列番号14のコーディング配列又はその相補体とハイブリダイズすることができる。TSG-6について既に論議した通り、配列番号14のコーディング配列は変更され得る。

【0087】

配列番号14のDNAコーディング配列の前記相補配列と選択的にハイブリダイズできるヌクレオチド配列は、TSG-6について既に論議した通り、少なくとも20隣接ヌクレオチド又は最も好ましくは配列番号14の全長又は配列番号15に示されるポリペプチドをコードする配列番号14の長さにわたって、一般的に配列番号14のコーディング配列と少なくとも60%の同一性を有するであろう。

【0088】

ポリヌクレオチド断片は好ましくは、TSG-6について既に論議した通り、少なくとも10ヌクレオチドの長さを有するだろう。

【0089】

本発明において使用するOPGポリヌクレオチドは、TSG-6について既に論議したあらゆる方法により作製できる。それらは、TSG-6について既に論議した通り、OPGポリペプチドの作製のためにも利用できる。

【0090】

OPG模倣体

本発明の好ましい1の態様においては、OPG模倣体はTSG-6と組み合わせて、破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療又は予防するために投与される。OPG模

10

20

30

40

50

倣体は、RANKLと結合することにより破骨細胞による骨吸収を抑制する要素である。

【0091】

OPG模倣体は抗体のようなポリペプチドであり得る。前記OPG模倣体は好ましくは、RANKLと結合し抑制するMgelnのモノクローナル抗体、AMG-162である。あるいはまた、前記OPG模倣体は、RANKLと結合し抑制することにより破骨細胞による骨吸収を抑制するポリペプチドであり得る。

【0092】

疾病と状態

本発明に従って、TSG-6ポリペプチド、又はポリヌクレオチドは破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療又は予防するために利用される。破骨細胞による骨吸収は破骨細胞による骨基質及び鉱物質の破壊である。破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態は破骨細胞による骨吸収率が異常となる疾病又は状態である。破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態は、破骨細胞が、前記疾病又は状態がみられない比較の対象者で観察される骨吸収（破壊）率よりも高い比率で再吸収（破壊）される疾病又は状態である。前記疾病又は状態は、破骨細胞による骨吸収率の増加を含む。

10

【0093】

前記疾病又は状態は、同一対象における骨の生成率よりも高い骨の再吸収率を含み得る。前記疾病又は状態は、それ故、正味の骨量の損失を含み得る。あるいはまた、前記疾病又は状態は、同一対象における骨の生成率と同等又は低い骨の再吸収率をも含み得る。前記疾病又は状態は、正味骨量の損失がない場合も含み得る。前記疾病又は状態は、正味骨量の増加も含み得る。前記疾病又は状態は、前記疾病又は状態を伴わない比較の対象者で観察される正味骨量の増加率に比較して正味骨量増加の率が遅い場合をも含み得る。

20

【0094】

前記疾病又は状態は、好ましくは骨関節炎、骨粗鬆症、骨癌、転移癌に伴う骨欠失、パゲット（Paget）病、ゴーラムスタウト（Gorham Staut）病、原発性副甲状腺機能亢進症、歯周病、骨折及び／又は人為的付替え関節（joint replacement）の無菌的弛緩である。前記骨癌は、Ewing肉腫、多発性骨髄腫、骨肉腫（巨骨細胞腫）及び／又は破骨細胞であり得る。骨欠失に至る転移癌は、乳癌、前立腺癌、腎臓癌、肺癌及び／又は成人T-細胞白血病であり得る。

30

【0095】

前記対象は典型的には、マウス、ラット、靈長類（マモセット、又はサル等）のような哺乳動物対象（者）である。対象はヒト又はヒト以外の動物であり得る。対象がマウス、ラット又は靈長類のような動物の場合には、破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を誘導するための処置が可能である。次表は破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態のための動物モデルが存在するか、又は動物モデルでどのように破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態が誘導されるかを要約している。

【0096】

| 疾病又は状態 | モデル/ 誘導 |
|--------------|---|
| 骨関節炎 | うさぎ/マウス又はSTR/ortマウスモデルの膝関節における部分側面関節間軟骨切除 |
| 骨粗鬆症 | ラット等げっ歯類の卵巢切除 |
| Ewing 肉腫 | 原発性腫瘍細胞の免疫不全マウス例えはNOD又はSCIDへの注射 |
| 多発性骨髄腫 | 52TMM マウスモデル |
| 骨肉腫 | 胸腺切除マウスの脛骨へのTE-85骨肉腫細胞系の注射 |
| 乳癌 | マウス癌細胞4T1/lucの乳腺細胞体への移植又はMDA-MB-231ヒト乳癌細胞系のヌードマウスへの注射 |
| 腎臓 | RBM1腎臓癌細胞系のヌードマウスへの注射 |
| 肺 | POS-1細胞系のC3H/Heマウスへの注射 |
| 前立腺 | 22Rv1前立腺癌細胞系のSCIDマウスへの注射 |
| 成人T-細胞白血病 | HTLV-1 Tax組換えマウスモデル |
| 原発性副甲状腺機能亢進症 | 組換えマウスにおけるサイクリンD1のPTH-ターゲット過剰発現 |
| 歯周病 | 歯周病の自然発生ビーグル犬モデル |
| 骨折 | 大腿骨骨折のウイスターラットモデル |
| 交換関節無菌的弛緩 | 錘付けラットピンモデル |

10

20

【0097】

治療と予防

本発明は破骨細胞による骨吸収に伴う疾病又は状態を治療又は予防するためのTSG-6ポリペプチド及びポリヌクレオチドの使用を提供する。処置は治療的又は予防的であることができる。

【0098】

TSG-6ポリペプチド及びポリヌクレオチドは疾病又は状態の1又は2以上の症候の開始を予防するために個体に投与され得る。この態様では、前記対象は無症候のことがある。前記対象は前記疾病に対する遺伝的傾向を有することもある。そのような個体に対しては、予防に有効なポリペプチド又はポリヌクレオチドの量が投与される。予防に有効な量とは、疾病又は状態の1又は2以上の症候の開始を予防する量である。

30

【0099】

治療に有効な前記TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドの量とは、疾病又は状態の1又は2以上の症候の改善に効果的な量である。好ましくは、治療される前記個体はヒトである。

【0100】

前記TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドは前記対象に対しあらゆる適切な手段で投与され得る。TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドは、経口、口腔、肛門、肺、静脈内、動脈内、筋肉内、腹膜内、関節内、等の腸管又は非経口的な経路、局所的又は他の適切な投与経路を通して投与され得る。

40

【0101】

前記TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドは前記対象に対して、治療を特定の場所に目標付けるよう投与されるであろう。例えは、前記TSG-6ポリペプチドは局所的に骨の表面に対して注射されるであろう。前記TSG-6ポリペプチドは骨又は破骨細胞に結合する試薬と抱合されるであろう。前記TSG-6ポリヌクレオチドに対しては、前記TSG-6ポリペプチドをコードする発現ベクターが、例えは組織特異的プロモーター又はRNAiを用いることにより、TSG-6の発現を特定の組織に指向するために使用される。

【0102】

これまでに記載された、いかなる前記TSG-6ポリペプチド及びポリヌクレオチドの

50

处方も、前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドの特性及び治療すべき条件等の要因に依存するであろう。前記 T S G - 6 ポリペプチド又はポリヌクレオチドは種々の調剤法により投与され得る。それは経口的に（例えばタブレット、トローチ、錠剤、水又は油への懸濁、分散性の粉状又は粒状）、非経口的、皮下注射、静脈注射、筋肉注射、胸骨内、経皮的又は点滴等により投与されよう。前記 T S G - 6 ポリペプチド又はポリヌクレオチドはまた座剤としても投与され得る。各特定の患者に対して内科医が必要な経路を決定できるだろう。

【 0 1 0 3 】

典型的には、前記ポリペプチド又はポリヌクレオチドは薬学的に許容される基剤又は希釈剤とともに調剤されるが、これは薬学的技術として通常の方法により実施される。薬学的基剤又は希釈剤は例えば、等張溶液であろう。例えば固体経口剤は、活性化合物とともに、ラクトース、デキストロース、サッカロース、セルロース、コーンスターク又はポテトスターク等の希釈剤；シリカ、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム又はステアリン酸カルシウム及び／又はポリエチレングリコール等の潤滑剤；澱粉、アラビアゴム、ゼラチン、メチルセルローズ、カルボキシメチルセルローズ、又はポリビニルピロリドン等の結合剤；澱粉、アルギン酸、アルギン酸塩又は澱粉グリコール酸ナトリウム等の分散剤；起泡性混合物；染料；甘味剤；レシチン、ポリソルベート、ラウリル硫酸塩等の加湿剤；更に薬剤の処方に用いられる一般的に毒性がなく薬学的に不活性な物質を含んでいても良い。これらの薬剤処方は、例えば混合、顆粒化、タブレット化、蔗糖コーティング、フィルムコーティング等の公知の方法で製造される。

10

【 0 1 0 4 】

経口投与のための液状分散剤は、シロップ、乳化剤及び懸濁液であろう。シロップは基剤として例えばサッカロース又はサッカロースとグリセリン及び／又はマンニトール及び／又はソルビトールを含み得る。

【 0 1 0 5 】

懸濁剤及び乳化剤は基剤としては例えば、天然ゴム、寒天、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルローズ、カルボキシメチルセルローズ、又はポリビニルアルコールが含まれる。筋肉注射のための懸濁液又は溶液は、活性化合物とともに薬学的に許容される基剤、例えば滅菌水、オリーブ油、オレイン酸エチル、プロピレングリコール等のグリコール及び、もし必要なら適量の塩酸リドカインが含まれても良い。

30

【 0 1 0 6 】

静脈注射又は点滴用の溶液は、基剤として例えば、滅菌水が含まれ、好ましくはそれらは、滅菌され、水様で、等張食塩水溶液であろう。

【 0 1 0 7 】

座剤としては、慣用の結合剤、及び基剤は例えば、ポリアルキレングリコール、又はトリグリセリドが含まれ、このような座剤は活性成分を 0.5% - 10%、より好ましくは 1% - 2% の範囲で含有する混合物から作製されるであろう。

【 0 1 0 8 】

経口製剤は例えば薬品級品質のマンニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリド、セルローズ、炭酸マグネシウム等の通常使用される賦形剤を含む。これらの混合物は溶液、懸濁液、タブレット、ピル、カプセル、遅効製剤又は粉剤とされ、活性成分を 10% - 95%、好ましくは 25% - 70% 含有する。薬剤混合物が凍結乾燥される場合には、凍結乾燥された試料は投与に先立って、例えば懸濁液に再構成される。再構成は好ましくはバッファー中で行われる。

40

【 0 1 0 9 】

患者に経口投与するカプセル、タブレット及びピルは、Eudragit "S"、Eudragit "L"、セルロースアセテート、フタル酸酢酸セルロース又はヒドロキシプロピルメチルセルローズ等を含む腸溶コーティングにより提供される。

【 0 1 1 0 】

無針注射、例えば経皮的に、による送達に適した薬剤もまた使用され得る。

50

【0111】

ポリペプチド又はポリヌクレオチドの治療に有効な量が投与される。薬量は特に、使用されるポリペプチド又はポリヌクレオチド；治療される患者の年齢、体重及び状態；投与経路；及び要求される養生法等種々のパラメタに従って決定されるだろう。再び、内科医が特定のいかなる患者に対しても、必要な投与経路及び薬量を決定できるだろう。典型的な1日当たりの薬量は、個々の抑制剤の活性、治療される対象の年齢、体重及び状態、疾患のタイプと劇症度及び投与の頻度と経路に従って、体重キログラム当たり約0.1-50mg、好ましくは約0.1-10mgである。より好ましくは、日当たり薬量レベルは5mgから2gである。

【0112】

10

上記のTSG-6ヌクレオチド配列及びそのような配列を含む発現ベクターは、更に上に要約したような薬剤処方として使用することができる。好ましくはRNA又はDNA等の核酸、特にDNAが治療される個体の細胞で発現可能な発現ベクターの形として提供される。ワクチンは裸のヌクレオチド配列を含み又はカチオン性リピド、ポリマー又はターゲットシステムとの組み合わせである。前記ワクチンはいかなる可能な手法によっても送達され得る。例えば、前記核酸は、好ましくは皮内注射、皮下注射又は筋肉注射等の注射によって導入され得る。あるいはまた、前記核酸は粒子媒介遺伝子送達のような核酸送達手段により直接経皮的に送達され得る。前記核酸は局所的に皮膚へ又は粘膜表面例えば鼻孔内、口内、膣内、直腸内へ投与され得る。

【0113】

20

核酸構造物の取り込みは、例えばトランスフェクション剤の使用を含むいくつかの公知のトランスフェクション技術によって促進され得る。これらの薬品の例には燐酸カルシウム及びDEAE-デキストラン等のカチオン剤、及びリポフェクタム及びトランスフェクタム等の脂質トランスフェクション剤が含まれる。投与される前記核酸の用量は変更され得る。典型的には、前記核酸は粒子媒介遺伝子送達では1pg-1mg、より好ましくは1pg-10μgの核酸、及び他の経路では10μg-1mgの範囲で投与される。

【0114】

本発明は更に血液のTSG-6ポリペプチドへの接触を含む、破骨細胞による骨吸収に伴う疾患又は状態に悩む患者から取り出された血液の治療法、体外の、を提供する。このようにTSG-6は血液の体外での治療のために使用され得る。前記TSG-6は血漿又は血清のような1又は2以上の血液成分を処置するのに使用される。ここに記載される前記体外方法は患者の身体から既に取り出された血液に対し実施される。前記血液又は血液成分はTSG-6ポリペプチドと接触させられたのち、任意に前記患者に戻してもよい。

30

【0115】

併用療法

前記TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドは単独で又は薬学的に活性なエージェントと併用して投与され得る。1の態様においては、前記TSG-6ポリペプチド又はポリヌクレオチドは、長いペントラキシン3(PTX3)と併用して投与されない。同一の態様では、本発明に従って製造された薬品は、PTX3を含まない。

【0116】

40

より好ましい態様では、前記方法は対象に対して更に治療上又は予防上有効な量のOPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はOPG模倣体を投与することを含む。同一の態様では、前記薬品は、治療上又は予防上有効な量のOPGポリペプチド、OPGポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はOPG模倣体を併用して投与される。

【0117】

前記TSG-6及びOPGはシナジー的に作用する。換言すれば、TSG-6及びOPG併用して投与すれば、破骨細胞による骨吸収を抑制する上で各単独効果の合計よりも大きな効果を有する。

【0118】

50

O P G ポリペプチド、ポリヌクレオチド又はO P G 模倣体の治療上有効な量は、疾病又は状態の1又は2以上の症候を改善するのに有効な量である。予防上有効な量は、疾病又は状態の1又は2以上の症候開始を防ぐ量である。

【0119】

前記T S G - 6 及びO P G は同時に、分離して又は逐次的に投与され得る。もし同時に投与すれば、前記T S G - 6 及びO P G は、同一の薬品に又は別々の薬品に存在していても良い。もし分離して又は逐次的に投与されれば、前記T S G - 6 及びO P G はどういう順序で投与されても良い。

【0120】

典型的には、T S G - 6 ポリペプチド及びO P G ポリペプチドが一緒に投与され、又はT S G - 6 ポリヌクレオチド及びO P G ポリヌクレオチドが一緒に投与される。しかしながら、ある態様では、T S G - 6 がポリペプチド、一方O P G がポリヌクレオチドであり、またその逆であっても良い。

【0121】

前記O P G ポリペプチド、O P G ポリヌクレオチド又はO P G 模倣体は、T S G - 6 に関する既に論議した、いかなる手法で、いかなる処方でまたいかなる薬量でも投与することができる。

【0122】

以下の実施例は本発明を例示する。

【0123】

実施例： 以下の実験は、T S G - 6 が骨再吸収の新規な抑制剤であることを示す。

【0124】

実施例1 - T S G - 6 による破骨細胞の抑制

全長ヒトT S G - 6 タンパクのQ 1 4 4 アロタイプ（配列番号1に示す）をNentwich et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15354-15362に記載のショウジョウバエS 2 細胞で発現させた。試験管内で破骨細胞の分化に及ぼすこの組換えタンパクの効果が測定された。ヒト単核白血球が破骨細胞に分化し、21日間で骨再吸収表現型を展開した。破骨細胞の活性は象牙質スライス上の孔隙再吸収の程度により測定した。ヒト単核白血球はs R A N K L (N F B リガンドの可溶性受容体活性化因子；30 ng / ml) 及び/又はM - C S F (25 ng / ml) の存在下で培養され、組換えT S G - 6 の存在又は不在下で骨再吸収活性が測定された。この培養システムへのT S G - 6 の付加は象牙質の劣化を実質的に低下させ（図1）、この効果は薬量に依存している（図2）。それ故、T S G - 6 は破骨細胞による骨吸収を抑制する。

【0125】

実施例2 - T S G - 6 ノックアウトマウスにおける破骨細胞の活性

実施例1と同様の実験がT S G - 6^{-/-}マウスの長骨からの破骨細胞前駆体を用いて実行された。s R A N K L 又はM - C S F 及びs R A N K L の存在下で培養すると、野生型のコントロール動物からの細胞に比較して、前記破骨細胞は試験管内の孔隙再吸収の顕著な増加を示した（図3）。これらの結果は、P G I A の導入に続くT S G - 6 欠損動物にみられるより激しい症候（骨劣化等）においても普遍的である。これらの試験はT S G - 6 が破骨細胞生成及び/又は破骨細胞の活性化に対する重要で新規な抑制剤であることを示す。

【0126】

実施例3 - R A N K L と結合するT S G - 6

R A N K L とその受容体R A N K は骨再構成の鍵となるレギュレータで、特にR A に起こる骨欠失と関連付けられてきた。R A N K L は膜に結合したT N F - スーパーファミリーリガンドで、破骨細胞及びストローマ組織細胞により産生されるが、R A N K は膜間シグナル分子で、単核破骨細胞前駆体の表面で発現する。R A N K L は、P G E₂、I L - 1 及びT N F 等のカルシウム調節因子に対応してR A N K と結合し、この交互作用は破

10

20

30

40

50

骨細胞の分化を誘導するのみならず、成熟した破骨細胞の骨再吸収活性を促進する(Tanaka et al. (2005) Immunol. Rev. 208, 30-49に総説あり)。まさに、RANKL (M-CSFと組み合わせて) は破骨細胞の分化を制御する主要な因子である(Quinn et al. (1998) Endocrinology 139, 4424-4427)。

【0127】

現在、RANKLの可溶性おとり型受容体であるオステオプロテゲリン (OPG) は破骨細胞の成熟と活性化を試験管内で効果的に抑制するRANKL / RANK 交互作用の唯一の抑制剤であり(Simonet et al. (1997) Cell 89, 309-319)、OPG活性の模倣体 (AMG162) が現在骨粗鬆症の治療に関する臨床試験中である。

【0128】

RANKLは更にRA患者からの滑液エフェクターT細胞の表面で発現し、AIА (ヒトRAと共に多くの特徴を有する) ラットの研究によれば、RANKLが破骨細胞蓄積による関節損傷及び骨劣化に至る鍵となることが示され、OPGによる治療がこれらの結果に対する保護を提供した(Kong et al. (1999) Nature 402, 304-309)。

【0129】

実施例1及び2に示された骨再吸収に対するTSG-6の効果に基づいて、TSG-6が直接にRANKLに対して有する交互作用が研究された。実施例1に示されたように組換え全長TSG-6を発現させた。前記単離されたLinkモジュール領域 (Link_TSG-6; 配列番号9) をDay et al. (1996) Protein Express. Purif. 8, 1-16に従って大腸菌で発現させた。前記CUB_C領域 (CUB_C_TSG-6; 配列番号13) を大腸菌で発現させた(DJ Mahoney及びAJ Day, 未発表)。全長TSG-6, Link_TSG-6又はCUB_C_TSG-6を濃度のある範囲でマイクロタイープレート上にコートし、sRANKL (5 pmol/well)との結合をRANKL-特化抗体により測定した。

【0130】

プレート結合アッセイの結果、全長TSG-6、その単離されたLinkモジュール領域 (Link_TSG-6; 配列番号9) 、及び単離されたCUB_C領域 (CUB_C_TSG-6; 配列番号13) のすべてがsRANKLと結合したが、全長TSG-6が前記単離領域より高い結合親和性を示した(図4)。このデータは、TSG-6がRANKL誘導の破骨細胞生成 / 破骨細胞活性化をRANKLに直接結合することにより、恐らくOPGに対してと同様に、抑制するのではないかと示唆している。

【0131】

実施例4 - TSG-6とOPGの協働

我々のデータ(未発表)によれば、OPG(公知のRANKL抑制剤)と組み合わせたTSG-6は培養により作製された酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP+) 多核破骨細胞の数で測定された破骨細胞形成に対する抑制に協働効果を有することが示されている(すなわち、個々のタンパクが存在する実験に比較して、TSG-6とOPGの双方が存在する場合の方が破骨細胞形成がより強く抑制される)。TSG-6とOPGの前記協働効果を説明できる1の可能なメカニズムは、これら双方のタンパク質が安定な三つの要素から成る複合体を作り同時にRANKLと結合できることである。

【0132】

実施例5 - TSG-6のLink及びCUB_C領域が破骨細胞形成を抑制する

更に、我々のデータ(未発表)は、単離されたLink及びCUB_C領域は全長タンパクよりも低い活性ではあるが、破骨細胞形成の抑制剤であることを示した。これは、これらのTSG-6の断片が骨再吸収の抑制剤を設計する基礎として利用できることを示す。

【0133】

実施例6 - 関節滑液内のTSG-6及びOPGのレベル

我々は種々の骨の不調(例えば、骨関節炎(OA)、リューマチ性関節炎(RA)、痛風及びピロ磷酸関節炎(PPA); 図5参照)を患う患者の関節滑液中に高いレベルのT

10

20

30

40

50

SG-6 (0 - 200 ng / ml) を測定した。OAの関節滑液中のTSG-6 及びOPGレベルのELISA解析によれば、TSG-6 タンパクのレベルにはOPGと比較して患者間に大きな変異が存在することが示された(図6参照)。これは、TSG-6 の不在/低レベルが骨疾患の範囲と劇症度に貢献していることを示唆する。

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1】図1はTSG-6 が破骨細胞の生成に及ぼす効果を示す。sRANKL/M-CSFに介されたヒト破骨細胞の形成が組換えヒトTSG-6 (25 ng / ml (0.8 nM)) の不在(右側の薄色の棒グラフ)と存在(左側の黒色の棒グラフ)下で示される。データ(8例の象牙質スライス)は各4反復からなる2独立試験の平均値±標準誤差で表わされる。

【図2】図2はTSG-6 がTSG-6 濃度のある範囲内で孔隙の再吸収に及ぼす抑制効果を示す。データ(8例の象牙質スライス)は各4反復からなる2独立試験の平均値±標準誤差で表わされる。

【図3】図3は野生型(WT、左側の棒グラフ)及びTSG-6^{-/-}マウス(KO、右側の棒グラフ)の骨髄から由来する破骨細胞による骨吸収活性の比較を示す。データ(4例の象牙質スライス)は4反復からなる2独立試験の平均値±標準誤差で表わされる。

【図4】図4はTSG-6 とsRANKLとの交互作用を示す。全長のTSG-6、Linck_TSG-6 又はCUB_C_TSG-6 はある濃度範囲でマイクロタイマー上にコートされ、RANKL特化抗体を利用してsRANKL (5 pmol / well)との結合が測定される。すべてのデータは平均吸光度(405 nm)値(8例)±標準誤差でプロットされる。

【図5】図5は種々の骨障害を患う患者の関節滑液中のTSG-6 及びOPGの定量結果を示す。種々の骨障害におけるタンパクレベルは“社内仕様”的ELISA分析により測定された。TSG-6 のレベルは左側の薄色の棒グラフで示される。OPGのレベルは右側の黒色の棒グラフで示される。この図は骨関節炎(OA)、ピロ磷酸関節炎(PPA)、リューマチ性関節炎(RA)及び痛風等の骨疾患の劇症度及び進行度に依存するTSG-6 及びOPGのレベルの変化を示す。各サンプルは3回反復され、各条件の関節滑液サンプル数は(例数Nの値)で与えられる。測定値は各グループの平均値±標準誤差で表わされる。

【図6】図6は骨関節炎(OA)患者(n=20)の滑液内のTSG-6 とOPGのレベル間の比較を示す。このデータはOPGのレベルと比較して、TSG-6 のレベルの変異性が疾患の範囲と劇症度に貢献し得ることを示す。

【0135】

配列の簡単な説明

配列番号1はヒトTSG-6の全長Q144アロタイプ変異体をコードする核酸配列を示す。

【0136】

配列番号2はヒトTSG-6の全長Q144アロタイプ変異体をコードするアミノ酸配列を示す。このアロタイプ変異体は144位にグルタミン残基(Q)を有する。それは最も普通のアロタイプ変異体でコーカシア人種の約86%で見出される(Nentwich et al. (2002) 277, 15354-15362)。

【0137】

配列番号3(配列番号2の18-277残基)はシグナル配列を除くヒトTSG-6のQ144アロタイプ変異体のアミノ酸配列を示す。

【0138】

配列番号4はヒトTSG-6の全長R144アロタイプ変異体をコードする核酸配列を示す。

【0139】

配列番号5はヒトTSG-6の全長R144アロタイプ変異体をコードするアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を示す。このアロタイプ変異体は 144 位にアルギニン残基 (R) を有する。それはより普通でないアロタイプ変異体でコーカシア人種の約 14 % に見出される (Nentwich et al. (2002) 277, 15354-15362)。

【 0140 】

配列番号 6 (配列番号 5 の 18 - 277 残基) はシグナル配列を除くヒト TSG-6 の R144 アロタイプ変異体のアミノ酸配列を示す。

【 0141 】

配列番号 7 (配列番号 2 及び 5 の 37 - 128 残基) はヒト TSG-6 の Link モジュールのアミノ酸配列を示す。

【 0142 】

配列番号 8 は実施例で用いられる Link_TSG-6 をコードする核酸配列を示す (Day et al. (1996) Protein Expr. Purif. 8, 1-16)。

10

【 0143 】

配列番号 9 は実施例で用いられる Link_TSG-6 のアミノ酸配列を示す。配列番号 9 の 3 - 95 残基は配列番号 7 に相当する (配列番号 2 及び 5 の 37 - 128 残基)。開始コドンのメチオニン (Met-1) は Link_TSG-6 の発現には除かれる (Day et al. (1996) Protein Expr. Purif. 8, 1-16)。

【 0144 】

配列番号 10 (配列番号 2 の 129 - 277 残基) はヒト TSG-6 の Q144 アロタイプ変異体の CUB_C 領域のアミノ酸配列を示す。

20

【 0145 】

配列番号 11 (配列番号 5 の 129 - 277 残基) はヒト TSG-6 の R144 アロタイプ変異体の CUB_C 領域のアミノ酸配列を示す。

【 0146 】

配列番号 12 は実施例で用いられる CUB_C_TSG-6 をコードする核酸配列を示す。

【 0147 】

配列番号 13 は実施例で用いられる CUB_C_TSG-6 のアミノ酸配列を示す。配列番号 13 の 2 - 150 残基は配列番号 11 に相当する (配列番号 5 の 129 - 277 残基)。開始コドンのメチオニン (Met-1) は CUB_C_TSG-6 の発現には除かれない (Day, 未発表データ)。

30

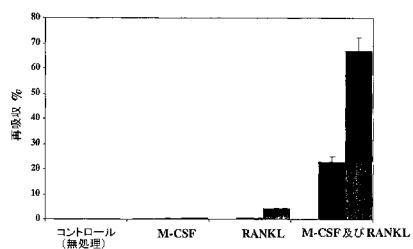
【 0148 】

配列番号 14 は全長ヒト OPG をコードする核酸配列を示す。

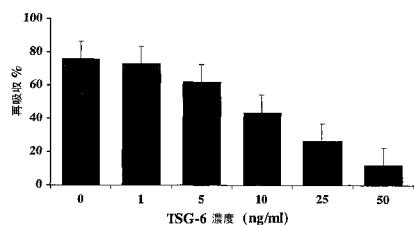
【 0149 】

配列番号 15 は全長ヒト OPG のアミノ酸配列を示す。

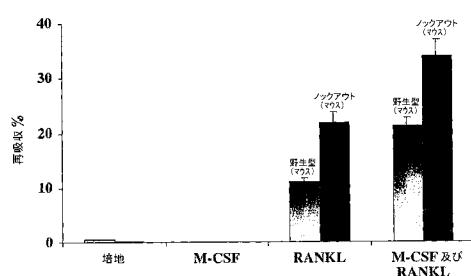
【図1】



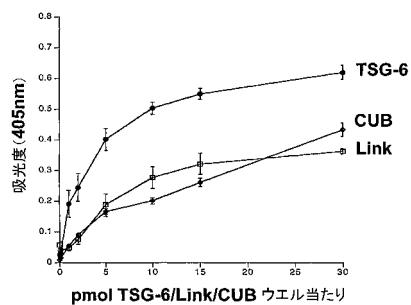
【図2】



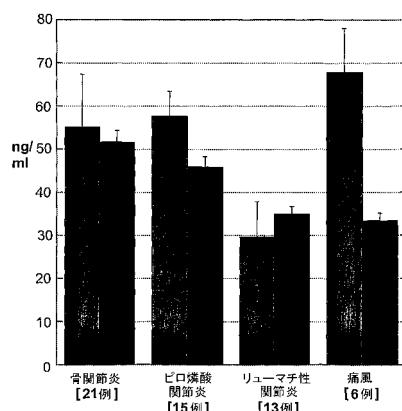
【図3】



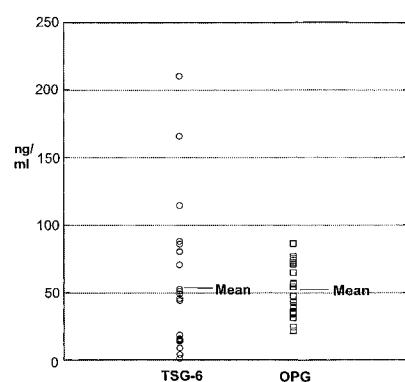
【図4】



【図5】



【図6】



【配列表】

0005346216000001.xml

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I |
|-------------|-------|---------------------------|
| A 6 1 P | 19/10 | (2006.01) A 6 1 P 19/10 |
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) A 6 1 P 29/00 |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) C 1 2 N 15/00 A |
| C 0 7 K | 14/47 | (2006.01) C 0 7 K 14/47 |

(72)発明者 サボクバー, アフシー

イギリス オックスフォード オーエックス3 7エルディー, ウィンドミルロード, ナフィールド オーソピーディック センター, ユニヴァーシティ オブ オックスフォード, ナフィールド デパートメント オブ オーソピーディック サージェリー, ボトナー リサーチ センター

(72)発明者 デイ, アンソニー

イギリス マンチェスター エム13 9ビーティー, オックスフォードロード, マイケルスミスビルディング, ユニヴァーシティ オブ マンチェスター, ファカルティー オブ ライフサイエンス, ウエルカムトラストセンター フォー セル-マトリックス リサーチ

(72)発明者 ミルナー, カロリン

イギリス マンチェスター エム13 9ビーティー, オックスフォードロード, マイケルスミスビルディング, ユニヴァーシティ オブ マンチェスター, ファカルティー オブ ライフサイエンス

審査官 濱下 浩一

(56)参考文献 Bardos T, et al., Anti-Inflammatory and Chondroprotective Effect of TSG-6 (Tumor Necrosis Factor- α -Stimulated Gene-6) in Murine Models of Experimental Arthritis, The American Journal of Pathology, 2001年11月, Vol. 159, No. 5, p. 1711-1721

Kostenuik PJ, Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength, Current Opinion in Pharmacology, 2005年12月, Vol. 5, No. 6, p. 618-625

Kong YY, et al., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand, Nature, 1999年11月18日, Vol. 402, No. 6759, p. 304-309

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 1 7
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 P 1 9 / 0 8
 A 6 1 P 1 9 / 1 0
 A 6 1 P 2 9 / 0 0
 C 0 7 K 1 4 / 4 7
 C 1 2 N 1 5 / 0 9

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)