

(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2010-502220

(P2010-502220A)

(43) 公表日 平成22年1月28日 (2010.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-527447 (P2009-527447)	(71) 出願人	506199879
(86) (22) 出願日	平成19年9月5日 (2007.9.5)		メダレックス インコーポレーティッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年4月28日 (2009.4.28)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/019652		リンストン ステイト ロード 707
(87) 国際公開番号	W02008/030611	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成20年3月13日 (2008.3.13)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/824, 596	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成18年9月5日 (2006.9.5)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
		(74) 代理人	100130845
			弁理士 渡邊 伸一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 骨形態形成タンパク質およびその受容体に対する抗体ならびにその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および/または B M P R 2 に対して高い親和性で特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体を提供する。本発明の抗体をコードする核酸分子、発現ベクター、宿主細胞および本発明の抗体を発現させるための方法も提供する。免疫複合体、二重特異性分子および本発明の抗体と場合により1つ以上の追加の治療薬を含む薬学的組成物も提供する。本発明は、B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および/または B M P R 2 により媒介される異常な骨形成および骨化を伴う疾患を治療するための方法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体により認識されるヒト BMP 2 または BMP 4 上のエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分、抗体断片、もしくは抗体模倣体。

【請求項 2】

IgG 1、IgG 2、IgG 3、または IgG 4 アイソタイプの完全長抗体である、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

全抗体 (whole antibody)、抗体断片、ヒト化抗体、一本鎖抗体、免疫複合体、脱フコシル化抗体、および二重特異性抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 4】

UniBody、ドメイン抗体、および Nanobody からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体断片。

【請求項 5】

Affibody、DARPin、Anticalin、Avimer、Versabody、および Duocalin からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体模倣体。

【請求項 6】

治療物質を含む、請求項 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 7】

前記治療物質が細胞毒素または放射性同位体である、請求項 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 8】

ヒト BMP 2 または BMP 4 に 5.5×10^{-9} M 以下の K_D で結合する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 9】

ヒト BMP 2 または BMP 4 に 3×10^{-9} M 以下の K_D で結合する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 10】

ヒト BMP 2 または BMP 4 に 2×10^{-9} M 以下の K_D で結合する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分の重鎖または軽鎖をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

以下の工程を含む、抗 - BMP 2 抗体または抗 - BMP 4 抗体を調製するための方法：

(a) 請求項 1 に記載の抗体をコードする 1 つ以上の核酸分子を含有する宿主細胞を得る工程；

(b) 宿主細胞培養物内で前記宿主細胞を成長させる工程；

(c) 前記 1 つ以上の核酸分子が発現される宿主細胞培養条件を提供する工程；および

(d) 前記宿主細胞または前記宿主細胞培養物から前記抗体を回収する工程。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

対象に、抗 - B M P 2 抗体もしくは抗 - B M P 4 抗体またはその抗原結合部分を、前記疾患を治療または予防するのに有効な量で投与する工程を含む、異常な骨形成および骨化を伴う疾患を治療または予防するための方法。

【請求項 17】

前記疾患が、進行性骨化性線維形成異常症 (F O P)、進行性骨異形成 (p r o g r e s s i v e o s s e o u s h e t e r o p l a s i a) (P O H)、脊髄損傷、筋肉内血腫、整形手術からの合併症、乾癬性関節炎、変形性関節症、強直性脊椎炎 (A S)、血清反応陰性関節症、骨格骨化過剰症、耳硬化症、あぶみ骨強直症、骨癌、前立腺癌、外骨腫、アテローム硬化症 (a r t h e r o s c l e r o s i s)、弁膜性心疾患からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記疾患が、骨癌、前立腺癌、肺癌、メラノーマ、造血癌 (h e m a t o p o i e t i c c a n c e r)、腎癌、および乳癌からなる群から選択される癌である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

以下からなる群から選択される重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体により認識されるヒト B M P 2 または B M P 4 上のエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分、抗体断片、もしくは抗体模倣体：

a . 配列番号 33 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 36 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

20

b . 配列番号 34 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 37 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

c . 配列番号 56 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 64 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

d . 配列番号 57 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 65 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

e . 配列番号 58 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 66 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

f . 配列番号 59 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 67 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

30

g . 配列番号 60 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 68 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

h . 配列番号 61 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 69 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、

i . 配列番号 62 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 70 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列、ならびに

j . 配列番号 63 で示される重鎖可変領域アミノ酸配列および配列番号 71 で示される軽鎖可変領域アミノ酸配列。

【請求項 20】

40

全抗体、抗体断片、ヒト化抗体、一本鎖抗体、免疫複合体、脱フコシル化抗体、および二重特異性抗体からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された抗体。

【請求項 21】

U n i B o d y、ドメイン抗体、および N a n o b o d y からなる群から選択される、請求項 19 に記載の抗体断片。

【請求項 22】

A f f i b o d y、D A R P i n、A n t i c a l i n、A v i m e r、V e r s a b o d y、および D u o c a l i n からなる群から選択される、請求項 19 に記載の抗体模倣体。

【請求項 23】

50

請求項 19 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 24】

請求項 19 に記載の単離された抗体またはその抗原結合部分の重鎖または軽鎖をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 27】

請求項 1 または 19 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合部分を発現するハイブリドーマ。

【請求項 28】

以下の工程を含む、請求項 1 または 19 のいずれか一項に記載の抗体を作製する方法：

a . ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニック動物を、BMP2 ペプチドまたは BMP4 ペプチドで免疫する工程；

b . 前記トランスジェニック動物から B 細胞を回収する工程；

c . 前記 B 細胞からハイブリドーマを作製する工程；

d . BMP2 または BMP4 に結合する抗体を発現するハイブリドーマを選択する工程；および

e . 前記選択されたハイブリドーマ由来の BMP2 または BMP4 に結合する前記抗体を回収する工程。

【請求項 29】

以下の工程を含む、抗 - BMP2 抗体または抗 - BMP4 抗体を作製する方法：

a . ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニック動物を BMP2 ペプチドまたは BMP4 ペプチドで免疫する工程；

b . 前記トランスジェニック動物の前記 B 細胞から mRNA を回収する工程；

c . 前記 mRNA を cDNA に変換する工程；

d . フェージ内の前記 cDNA を、前記 cDNA によりコードされる抗 - BMP2 抗体または抗 - BMP4 抗体が前記フェージの表面上に提示されるように発現させる工程；

e . 抗 - BMP2 抗体または抗 - BMP4 抗体を提示するフェージを選択する工程；

f . 核酸分子を、前記抗 - BMP2 または抗 - BMP4 免疫グロブリンをコードする前記選択されたフェージから回収する工程；

g . 前記回収された核酸分子を宿主細胞内で発現させる工程；および抗体を BMP2 または BMP4 に結合する前記宿主細胞から回収する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2006 年 9 月 5 日に提出された米国仮特許出願第 60 / 824 , 596 号明細書の優先権を主張するものであり、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、概して免疫学および分子生物学の分野に関する。より詳細には、本明細書中では、骨形態形成 (morphogenic) タンパク質 (BMP) およびその受容体に特異的な抗体および他の治療タンパク質、かかる抗体および治療タンパク質をコードする核酸、発明のモノクローナル抗体および他の治療タンパク質を調製するための方法、ならびに疾患、例えば BMP の発現 / 活性によって媒介され、かつ / またはその受容体の異常な発現 / 活性を伴う骨疾患および癌を治療するための方法が提供される。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ヒト骨格は200を超える交連骨格を含む。骨格は、胚形成中に時間的かつ空間的な形成を指示する遺伝的プログラムに従い未分化間充組織から発達する。健常個体では、生後発育には骨折部位での骨再生による新しい骨格因子の開始が含まれる。

【0004】

骨格形成の正常な調節における改変により、軟部組織内で骨の異常な形成がもたらされうる。シャフリッツ (Shafritz) ら、*N. Engl. J. Med.* 335: 555 - 561 頁 (1996年) およびカプラン (Kaplan) ら、*J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2: 288 - 296 頁 (1994年)。極端な場合、異所性骨化とも称されるかかる異常な骨形成により、臨床的に有意であるかまたは壊滅的な結果がもたらされ、患者の生活の質が大幅に損なわれうる。異所性骨化の原因は変化し、中枢神経系または軟部組織の損傷；血管疾患（例えばアテローム硬化症 (atherosclerosis) および弁膜性心疾患）；および関節症（例えば強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、血清反応陰性関節症、および汎発性特発性骨増殖症 (diffuse idiopathic skeletal hyperostosis)）を通じて把握されうる。他の例では、異所性骨化は、進行性骨化性線維形成異常症または進行性骨異形成 (progressive osseous heteroplasia) などの遺伝的原因により発生しうる。カプラン (Kaplan) ら、「Heterotopic Ossification」*J. Amer. Acad. of Orth. Surg.* 12 (2): 116 - 125 頁 (2004年) に概説されている。

10

20

【0005】

脊椎関節炎 (spondyloarthritides) (SpA) は、総じて脊髄炎症、有意な疼痛、および機能障害により特徴づけられる一群の疾患を示し、これらの疾患は患者の生活の質に多大な影響を及ぼす。ブラウン (Braun) ら、*Arthritis Rheum.* 41: 58 - 67 頁 (1998年)；ジンク (Zink) ら、*J. Rheumatol.* 27: 613 - 622 頁 (2000年)；およびダグフィンラド (Dagfinrud) ら、*Ann. Rheum. Dis.* 63: 1605 - 1610 頁 (2004年)。SpA は、例えば、強直性脊椎炎、乾癬性脊椎関節炎、反応性脊椎関節炎、炎症性腸疾患を併発した脊椎関節炎、および未分化脊椎関節炎などの衰弱性機能障害を含む。

30

【0006】

強直性脊椎炎 (AS) および関連の脊椎関節症は、最も一般的な炎症性リウマチ性疾患の中に含まれる。米国および北欧では、これらの障害は、約0.1%~0.3%の推定有病率（主に20~40歳の個人が罹患）を有する。カン (Khan)、「A Worldwide Overview: The Epidemiology of HLA-B27 and Associated Spondyloarthritides」(オックスフォード (Oxford): オックスフォード大学出版会 (Oxford University Press) (1998年)) およびサラフ (Saraux) ら、*J. Rheumatol.* 26: 2622 - 2627 頁 (1999年)。AS特有の臨床的特徴は、通常は仙腸骨炎および付着部炎 (enthesitis) を原因とする炎症性の背痛を含む。ASは、典型的には軸骨格を含むが、末梢関節（肩および股）および関節外構造にも影響を及ぼしうる。

40

【0007】

強直性脊椎炎を有する患者は、靱帯骨棘および強直をもたらす、新たな骨形成による最も重篤な脊髄合併症を示す。したがって、ASは異所性骨化を示す複数の疾患のうちの1つである。グラドマン (Gladman) ら、*Arthritis Rheum.* 50: 24 - 35 頁 (2004年) およびエドモンズ (Edmunds) ら、*J. Rheumatol.* 18: 696 - 698 頁 (1991年)。証拠が増えることは、ASでは腱や靱帯が下層の骨に付着するエンテシスと称される解剖学的領域が病理学的過程の主な標的

50

であることを示唆している。ボール (Ball)、Ann. Rheum. Dis. 30: 213-223頁(1971年)およびベンジャミン (Benjamin) およびマッゴーネイグル (McGonagle)、J. Anat. 199: 503-526頁(2001年)。

【0008】

強直性脊椎炎および関連の脊椎関節症における動物モデル系について記載がなされており、それらの大部分がASとヒト白血球抗原-B27 (HLA-B27)の発現との間の密接な関連性に基づくものである。チャン (Zhang) ら、Current Rheum. Reports 4: 507-512頁(2002年)に概説されている。HLA-B27トランス遺伝子のラットへの導入により、脊椎炎を含む多臓器障害 (multisystem disorder) の自然発生が誘発される。ハンマー (Hammer) ら、Cell 63: 1099-1112頁(1990年)。HLA-B27トランスジェニックマウス (C57BL/10) は、足首または足根関節の進行性硬化を伴う末梢性関節炎を発症しても脊椎は罹患しない。ワインライヒ (Weinreich) ら、Hum. Immunol. 42: 103-115頁(1995年)。プロテオグリカン、アグリカン (aggrecan) およびパーシカン (versican) のG1ドメインのいずれかに対する免疫により、BALB/cマウスで脊椎炎、仙腸骨炎、および付着部炎を含むAS様の病状が誘発されうること報告されている。グラント (Grant) ら、Arthritis Rheum. 30: 201-212頁(1987年) およびシ (Shi) ら、Arthritis Rheum. 44: S240 (2001年)。DBA/1マウスは、関節炎、強直性付着部炎および異常な骨形成の自然発生モデルである。ロリーズ (Lories) ら、J. Clin. Invest. 115(6): 1571-9頁(2005年)。マトリックスGLAタンパク質を欠損したマウスは、動脈および軟骨の自発的石灰化を示すことが示されていることから、血管石灰化のためのモデル系として用いられる。ルオ (Luo) ら、Nature 386: 78-81頁(1997年)。

【0009】

骨形態形成タンパク質 (BMP) は、形質転換成長因子 (TGF) スーパーファミリーのメンバの多機能成長因子である。BMPシグナル伝達は、心臓、神経、および軟骨の発生ならびに出生後の骨形成において役割を果たす。BMPは、軟骨内骨形成カスケードを異所性に誘発し、骨格および関節の形態形成において重要な役割を果たす。ウリスト (Urist)、Science 150: 893-899頁(1965年); オルセン (Olsen) ら、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16: 191-220頁(2000年); クローネンバーグ (Kronenberg)、Nature 423: 332-336頁(2003年); トーマス (Thomas) ら、Nat. Genet. 12: 315-317頁(1996年); トーマス (Thomas) ら、Nat. Genet. 17: 58-64頁(1997年); ポリンコウスキー (Polinkowsky) ら、Nat. Genet. 17: 18-19頁(1997年); およびストーム (Storm) ら、Nature 368: 639-643頁(1994年)。

【0010】

約20のBMPのファミリーメンバが同定されている。BMPはタイプIおよびIIの双方を含むセリン/トレオニンキナーゼ受容体を介してシグナル伝達する。3つのタイプI受容体はBMPリガンド (タイプIAおよびIB BMP受容体とタイプIAクチピン受容体 (ActRI)) に結合する。ケーニヒ (Koenig) ら、Mol. Cell. Biol. 14: 5961-5974頁(1994年) およびテン・ディーケ (Ten Dijke) ら、J. Biol. Chem. 269: 16985-16988頁(1994年); およびマシアス・シルバ (Macias-Silva) ら、J. Biol. Chem. 273: 25628-25636頁(1998年)。BMPは、細胞質内で大きい二量体のプロタンパク質として合成され、折り畳まれ、分泌中にプロテアーゼにより切断される。各単量体は、プロタンパク質として約300のアミノ酸を有する。機能的カルボキシ領域 (各単量体内に100~120個のアミノ酸) が細胞外区画に放出され、膜受容

10

20

30

40

50

体が標的細胞上に結合する。BMPの二量体化が2つのサブユニット間のいくつかのジスルフィド結合に依存するが、二量体化および切断の正確な生化学反応については特徴づけがなされていない状況である。さらに、BMPの機能に拮抗するかそれ以外ではそれを改変する一連の細胞外タンパク質が存在するように思われ、これらのタンパク質はグリピカン(Glypican)-3、ノギン(Noggin)、コルディン(Chordin)、セルベラス(Cerberus)、およびフォリスタチン(Follistatin)を含む。フェインソド(Fainsod)ら、*Mech. Dev.* 63:39-50頁(1997年); グリサル(Grisaru)ら、*Dev. Biol.* 231:31-46頁(2001年); ホレイ(Holley)ら、*Cell* 86:607-617頁(1996年); イエムラ(Iemura)ら、*Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 95:9337-9342頁(1998年); ジャクソン(Jackson)ら、*Development* 124:4113-4120頁(1997年); パイネ-サウンダーズ(Paine-Saunders)ら、*Dev. Biol.* 225:179-187頁(2000年); ピッコロ(Piccolo)ら、*Cell* 86:589-598頁(1996年); レエム-カルマ(Re'em-Kalma)ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:12141-12145頁(1995年); ササイ(Sasai)ら、*Nature* 376:333-336頁(1995年); およびジーマン(Zimmerman)ら、*Cell* 86:599-606頁(1996年)。BMPに対する3種のタイプII受容体も同定されている(すなわちBMPRI、ActRIIおよびActRIIB)。山下(Yamashita)ら、*J. Cell. Biol.* 130:217-226頁(1995年); ローゼンワグ(Rosenzweig)ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:7632-7636頁(1995年); カワバタ(Kawabata)ら、*J. Biol. Chem.* 270:5625-5630頁(1995年)。

【0011】

タイプIおよびII BMP受容体は様々な組織内で異なる形で発現されるが、いずれもシグナル伝達にとって必須である。リガンド結合時、タイプIおよびII BMP受容体は、ヘテロ四量体-活性化受容体複合体を形成し、タイプIおよびII受容体複合体の2つのペアを含む。ムスタカス(Moustakas)およびヘルディ(Heldi)、*Genes Dev.* 16:67-87頁(2002年)。シグナル伝達には両方の受容体タイプが必須である。ホーガン(Hogan)、*Genes Dev.* 10:1580-1594頁(1996年); ネレン(Nellen)ら、*Cell* 78:225-237頁(1994年); ルベルテ(Ruberte)ら、*Cell* 80:889-897頁(1995年); テン・ディーケ(Ten Dijke)ら、*Curr. Opin. Cell Biol.* 8:139-145頁(1996年); ワイス-ガルシア(Weis-Garcia)およびマッサーグ(Massague)、*EMBO J.* 15:276-289頁(1996年); およびウラナ(Wrana)ら、*Nature* 370:341-347頁(1994年)。タイプII受容体は、リガンド結合時にタイプI受容体をリン酸化する構成的に活性なキナーゼ活性を有する。リン酸化タイプI受容体は、シグナルを下流の標的タンパク質に形質導入する。

【0012】

タイプI BMP受容体は、Smadタンパク質(smad1/5)を介してシグナル伝達し、受容体から核内の標的遺伝子へのBMPシグナルの中継において重要である。リン酸化Smadタンパク質は、受容体からの放出時、関連タンパク質Smad4と結合し、共通パートナー(shared partner)として作用する。この複合体は核内に移行し、他の転写因子を用いる遺伝子転写に関与する。

【0013】

BMPシグナル伝達は、ノギンなどの細胞外アンタゴニスト経路を含む多数のレベルで制御される。マッサーグ(Massague)、*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178頁(2000年)。正常な発生にとって基本的なシグナル伝

達系の時機を失するかまたは望ましくない活性化により、脊椎関節症などの疾病過程が促進されることが示唆されている。ノギンの遺伝子導入による関節炎の開始および進行に対するBMPシグナル伝達の効果について、記載がなされている。ロリーズ(Loriss)ら、J. Clin. Invest. 115(6):1571-1579頁(2005年)。

【0014】

骨格および四肢の発生を含む正常な骨形成におけるBMPおよびBMP受容体のシグナル伝達の生理的役割については試験され、最近ではチャオ(Zhao)、Genetics 35:43-56頁(2003年)において概説されている。軟骨内骨化の間、間葉細胞は凝集し、分化して軟骨細胞になる。軟骨細胞は、高度に組織化された分化プログラムを受け、骨形成における鋳型を形成する。クロネンバーグ(Kronenberg)、Nature 423:332-336頁(2003年)およびオルセン(Olsen)ら、Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16:191-220頁(2000年)。BMPは、異所性軟骨および骨の形成を促進するその能力により同定された。ウォズニー(Wozney)、Prog. Growth Factor Res. 1:267-280頁(1989年)。3つのタイプI受容体、すなわちBMPRI A、BMPRI B、およびActRI(アクチビン受容体タイプI)に対する異なるBMPリガンドのディファレンシャルな(differential)親和性は、発生の過程でシグナル伝達の多様性に寄与する。これらの受容体は軟骨形成に関与し、各々は異なる組織分布および機能を有する。

【0015】

BMP2およびBMP4の欠損したマウスは生存できない。ホモ接合性BMP2突然変異体の胚は、胚の7.5~10.5日目に死滅し、心臓の発生中に欠損を有する。チャン(Zhang)およびブラッドレイ(Bradley)、Development 122:2977-2986頁(1996年)。ホモ接合性のBMP4突然変異体の胚は、胚の6.5~9.5日目に死滅し、中胚葉分化に欠損がある。ウィニアー(Winnier)ら、Genes Dev. 9:2105-2116頁(1995年)。

【0016】

ユーン(Yoon)らは、軟骨細胞内でBmpr1aおよびBmpr1bの双方が欠損したマウスの生成について記載した。Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(14):5062-5067頁(2005年)。これらの筆者らは、Bmpr1a条件下のノックアウトマウスが、Bmpr1bヌルマウスと同様、骨格上の欠損を示すことがほとんどないことを実証している。しかし、両方の変異を内在するマウスは、重篤で全身性の軟骨異形成を発生させる。これらのデータは、初期軟骨形成の間ではBMPRI AおよびBMPRI Bにおいて機能が重複することや、BMPシグナル伝達が軟骨細胞の増殖、生存、および分化にとって必要とされることを示唆している。BMPRI A遺伝子のヌル突然変異がマウスにおける胚致死性を引き起こし、動物は胚の9.5日目に死亡する。形態欠損を伴うホモ接合性突然変異体は胚の7.5日目に検出可能であり、胚は中胚葉形成において欠損がある。ミシナ(Mishina)ら、Genes Dev. 9:3027-3037頁(1995年)。

【0017】

BMPRI B欠損マウスは生存可能であるが、四肢骨において欠損を示す。BMPRI B欠損マウスでは、指骨領域内での前軟骨形成(prechondrogenic)細胞の増殖および軟骨細胞の分化が低下する。成体突然変異マウスでは、近位指節間関節が欠如し、指骨が単一の未発達な成分に置き換わる一方、遠位指骨は影響を受けることがない。橈骨、尺骨、および脛骨の長さは正常であるが、中手骨および中足骨では減少する。イ(Yi)ら、Development 127:621-630頁(2000年)。BMPRI Bがインビボでの軟骨形成において不要でない役割を果たす可能性が高いことが示唆されている。ギャノン(Gannon)ら、Hum. Pathol. 28:339-343頁(1997年)。BMPリガンドは、複数のタイプI BMP受容体を用い、軟骨

および骨形成の間にそのシグナル伝達を媒介することが可能であり、かつ、BMPR1B および ActR1A (Alk2) は、インビボでの軟骨および骨形成において相乗的および/または重複的役割を果たしうる。マシアス・シルバ (Macias-Silva) ら、J. Biol. Chem. 273: 25628 - 25636 頁 (1998年)。

【0018】

ノギンは、BMP-2 および BMP4 に結合しかつそれらを不活性化する分泌ポリペプチドである。ノギンと BMP の共結晶構造は、ノギンがタイプ I およびタイプ II BMP 受容体の双方に対する結合エピトープの分子間相互作用を遮断することにより BMP シグナル伝達を阻害することを示す。トランスジェニックマウスモデルが、ノギントランス遺伝子を駆動するためのオステオカルシンプロモーターを用いて確立されている。これらの動物は、骨鉱質密度、骨容量、および骨形成速度における有意な低下からも明らかのように骨粗鬆症を発症した。デブリン (Devlin) ら、Endocrinology 144: 1972 - 1978 頁 (2003年) およびウー (Wu) ら、J. Clin. Invest. 112: 924 - 924 頁 (2003年)。全体として、BMP アンタゴニストを用いるこれらの実験では、BMP シグナル伝達タンパク質の調節がインビボでの骨形成の中核をなすことが示される。

10

【0019】

動物モデル系については記載がなされ、BMP2 における軟骨形成および骨形成の開始により骨欠損を治療する能力を評価するのに用いられている。BMP2 の骨誘導能力は、ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、および非ヒト霊長類で見られるこの成長因子により媒介される長骨に対する治療効果と合致している。村上 (Murakami) ら、J. Biomed. Mater. Res. 62: 169 - 174 頁 (2002年)。マウスの頭蓋冠の表面上への BMP-2 の局部注射により、予め軟骨面を有しない頭蓋冠の表面上に骨膜骨形成が誘発された。チェン (Chen) ら、Calcif. Tissue Int. 60: 283 - 290 頁 (1997年)。また、マウスモデルでは、組換えヒト BMP2 の全身投与により、間葉幹細胞の活性が高まり、卵巣切除誘発性で加齢に伴う骨欠損が食い止められ、これは BMP2 が骨粗鬆症の治療において治療的に有効でありうることを示唆している。ターゲマン (Turgeman) ら、J. Cell. Biochem. 86: 461 - 474 頁 (2002年)。

20

【0020】

BMP2 および 4 ならびに BMPR1A の過剰発現が口腔上皮の悪性腫瘍に伴う一方、BMP2 の過剰発現は前立腺癌細胞内で報告されている。各々、ジン (Jin) ら、Oral Oncol. 37: 225 - 233 頁 (2001年) およびハリス (Harris) ら、Prostate 24: 204 - 211 頁 (1994年)。BMP はメラノーマ細胞系内で転移挙動を促進することも示されている。ロスハマー (Rothhammer) ら、Cancer Res. 65(2): 448 - 56 頁 (2005年)。

30

【0021】

進行性骨化性線維形成異常症 (FOP) は、足の親指の先天性奇形や予測可能な解剖学的パターンにおける進行性の異所性軟骨内 (endochondral) 骨化により特徴づけられる障害を引き起こす、希少でかつ無能にする遺伝性疾患である。BMP4 の異所性発現が FOP 患者において見出されている。ギャノン (Gannon) ら、Hum. Pathol. 28: 339 - 343 頁 (1997年) およびスー (Xu) ら、Clin. Genet. 58: 291 - 298 頁 (2000年)。最近、FOP を有する患者が BMP タイプ I 受容体 ACVRI において活性化変異を有することが示されている。ショアー (Shore) ら、Nat. Gen. 23 April アドバンス・オンライン・パブリケーション (advance online publication) (2006年)。BMP4 をニューロン特異的エノラーゼ (NSE) プロモーターの制御下で過剰発現するトランスジェニックマウスは、FOP 様表現型を発生させるものとしても記載されている。カン (Kan) ら、Am. J. of Path. 165(4): 1107 - 1115 頁 (2004年)。これらの動物を、ノギンを過剰発現するトランスジェニックマウスと

40

50

交尾させることにより疾患が予防され、それ故に疾患の病原におけるBMP4の役割が確認される。

【0022】

SpAは、異所性または異常な骨形成を含む別の病状である。SpA、特に強直性脊椎炎における既存の治療様式は、ゾッホリング(Zochling)ら、Curr. Opin Rheumatol. 17: 418 - 425頁(2005年)およびファン・デル・ヘイデ(van der Heijde)ら、Ann. Rheum. Dis. 61: 24 - 32頁(2002年)において概説されている。ベースライン治療は、非ステロイド抗炎症薬(NSAID)の使用および構造化運動を含む。ドーガドス(Dougados)ら、Arthritis Rheum. 44: 180 - 185頁(2001年)；カン(Khan)、Sem. Arthritis Rheum. 15 (Suppl 1): 80 - 84頁(1985年)；ワスナー(Wasner)ら、JAMA 246: 2168 - 2172頁(1981年)；ヒディング(Hidding)ら、Arthritis Care Res. 6: 117 - 125頁(1993年)；スウィーニー(Sweeney)ら、J. Rheumatol. 29: 763 - 766頁(2002年)；およびダグフィンラド(Dagfinrud)ら、「コクランデータベース“システムティック・レビュー”(The Cochrane Database of Systematic Reviews)」、第4号、Art. No.: CD002822、DOI: 10.1002/14651858.CD002822.pub2(2004年)。抗リウマチ薬により強直性脊椎炎を治療する試みは不本意であった。スルファサラジンは、SpAを伴う末梢性関節炎を改善するが、脊髄疼痛を改善しない。クレグ(Clegg)ら、Arthritis Rheum. 39: 2004 - 2012頁(1996年)；クレグ(Clegg)ら、Arthritis Rheum. 42: 2325 - 2329頁(1999年)；ドーガドス(Dougados)ら、Arthritis Rheum. 38: 618 - 627頁(1995年)；およびニッシラ(Nissila)ら、Arthritis Rheum. 31: 1111 - 1116頁(1988年)。同様に、メトトレキサートおよびレフルノミドは、関節リウマチの治療において有効である一方、強直性脊椎炎に対して最小の有効性を示す。チェン(Chen)ら、「コクランデータベースシステムティック・レビュー(The Cochrane Database of Systematic Reviews)」、第3号、Art. No.: CD004524、DOI: 10.1002/14651858.CD004524.pub2(2003年)；ハイベル(Haibel)ら、Ann. Rheum. Dis. 64: 124 - 126頁(2005年)；およびヴァン・デンドレン(Van Denderen)ら、Ann. Rheum. Dis. 63 (Suppl 1): 397頁(2004年)。

【0023】

より最近になり、腫瘍壊死因子(TNF)遮断薬の使用が試みられ、限定的には奏功している。例えば、ファン・デル・ヘイデ(Van der Heijde)ら、Arthritis Rheum. 52: 582 - 591頁(2005年)では、治療群の61%がインフリキシマブでの治療の24週後にASAS20に应答することが報告された。ブラウン(Braun)ら、Ann. Rheum. Dis. 64: 229 - 234頁(2005年)；ブラウン(Braun)ら、Lancet 359: 1187 - 1193頁(2002年)；およびミューズ(Mease)ら、Lancet 356: 385 - 390頁(2000年)も参照のこと。同様に、エタネルセプトを用いる最近の試験では、陽性应答が脊髄炎症、背痛、および物理的障害の低下を含む場合の強直性脊椎炎の治療において約60%の应答速度が示されている。ブランド(Brandt)ら、Arthritis Rheum. 48: 1667 - 1675頁(2003年)、デビス(Davis)ら、Arthritis Rheum. 48: 3230 - 3236頁(2003年)；およびゴルマン(Gorman)ら、N. Engl. J. Med. 346: 1349 - 1356頁(2002年)。

【0024】

ヒト化モノクローナル抗-TNF抗体のアダリムマブでの初期試験では、予備的ではあるが、この治療が強直性脊椎炎の治療におけるインフリキシマブおよびエタネルセプトに匹敵しうることが示されている。ハイベル(Haibel)ら、Arthritis Rheum. 50(Suppl):S217(2004年)。さらに、組換えヒトインターロイキン-1受容体アンタゴニストのアナキンラ、ビスホスホネートおよびサリドマイド、および抗生物質治療薬が強直性脊椎炎の治療用に試みられているが、これまでの結果は決定的なものでない。タン(Tan)ら、Ann. Rheum. Dis. 63:1041-1045頁(2004年)；マクシモウィッチ(Maksymowych)ら、Arthritis Rheum. 46:766-773頁(2002年)；およびクヴェイン(Kvein)ら、Ann. Rheum. Dis. 63:1113-1119頁(2004年)を参照のこと。

10

【0025】

全体として、強直性脊椎炎および他の脊椎関節炎疾患の治療における治療レジメンの開発においては、部分的には治療が骨形成および脊髄融合を予防しないことからほとんど進歩がなされていない。疾患の完全な制御を得るため、軟骨および骨形成を特異的に標的化する治療方法が、既存の免疫抑制治療薬に対する代替薬または補完薬のいずれかとして必要とされうる。したがって、当該技術分野では、骨形態形成タンパク質およびその受容体の異常な発現/活性を原因とする疾患を含む、強直性脊椎炎および他の脊椎関節炎疾患を伴う骨障害ならびに異常な骨形成および骨化を伴う他の疾患の治療における新しい様式に対する需要の余地がある。

20

【発明の概要】

【0026】

本発明は、骨形態形成タンパク質に特異的な抗体および他の治療タンパク質とそれらに対する受容体、かかる抗体および治療タンパク質をコードする核酸、抗-BMPや抗-BMPRモノクローナル抗体および他の治療タンパク質を調製するための方法、ならびに、限定はされないが、進行性骨化性線維形成異常症(FOP)、進行性骨異形成症(POH)、脊髄(spinal chord)損傷、筋肉内血腫、整形手術をもたらす鈍的外傷、乾癬性関節炎、変形性関節症、強直性脊椎炎、血清反応陰性関節症、骨格骨化過剰症、耳硬化症、あぶみ骨強直症、骨肉腫、前立腺癌および外骨腫、アテローム硬化症、弁膜性心疾患、肺癌、メラノーマ、造血癌、腎癌、ならびに乳癌を含む骨疾患および癌などの疾患を治療するための方法を提供することにより、これらや他の関連する需要に対処する。

30

【0027】

したがって、本発明は、1つ以上の骨形態形成タンパク質およびその受容体に結合しかつ1つ以上の望ましい機能特性を示す単離されたモノクローナル抗体、特にマウス、キメラ、ヒト化、および完全ヒトモノクローナル抗体を提供する。かかる特性は、例えばBMP2および/またはBMP4などのヒト骨形態形成タンパク質に対する高親和性の特異的結合あるいはBMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2などのヒト骨形態形成タンパク質受容体に対する高親和性の特異的結合を含む。種々の骨形態形成タンパク質媒介性疾患を、本発明の抗体、タンパク質、および組成物を用いて治療するための方法も提供される。

40

【0028】

本明細書中に開示される抗体および治療タンパク質は、(a)リガンド(すなわちBMP2および/またはBMP4)の同族受容体(すなわちBMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2)に対する結合、ならびに/あるいは(b)受容体のヘテロ二量体の形成、ならびに/あるいは(c)受容体のシグナル伝達を、遮断可能である。

【0029】

一態様では、本発明は、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、ここで抗体は、

(a)ヒト骨形態形成タンパク質(例えばBMP2もしくはBMP4)またはその受容

50

体（例えば B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、もしくは B M P R 2）に 1×10^{-7} M 以下の K_D で結合し、および / あるいは

（b）細胞（例えばヒトまたは C H O）に結合し、ここで前記細胞はヒト骨形態形成タンパク質および / またはその受容体を発現する。

【0030】

より特定の実施形態では、抗体は、ヒト骨形態形成タンパク質またはその受容体に、 5×10^{-8} M 以下、典型的には 2×10^{-8} M 以下、より典型的には 1×10^{-8} M 以下、さらにより典型的には 6×10^{-9} M 以下、 3×10^{-9} M 以下、または 2×10^{-9} M 以下の K_D で結合する。

【0031】

別の実施形態では、本発明は、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体は、骨形態形成タンパク質またはその受容体に対する結合において参照抗体と交差競合（cross-compete）し、ここで参照抗体は、

（a）ヒト骨形態形成タンパク質もしくはその受容体に 1×10^{-7} M 以下の K_D で結合し、および / または

（b）ヒト骨形態形成タンパク質および / もしくはその受容体を発現する細胞に結合する。

【0032】

別の実施形態では、本発明は、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体は、B M P 2 または B M P 4 に対する結合において、

（a）配列番号 31、32、または 33 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

（b）配列番号 34、35、または 36 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む参照抗体と交差競合する。

【0033】

様々な実施形態では、参照抗体は、

（a）配列番号 31 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

（b）配列番号 34 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含むか、または参照抗体は、

（a）配列番号 32 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

（b）配列番号 35 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含むか、または参照抗体は、

（a）配列番号 33 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

（b）配列番号 36 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

【0034】

別の態様では、本発明は、ヒト V_H 3 - 33 遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関し、ここで抗体は B M P 2 または B M P 4 に対して特異的に結合する。本発明は、ヒト V_H 4 - 34 遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分も提供し、ここで抗体は B M P 2 または B M P 4 に対して特異的に結合する。本発明は、ヒト V_H 4 - 59 遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分も提供し、ここで抗体は B M P 2 または B M P 4 に対して特異的に結合する。本発明は、ヒト V_K A 27 遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分をさらに提供し、ここで抗体は B M P 2 または B M P 4 に対して特異的に結合する。本発明は、ヒト V_K L 6 遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分をさらに提供し、ここで抗体は B M P 2 または B M P 4 に対して特異的に結合する。本発明は、

ヒト $V_K L 15$ 遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分をさらに提供し、ここで抗体は $BMP 2$ または $BMP 4$ に対して特異的に結合する。

【0035】

好ましい実施形態では、本発明は、

- (a) ヒト $V_H 3 - 33$ 、 $4 - 34$ 、もしくは $4 - 59$ 遺伝子の重鎖可変領域、および
- (b) ヒト $V_K A 27$ 、 $L 6$ 、もしくは $V_K L 15$ の軽鎖可変領域

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体は $BMP 2$ または $BMP 4$ に対して特異的に結合する。

【0036】

10

好ましい実施形態では、抗体はヒト $V_H 4 - 59$ 遺伝子の重鎖可変領域およびヒト $V_K A 27$ 遺伝子の軽鎖可変領域を含む。別の好ましい実施形態では、抗体はヒト $V_H 4 - 34$ 遺伝子の重鎖可変領域およびヒト $V_K L 6$ 遺伝子の軽鎖可変領域を含む。別の好ましい実施形態では、抗体は、ヒト $V_H 3 - 33$ 遺伝子の重鎖可変領域およびヒト $V_K L 15$ 遺伝子の軽鎖可変領域を含む。

【0037】

別の態様では、本発明は、 $CDR 1$ 、 $CDR 2$ 、および $CDR 3$ 配列を含む重鎖可変領域と $CDR 1$ 、 $CDR 2$ 、および $CDR 3$ 配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここでは

(a) 重鎖可変領域の $CDR 3$ 配列は配列番号 19、20、および 21 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列ならびにその保存的修飾を含み、

20

(b) 軽鎖可変領域の $CDR 3$ 配列は配列番号 28、29、および 30 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列ならびにその保存的修飾を含み、かつ

(c) 抗体はヒト $BMP 2$ または $BMP 4$ に $1 \times 10^{-7} M$ 以下の K_D で結合する。

【0038】

好ましくは、重鎖可変領域 $CDR 2$ 配列は、配列番号 16、17、および 18 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ軽鎖可変領域の $CDR 2$ 配列は、配列番号 25、26、および 27 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含む。好ましくは、重鎖可変領域の $CDR 1$ 配列は、配列番号 13、14、および 15 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ軽鎖可変領域の $CDR 1$ 配列は、配列番号 22、23、および 24 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含む。

30

【0039】

好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号 13 を含む重鎖可変領域の $CDR 1$
- (b) 配列番号 16 を含む重鎖可変領域の $CDR 2$;
- (c) 配列番号 19 を含む重鎖可変領域の $CDR 3$;
- (d) 配列番号 22 を含む軽鎖可変領域の $CDR 1$;
- (e) 配列番号 25 を含む軽鎖可変領域の $CDR 2$; および
- (f) 配列番号 28 を含む軽鎖可変領域の $CDR 3$

40

を含む。

【0040】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号 14 を含む重鎖可変領域の $CDR 1$;
- (b) 配列番号 17 を含む重鎖可変領域の $CDR 2$;
- (c) 配列番号 20 を含む重鎖可変領域の $CDR 3$;
- (d) 配列番号 23 を含む軽鎖可変領域の $CDR 1$;
- (e) 配列番号 26 を含む軽鎖可変領域の $CDR 2$; および
- (f) 配列番号 29 を含む軽鎖可変領域の $CDR 3$

50

を含む。

【0041】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号15を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b) 配列番号18を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c) 配列番号21を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d) 配列番号24を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e) 配列番号27を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f) 配列番号30を含む軽鎖可変領域のCDR3

を含む。

10

【0042】

本発明の他の好ましい抗体またはその抗原結合部分は、

(a) 配列番号31、32、および33からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

(b) 配列番号34、35、および36からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含み、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。

【0043】

好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号31のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号34のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

20

【0044】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号32のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号35のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

【0045】

別の好ましい組み合わせは、

- (a) 配列番号33のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および
- (b) 配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

30

【0046】

本発明の別の態様では、BMP2またはBMP4に対する結合において上記抗体のいずれかと競合する抗体またはその抗原結合部分が提供される。

【0047】

本発明の抗体は、例えば、典型的にはIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプの完全長抗体でありうる。あるいは、抗体は、抗体断片、例えばFab、Fab'、もしくはFab'₂断片または一本鎖抗体（例えばscFv）でありうる。

【0048】

本発明は、治療物質、例えば細胞毒素または放射性同位体に連結された本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む免疫複合体も提供する。本発明は、前記抗体またはその抗原結合部分とは異なる結合特異性を有する第2の機能部分に連結された本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む、二重特異性分子も提供する。本発明は、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、またはBMPR2に特異的な、Affibody、ドメイン抗体、Nanobody、UniBody、DARPin、Anticalin、Avimer、Versabody、およびDuocalinも提供する。

40

【0049】

本発明の、抗体またはその抗原結合部分または免疫複合体または二重特異性分子、および薬学的に許容される担体を含む組成物もまた提供される。

50

【 0 0 5 0 】

抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸分子も、かかる核酸を含む発現ベクター、かかる発現ベクターを含む宿主細胞、ならびに抗 - B M P 2 抗体、抗 - B M P 4 抗体、抗 - B M P R 1 A 抗体、抗 - B M P R 1 B 抗体、抗 - A C T R 1 抗体、および / または抗 - B M P R 2 抗体をかかかる宿主細胞を用いて作製するための方法と同様に、本発明に包含される。

【 0 0 5 1 】

さらに、本発明は、ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖トランス遺伝子を含むトランスジェニックマウスならびにかかかるマウスから調製されるハイブリドーマを提供し、ここでマウスは本発明の抗体を発現し、ハイブリドーマは本発明の抗体を産生する。

10

【 0 0 5 2 】

さらに別の態様では、本発明は、B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / またはB M P R 2を発現する骨および / または腫瘍細胞の成長によって特徴づけられる疾患を治療または予防するための方法であって、本発明の抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 ヒト抗体を、疾患を治療または予防するのに有効な量で対象に投与する工程を含む方法を提供する。疾患は骨疾患および / または癌でありうる。

【 0 0 5 3 】

さらに別の態様では、本発明は、自己免疫疾患を治療する方法であって、本発明の抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 ヒト抗体を、疾患を治療するのに有効な量で対象に投与する工程を含む方法を提供する。

20

【 0 0 5 4 】

本発明の他の特徴および利点は以下の詳細な説明および実施例から明白となり、それらは限定するものとして解釈されるべきではない。本願の全体を通じて言及されるあらゆる参考文献の内容、G e n B a n k アクセス番号、特許および公開された特許出願は、参照により本明細書中に明示的に援用される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 5 】

【図 1 a】6 H 4 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 3 7）およびアミノ酸配列（配列番号 3 1）を示す。C D R 1（配列番号 1 3）、C D R 2（配列番号 1 6）およびC D R 3（配列番号 1 9）領域が図示され、かつV、DおよびJ生殖細胞系誘導体が見られる。

30

【図 1 b】6 H 4 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 4 0）およびアミノ酸配列（配列番号 3 4）を示す。C D R 1（配列番号 2 2）、C D R 2（配列番号 2 5）およびC D R 3（配列番号 2 8）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が見られる。

【図 2 a】1 1 F 2 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 3 8）およびアミノ酸配列（配列番号 3 2）を示す。C D R 1（配列番号 1 4）、C D R 2（配列番号 1 7）およびC D R 3（配列番号 2 0）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が見られる。

40

【図 2 b】1 1 F 2 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 4 1）およびアミノ酸配列（配列番号 3 5）を示す。C D R 1（配列番号 2 3）、C D R 2（配列番号 2 6）およびC D R 3（配列番号 2 9）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が見られる。

【図 3 a】1 2 E 3 ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 3 9）およびアミノ酸配列（配列番号 3 3）を示す。C D R 1（配列番号 1 5）、C D R 2（配列番号 1 8）およびC D R 3（配列番号 2 1）領域が図示され、かつVおよびJ生殖細胞系誘導体が見られる。

【図 3 b】は1 2 E 3 ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列

50

番号 42) およびアミノ酸配列 (配列番号 36) を示す。CDR1 (配列番号 24)、CDR2 (配列番号 27) および CDR3 (配列番号 30) 領域が図示され、かつ V および J 生殖細胞系誘導体が示される。

【図 4】6H4 の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 31) とヒト生殖細胞系 V_H 4-34 のアミノ酸配列 (配列番号 51)、V および J 領域の間に位置するヒト生殖細胞系 D_H 3-10 のアミノ酸配列 (配列番号 52)、およびヒト生殖細胞系 J_H JH1 のアミノ酸配列 (配列番号 53) とのアラインメントを示す。

【図 5】11F2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 32) とヒト生殖細胞系 V_H 4-59 のアミノ酸配列 (配列番号 43)、V および J 領域の間に位置するヒト生殖細胞系 D_H 2-2 のアミノ酸配列 (配列番号 45)、およびヒト生殖細胞系 J_H JH5b のアミノ酸配列 (配列番号 46) とのアラインメントを示す。

【図 6】12E3 の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 33) とヒト生殖細胞系 V_H 3-33 のアミノ酸配列 (配列番号 44) およびヒト生殖細胞系 J_H JH6b のアミノ酸配列 (配列番号 47) とのアラインメントを示す。

【図 7】6H4 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 34) とヒト生殖細胞系 V_K L6 のアミノ酸配列 (配列番号 54) およびヒト生殖細胞系 J_K JK2 のアミノ酸配列 (配列番号 55) とのアラインメントを示す。

【図 8】11F2 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 35) とヒト生殖細胞系 V_K A27 のアミノ酸配列 (配列番号 48) およびヒト生殖細胞系 J_K JK4 のアミノ酸配列 (配列番号 50) とのアラインメントを示す。

【図 9】12E3 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 36) とヒト生殖細胞系 V_K L15 のアミノ酸配列 (配列番号 49) およびヒト生殖細胞系 J_K JK4 のアミノ酸配列 (配列番号 50) とのアラインメントを示す。

【図 10】ピアコア (Biacore) 分析により、BMP4 のタイプ - II (図 10a) およびタイプ - I (図 10b) の BMP 受容体に対する結合を遮断する抗 - BMP2/4 モノクローナル抗体を示す。

【図 11】抗 - BMP2/4 抗体による BMP2 および BMP4 のシグナル伝達の阻害を示す。C2C12 細胞は組換えヒト BMP2 (図 11a) または BMP4 (図 11b) および様々な濃度の 5 つの異なる中和抗 - BMP2/4 モノクローナル抗体または IgG1 対照 mAb とともにインキュベートされた。細胞は固定され、溶解され、かつアルカリホスファターゼ活性についてアッセイされた。

【図 12】デンシトメトリー走査により、骨形成が本発明の抗 - BMP2 モノクローナル抗体により有意に低下することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0056】

詳細な説明

本発明は、1 つ以上の骨形態形成タンパク質 (BMP) または 1 つ以上の骨形態形成タンパク質受容体 (BMPR) および / またはアクチビン A 受容体 (ACTR1) に対して高い親和力で特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体、特にマウス、キメラ、ヒト化、および完全ヒトモノクローナル抗体に関する。特定の実施形態では、本発明の抗体は、特定の重鎖および軽鎖生殖細胞系配列に由来し、かつ / または特定のアミノ酸配列を含む CDR 領域などの特定の構造的特徴を含む。したがって、本発明は、単離された抗体、免疫複合体、二重特異性分子、Affibody、ドメイン抗体、Nanobody、UniBody、DARPin、Anticalin、Avimer、Versabody、および Duocalin、前記分子を作製する方法、ならびに前記分子および薬学的担体を含む薬学的組成物を提供する。本発明は、前記抗体、免疫複合体、二重特異性分子、Affibody、ドメイン抗体、Nanobody、UniBody、DARPin、Anticalin、Avimer、Versabody、および Duocalin を用いて、異常な骨形成を伴う疾患および癌を治療するための方法にも関する。

【0057】

10

20

30

40

50

定義

本発明がより容易に理解されうるように、最初に特定の用語が定義される。さらなる定義が詳細な説明を通じて示される。

【0058】

本明細書で記載の「抗体」という用語は、全抗体 (whole antibody) および任意の抗原結合断片 (すなわち「抗原結合部分」) またはその一本鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重 (H) 鎖および2つの軽 (L) 鎖またはその抗原結合部分を含む糖タンパク質を示す。各重鎖は重鎖可変領域 (本明細書中で V_H と略記) および重鎖定常領域で構成されている。重鎖定常領域は C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} という3つのドメインで構成されている。各軽鎖は軽鎖可変領域 (本明細書中で V_L と略記) および軽鎖定常領域で構成されている。軽鎖定常領域は C_L という1つのドメインで構成されている。 V_H および V_L 領域は、相補性決定領域 (CDR) と称される超可変領域にさらに再分化され、フレームワーク領域 (FR) と称されるより保存される領域に散在しう。各 V_H および V_L は3つのCDRおよび4つのFRで構成され、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ配列される。重鎖および軽鎖の可変領域は抗原と相互作用する結合ドメインを有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織または免疫系の様々な細胞 (例えばエフェクター細胞) および古典的補体系の第1の成分 (C1q) を含む因子への結合を媒介しう。

10

【0059】

本明細書で用いられる抗体 (または「抗体部分」) の「抗原結合部分」という用語は、(本明細書中ではBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2で例示される) 抗原に対して特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を示す。抗体の抗原結合機能が完全長抗体の断片により果たされうることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例として、(i) V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる一価断片であるFab断片; (ii) ヒンジ領域でジスルフィド橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片である $F(ab')_2$ 断片; (iii) 本質的にヒンジ領域の一部を有するFabである Fab' 断片 (「基礎免疫学 (Fundamental Immunology)」(ポール (Paul) 編、第3版、1993年) を参照); (iv) V_H および C_{H1} ドメインからなるFd断片; (v) 抗体の単一の腕の V_L および V_H ドメインからなるFv断片; (vi) V_H ドメインからなるdAb断片 (ワード (Ward) ら、(1989年) Nature 341: 544-546頁); ならびに (vii) 単離された相補性決定領域 (CDR) が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインの V_L および V_H が別々の遺伝子でコードされるが、 V_L および V_H 領域が、それらの一価分子を形成するようになす単一のタンパク質鎖としての作製を可能にする合成リンカーによる組換え方法を用いて連結されう (一本鎖Fv (scFv) として知られる; 例えばバード (Bird) ら (1988年) Science 242: 423-426頁、およびハストン (Huston) ら (1988年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883頁を参照)。かかる一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含されるようにも意図されている。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を用いて得られ、断片における有用性が無傷抗体の場合と同様の方法でスクリーニングされる。

20

30

40

【0060】

本明細書で用いられる「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を示すように意図されている (例えば、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対して特異的に結合する単離された抗体は、これらの6種のタンパク質のうちのいずれか1つ以上以外の抗原に対して特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかし、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対して特異的に結合

50

する単離された抗体は、他の抗原、例えば他の種由来の B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 分子に対する交差反応性を有しうる。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および / または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【 0 0 6 1 】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を示す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【 0 0 6 2 】

本明細書で用いられる「ヒト抗体」または「ヒト配列抗体」という用語は、フレームワークおよび C D R 領域の双方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の可変領域を有する抗体を含むように意図されている。さらに、抗体が定常領域を有する場合、定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体は、天然または合成修飾を含む、後の修飾を含みうる。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によりコードされることのないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的な突然変異誘発またはインビボでの体細胞突然変異により導入される突然変異）を含みうる。しかし、本明細書で用いられる「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳類種、例えばマウスの生殖細胞系由来の C D R 配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている抗体を含むように意図されていない。

10

【 0 0 6 3 】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、「ヒト」の後に「配列」という用語を含む場合があり、フレームワークおよび C D R 領域の双方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の可変領域を有する単一の結合特異性を提示する抗体を示す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合されたヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られる B 細胞を含むハイブリドーマにより産生される。

20

【 0 0 6 4 】

本明細書で用いられる「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段により調製、発現、作製または単離されるすべてのヒト抗体、例えば (a) ヒト免疫グロブリン遺伝子におけるトランスジェニック動物またはトランスクロモゾーマル (t r a n s c h r o m o s o m a l) 動物 (例えばマウス) あるいはそれから調製されるハイブリドーマから単離される抗体 (さらに下記に記載)、(b) 形質転換されることでヒト抗体を発現する宿主細胞、例えばトランスフェクトーマ (t r a n s f e c t o m a) から単離される抗体、(c) 組換えられたコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離される抗体、および (d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他の D N A 配列へのスプライシングを含む任意の他の手段により調製、発現、作製または単離される抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワークおよび C D R 領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の可変領域を有する。しかし、特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体に対し、インビトロでの突然変異誘発 (または、ヒト I g 配列に対してトランスジェニックな動物が用いられる場合、インビボでの体細胞突然変異誘発) を実施可能であり、それ故、組換え抗体の V_H および V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系 V_H および V_L 配列に由来しかつそれらに関連する一方、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリーの範囲内に天然に存在することがない配列である。

30

40

【 0 0 6 5 】

本明細書で用いられる「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス (例えば I g M または I g G 1) を示す。

【 0 0 6 6 】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」という語句は、本明細書中で「抗原に対して特異的に結合する抗体」という用語と同義的に用いられる。

【 0 0 6 7 】

50

「ヒト抗体誘導体」という用語は、ヒト抗体の任意の修飾形態、例えば抗体と別の作用物質または抗体との複合体を示す。

【0068】

「ヒト化抗体」という用語は、別の哺乳類種、例えばマウスの生殖細胞系由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている抗体を示すように意図されている。さらなるフレームワーク領域の修飾がヒトフレームワーク配列内でなされうる。

【0069】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列がある種に由来しかつ定常領域配列が別種に由来する抗体、例えば可変領域配列がマウス抗体に由来しかつ定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を示すように意図されている。

10

【0070】

本明細書で用いられる「特異的に結合する」抗体は、 1×10^{-7} 以下、特に 5×10^{-8} M以下、より詳細には 1×10^{-8} M以下、さらにより詳細には 6×10^{-9} M以下、より詳細には 3×10^{-9} M以下、さらにより詳細には 2×10^{-9} M以下の K_D で同族抗原に結合する抗体を示すように意図されている。

【0071】

本明細書で用いられる、タンパク質または細胞に「実質的に結合することのない」という用語は、タンパク質または細胞に対して、結合しないかまたは高親和性で結合することのない、すなわちタンパク質または細胞に 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上の K_D で結合することを示す。

20

【0072】

本明細書で用いられる「 K_{assoc} 」または「 K_a 」という用語は特定の抗体-抗原相互作用の結合速度を示すように意図されている一方、本明細書で用いられる「 K_{dis} 」または「 K_d 」という用語は特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を示すように意図されている。本明細書で用いられる「 K_D 」という用語は解離定数を示すように意図されており、それは K_d 対 K_a の比(すなわち K_d/K_a)から得られ、かつモル濃度(M)として表現されるものである。抗体における K_D 値は、当該技術分野で十分に確立された方法を用いて決定可能である。抗体の K_D を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴、典型的にはBiacore(登録商標)システムなどのバイオセンサーシステムの利用によるものである。

30

【0073】

本明細書で用いられるIgG抗体における「高親和性」という用語は、標的抗原に対して 10^{-7} M以下、より典型的には 10^{-8} M以下、より典型的には 10^{-9} M以下、およびさらにより典型的には 10^{-10} M以下の K_D を有する抗体を示す。しかし、「高親和性」結合は他の抗体のアイソタイプに応じて変化しうる。例えば、IgMアイソタイプに対する「高親和性」結合は、 10^{-7} M以下、より典型的には 10^{-8} M以下、さらにより典型的には 10^{-9} M以下の K_D を有する抗体を示す。

【0074】

本明細書で用いられる「対象」という用語は任意のヒトまたは非ヒト動物を示す。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば哺乳類および非哺乳類、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、魚類、爬虫類などを含む。

40

【0075】

「免疫応答」という用語は、侵入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合での正常なヒト細胞もしくは組織に対する選択的損傷、それらの破壊または人体からの除去をもたらす、例えば、(抗体、サイトカイン、および補体を含む)上記の細胞または肝臓によって生成されるリンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および可溶性高分子の作用を示す。

【0076】

50

「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達を担う種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を示す。本明細書で用いられる「細胞表面受容体」という語句は、例えばシグナルの受信および細胞の原形質膜を通過するかかるシグナルの伝達が可能な分子および分子の複合体を含む。本発明の「細胞表面受容体」の例として、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、およびBMPR2受容体が挙げられる。

【0077】

本明細書で用いられる「BMP2」という用語は、ヒト骨形態形成タンパク質2を示すように用いられる。ヒトBMP2のヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NM__001200の参照によって公的に入手可能であり、配列番号1として本明細書中に開示される。BMP2の対応するアミノ酸配列は、配列番号2として本明細書中に示される。

10

【0078】

本明細書で用いられる「BMP4」という用語は、ヒト骨形態形成タンパク質4を示すように用いられる。ヒトBMP4のヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NM__130851の参照によって公的に入手可能であり、配列番号3として本明細書中に開示される。BMP4の対応するアミノ酸配列は、配列番号4として本明細書中に示される。

【0079】

本明細書で用いられる「BMPR1A」(aka Alk3)という用語は、ヒト骨形態形成タンパク質受容体1Aを示すように用いられる。ヒトBMPR1Aのヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NM__004329の参照によって公的に入手可能であり、配列番号5として本明細書中に開示される。BMPR1Aの対応するアミノ酸配列は、配列番号6として本明細書中に示される。

20

【0080】

本明細書で用いられる「BMPR1B」(aka Alk6)という用語は、ヒト骨形態形成タンパク質受容体1Bを示すように用いられる。ヒトBMPR1Bのヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NM__001203の参照によって公的に入手可能であり、配列番号7として本明細書中に開示される。BMPR1Bの対応するアミノ酸配列は、配列番号8として本明細書中に示される。

30

【0081】

本明細書で用いられる「ACTR1」という用語は、ヒトアクチビンA受容体1を示すように用いられる。ヒトACTR1のヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号BC033867の参照によって公的に入手可能であり、配列番号9として本明細書中に開示される。ACTR1の対応するアミノ酸配列は、配列番号10として本明細書中に示される。

【0082】

本明細書で用いられる「BMPR2」という用語は、ヒト骨形態形成タンパク質受容体2を示すように用いられる。ヒトBMPR2のヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号NM__001204の参照により公的に入手可能であり、本明細書中で配列番号11として開示される。BMPR2の対応するアミノ酸配列は、本明細書中で配列番号12として記載される。

40

【0083】

本発明の様々な態様は、以下のサブセクションでさらに詳述される。

【0084】

BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、およびBMPR2に特異的な抗体

本発明の抗体は、特定の機能的な特徴または特性により特徴づけられる。例えば特定の実施形態内では、抗体はヒトBMP2およびヒトBMP4から選択される1つ以上の骨形態形成タンパク質に対して特異的に結合する。他の実施形態内では、抗体はBMPR1A

50

、BMP R 1 B、およびBMP R 2 から選択される1つ以上の骨形態形成タンパク質受容体ならびに/またはACTR 1 から選択される1つ以上のアクチビンタイプ1受容体に対して特異的に結合する。典型的には、本発明の抗体は、高親和性、例えば 5×10^{-7} M以下、さらにより典型的には 5×10^{-9} M以下、さらにより典型的には 3×10^{-9} M以下、さらにより典型的には 2×10^{-9} M以下またはさらにより典型的には 1×10^{-9} M以下の K_D で結合する。

【0085】

一実施形態では、抗体は好ましくはBMP 2またはBMP 4内に存在する抗原エピトープに結合し、ここでエピトープは他のタンパク質内に存在することがない。抗体は、典型的にはBMP 2またはBMP 4に結合しても他のタンパク質に結合することがないか、あるいは低親和性、例えば 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上の K_D で他のタンパク質に結合する。好ましくは、抗体は関連タンパク質に実質的に結合することがなく、例えば抗体はBMP 3またはBMP 8 bに実質的に結合することがない。

【0086】

抗体の1つ以上の骨形態形成タンパク質またはその受容体に対する結合能を評価するための標準アッセイは当該技術分野で公知であり、例えばELISA、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーおよびRIAを含む。適切なアッセイが実施例において詳述される。抗体の結合動態(例えば結合親和性)は、当該技術分野で公知の標準アッセイ、例えばELISA、スキャッチャード(Scatchard)およびピアコア(Biacore)分析によっても評価可能である。別の例として、本発明の抗体は、前軟骨細胞(prechondrocyte)および/または軟骨細胞などの骨細胞に結合しうる。

【0087】

BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および/またはBMP R 2 に特異的なヒトモノクローナル抗体

BMP 2 に特異的な抗体が望ましくはBMP 4 と交差反応し、かつBMP 4 に特異的な抗体が望ましくはBMP 2 と交差反応しうることが理解されるであろう。同様に、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、およびBMP R 2 のいずれか1つに特異的な抗体は、望ましくは他のBMPおよび/またはACV受容体のいずれかと交差反応しうる。したがって、本発明では、有利にも、 V_H および V_L 配列が「混合されて一致する」ことで特許請求される本発明の範囲内で他の抗原特異的な結合分子の作製が可能であることが検討される。かかる「混合されて一致する」抗体の特異的結合については、上記や実施例における結合アッセイ(例えばFACSまたはELISA)を用いて試験可能である。典型的には、 V_H および V_L 鎖が混合されて一致する場合、特定の V_H/V_L 対からの V_H 配列が構造的に類似の V_H 配列と置換される。同様に、典型的には、特定の V_H/V_L 対からの V_L 配列は構造的に類似の V_L 配列と置換される。

【0088】

実施例1および2に記載のように単離し、構造的に特徴づけた本発明の好ましい抗体は、ヒトモノクローナル抗体6H4、11F2、および12E3を含む。6H4、11F2、および12E3の V_H アミノ酸配列の各々は、配列番号31、32、および33に示される。6H4、11F2、および12E3の V_L アミノ酸配列の各々は、配列番号34、35、および36に示される。

【0089】

一態様では、本発明は、

(a) 配列番号31、32、および33からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

(b) 配列番号34、35、および36からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体は

10

20

30

40

50

B M P 2 または B M P 4、好ましくはヒト B M P 2 または B M P 4 に対して特異的に結合する。

【 0 0 9 0 】

好ましい重鎖および軽鎖の組み合わせは、

(a) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と (b) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(b) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と (b) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

(b) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と (b) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【 0 0 9 1 】

別の態様では、本発明は、6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の重鎖および軽鎖の C D R 1、C D R 2 および C D R 3、またはそれらの組み合わせを含む抗体を提供する。6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の V_H C D R 1 のアミノ酸配列は、配列番号 1 3、1 4、および 1 5 において示される。6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の V_H C D R 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 6、1 7、および 1 8 において示される。6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の V_H C D R 3 のアミノ酸配列は、配列番号 1 9、2 0、および 2 1 において示される。6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の V_K C D R 1 のアミノ酸配列は、配列番号 2 2、2 3、および 2 4 において示される。6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の V_K C D R 2 のアミノ酸配列は、配列番号 2 5、2 6、および 2 7 において示される。6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の V_K C D R 3 のアミノ酸配列は、配列番号 2 8、2 9、および 3 0 において示される。C D R 領域は、カバト (K a b a t) システム (カバト E . A . (K a b a t E . A .) ら (1 9 9 1 年) 「免疫学的利益に関するタンパク質配列 (S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t) (第 5 版) 」、米国保健福祉省 (U . S . D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s)、N I H P u b l i c a t i o n N o . 9 1 - 3 2 4 2) を用いて図示される。

20

【 0 0 9 2 】

本明細書中に提供される各モノクローナル抗体が (1) B M P 2 および B M P 4 から選択される骨形態形成タンパク質または (2) B M P R 1 A、B M P R 1 B、B M P R 2 から選択される骨形態形成タンパク質受容体および / または A C T R 1 から選択されるアクチビンタイプ 1 受容体に結合する可能性があり、かつ抗原結合特異性が主に C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域により提供されると仮定すると、V_H C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列と V_K C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列が「混合されて一致する」(すなわち、各抗体が V_H C D R 1、C D R 2、および C D R 3 と V_K C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を有する必要があっても、異なる抗体由来の C D R が混合されて一致すること)で、本発明の他の抗原特異的な結合分子が作製されうる。かかる「混合されて一致した」抗体の結合については、上記と実施例における結合アッセイ (例えば、F A C S、E L I S A、ピアコア (B i a c o r e) 分析) を用いて試験してもよい。典型的には、V_H C D R 配列が混合されて一致する場合、特定の V_H 配列由来の C D R 1、C D R 2、および / または C D R 3 配列は構造的に類似の C D R 配列と置換される。同様に、V_K C D R 配列が混合されて一致する場合、特定の V_K 配列由来の C D R 1、C D R 2 および / または C D R 3 配列は典型的には構造的に類似の C D R 配列と置換される。新規の V_H および V_L 配列を、1 つ以上の V_H および / または V_L C D R 領域配列を本発明のモノクローナル抗体における本明細書中に開示の C D R 配列に由来する構造的に類似の配列と置換することにより作製可能であることが当業者に容易に理解されるであろう。

30

40

【 0 0 9 3 】

別の態様では、本発明は、

(a) 重鎖可変領域の C D R 1 ;

50

- (b) 重鎖可変領域のCDR2；
- (c) 重鎖可変領域のCDR3；
- (d) 軽鎖可変領域のCDR1；
- (e) 軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f) 軽鎖可変領域のCDR3；

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで各重鎖可変領域のCDR1、CDR2、および/またはCDR3ならびに各軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、および/またはCDR3は、1種、2種、3種、4種、5種、もしくは6種の骨形態形成タンパク質受容体に結合する抗体から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ抗体はBMP2および/またはBMP4（典型的にはヒトBMP2および/またはBMP4）に対して特異的に結合する。

10

【0094】

したがって、別の態様では、本発明は、

- (a) 配列番号13、14、および15からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b) 配列番号16、17、および18からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c) 配列番号19、20、および21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d) 配列番号22、23、および24からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e) 配列番号25、26、および27からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f) 配列番号28、29、および30からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3；

20

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4、好ましくはヒトBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。

【0095】

好ましい実施形態では、抗体は、

30

- (a) 配列番号13を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b) 配列番号16を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c) 配列番号19を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d) 配列番号22を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e) 配列番号25を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f) 配列番号28を含む軽鎖可変領域のCDR3

を含む。

【0096】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

- (a) 配列番号14を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b) 配列番号17を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c) 配列番号20を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d) 配列番号23を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e) 配列番号26を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f) 配列番号29を含む軽鎖可変領域のCDR3

40

を含む。

【0097】

別の好ましい実施形態では、抗体は、

- (a) 配列番号15を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b) 配列番号18を含む重鎖可変領域のCDR2；

50

- (c) 配列番号 21 を含む重鎖可変領域の CDR 3 ;
- (d) 配列番号 24 を含む軽鎖可変領域の CDR 1 ;
- (e) 配列番号 27 を含む軽鎖可変領域の CDR 2 ; および
- (f) 配列番号 30 を含む軽鎖可変領域の CDR 3

を含む。

【0098】

CDR 1 および / または CDR 2 ドメインから独立した CDR 3 ドメインが単独で抗体の同族抗原に対する結合特異性を決定しうることと、共通の CDR 3 配列に基づく同じ結合特異性を有する複数の抗体が予測どおりに産生されうることが、当該技術分野で周知である。例えば、[マウス抗 - CD 30 抗体 Ki - 4 の重鎖可変ドメイン CDR 3 のみを用いるヒト化抗 - CD 30 抗体の産生について記載する] クリムカ (Klimka) ら、British J. of Cancer 83 (2) : 252 - 260 頁 (2000 年) ; [親マウス MOC - 31 抗 - EGP - 2 抗体の重鎖 CDR 3 配列のみを用いる組換え上皮糖タンパク質 - 2 (EGP - 2) 抗体について記載する] ベイボアー (Beiboer) ら、J. Mol. Biol. 296 : 833 - 849 頁 (2000 年) ; [マウス抗 - インテグリン α_3 抗体 LM 609 の重鎖および軽鎖可変 CDR 3 ドメインを用いる一群のヒト化抗 - インテグリン α_3 抗体においては、各メンバ抗体は、CDR 3 ドメイン外部の異なる配列を含み、親マウス抗体と同じエピトープに親マウス抗体と同程度に高いまたはそれより高い親和性で結合可能である点について記載する] レイダー (Rader) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 : 8910 - 8915 頁 (1998 年) ; [CDR 3 ドメインが抗原結合に対して最も有意な寄与をもたらす点を開示する] バーバス (Barbas) ら、J. Am. Chem. Soc. 116 : 2161 - 2162 頁 (1994 年) ; [ヒト胎盤 DNA に対する 3 つの Fab (SI - 1、SI - 40、および SI - 32) の重鎖 CDR 3 配列の抗破傷風トキシイド Fab の重鎖上への移植により既存の重鎖 CD 3 が置換される点を記載し、CDR 3 ドメインが単独で結合特異性を与えた点について示している] バーバス (Barbas) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 : 2529 - 2533 頁 (1995 年) ; ならびに [単一特異性 Ig G 破傷風トキシイドに結合する Fab p 313 抗体の重鎖に対する親多重特異性 Fab LNA 3 の重鎖 CDR 3 のみの転移が親 Fab の結合特異性を保持するのに十分であったという移植試験について記載する] ディッツェル (Ditzzel) ら、J. Immunol. 157 : 739 - 749 頁 (1996 年) を参照のこと。これらの各参考文献はその全体が参照により本明細書中に援用される。

【0099】

したがって、特定の態様内では、本発明は、非ヒト抗体、例えばマウスまたはラット抗体に由来する 1 つ以上の重鎖および / または軽鎖 CDR 3 ドメインを含むモノクローナル抗体を提供し、ここでモノクローナル抗体は、BMP 2 および / または BMP 4 (典型的にはヒト BMP 2 および / または BMP 4) あるいは BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACT R 1 および / または BMP R 2 (典型的にはヒト BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACT R 1 および / または BMP R 2) に対して特異的に結合可能である。いくつかの実施形態内では、非ヒト抗体由来の 1 つ以上の重鎖および / または軽鎖 CDR 3 ドメインを含むかかる発明の抗体は、(a) 結合において競合可能であり、(b) 機能的特徴を保持し、(c) 同じエピトープに結合し、かつ / または (d) 対応する親の非ヒト抗体と類似した結合親和性を有する。

【0100】

他の態様内では、本発明は、例えば非ヒト動物から得られるヒト抗体などの第 1 のヒト抗体に由来する 1 つ以上の重鎖および / または軽鎖 CDR 3 ドメインを含むモノクローナル抗体を提供し、ここで第 1 のヒト抗体は、BMP 2 および / または BMP 4 (典型的にはヒト BMP 2 および / または BMP 4) あるいは BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACT R 1、および / または BMP R 2 (典型的にはヒト BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACT R 1、および / または BMP R 2) に対して特異的に結合可能であり、かつ、第 1 のヒト

抗体由来のCDR3ドメインはBMP2および/またはBMP4あるいはBMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対する結合特異性が欠如したヒト抗体内のCDR3ドメインを置換し、BMP2および/またはBMP4あるいはBMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2の各々に対して特異的に結合可能な第2のヒト抗体を産生する。いくつかの実施形態内では、第1のヒト抗体由来の1つ以上の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含むかかる発明の抗体は、(a)結合において競合可能であり、(b)機能的特徴を保持し、(c)同じエピトープに結合し、および/または(d)対応する親の第1のヒト抗体と類似した結合親和性を有する。

【0101】

特定の生殖細胞系配列を有する抗体

特定の実施形態では、本発明の抗体は、特定の生殖細胞系重鎖免疫グロブリン遺伝子由来の重鎖可変領域および/または特定の生殖細胞系軽鎖免疫グロブリン遺伝子由来の軽鎖可変領域を含む。

【0102】

本明細書で用いられるヒト抗体は、抗体の可変領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子を用いる系から得られる場合、特定の生殖細胞系配列「の産物」であるかまたはそれ「由来の」重鎖または軽鎖可変領域を含む。かかる系は、目的の抗原とともにヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫する工程または目的の抗原とともにファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリをスクリーニングする工程を含む。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列「の産物」であるかまたはそれ「に由来する」ヒト抗体が、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、配列においてヒト抗体の配列に対して最も近い(すなわち最大の%同一性がある)ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を選択することにより、かかるものとして同定されうる。

【0103】

例えば、好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_H4-59遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。別の好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_H4-34遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。別の好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_H3-33遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。別の好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_H1-69遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。

【0104】

別の例では、好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_KA27遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。さらに別の好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_KL15遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。さらに別の好ましい実施形態では、本発明は、ヒトV_KL6遺伝子の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで抗体はBMP2またはBMP4に対して特異的に結合する。

【0105】

別の好ましい実施形態では、本発明は、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原

10

20

30

40

50

結合部分を提供し、ここで抗体は、

(a) ヒト V_H 4 - 59、4 - 34、または 3 - 33 遺伝子 (遺伝子は各々、配列番号 43、51、および 44 に示されるアミノ酸配列をコードする) の産物であるかまたはそれ由来の重鎖可変領域を含み、

(b) ヒト V_K A27、L6、または L15 遺伝子 (遺伝子は各々、配列番号 48、54、および 49 に示されるアミノ酸配列をコードする) の産物であるかまたはそれ由来の軽鎖可変領域を含み、かつ

(c) BMP2 または BMP4、好ましくはヒト BMP2 または BMP4 に対して特異的に結合する。

【0106】

V_H および V_K の各々として V_H 4 - 34 および V_K L6 を有する抗体の例は 6H4 である。 V_H および V_K の各々として V_H 4 - 59 および V_K A27 を有する抗体の例は 11F2 である。 V_H および V_K の各々として V_H 3 - 33 および V_K L15 を有する抗体の例は 12E3 である。

【0107】

特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列「の産物」であるかまたはそれ「に由来する」ヒト抗体は、例えば自然発生的な細胞突然変異または部位特異的突然変異の意図的導入に起因し、生殖細胞系配列と比べてアミノ酸の差を有しうる。しかし、選択されたヒト抗体は、典型的にはアミノ酸配列においてヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% 同一であり、かつ、ヒト抗体が他種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列 (例えばマウス生殖細胞系配列) と比較される場合にヒトであるものと同定されるアミノ酸残基を有する。特定の場合、ヒト抗体は、アミノ酸配列において生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% またはさらに少なくとも 96%、97%、98% もしくは 99% 同一でありうる。典型的には、特定のヒト生殖細胞系配列由来のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列とは 10 個以下のアミノ酸の差を示すと考えられる。特定の場合、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列とは 5 個以下またはさらには 4、3、2 もしくは 1 個以下のアミノ酸の差を示しうる。

【0108】

相同抗体

さらに別の実施形態では、本発明の抗体は、本明細書中に記載の抗体のアミノ酸配列に相同なアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖可変領域を含み、ここで抗体は本発明の抗体の所望の機能特性を保持する。

【0109】

例えば、本発明は、

(a) 重鎖可変領域は配列番号 31、32、および 33 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80% 相同なアミノ酸配列を含み、

(b) 軽鎖可変領域は配列番号 34、35、および 36 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80% 相同なアミノ酸配列を含み、かつ

(c) 抗体は 1×10^{-7} M 以下の K_D でヒト BMP2 または BMP4 に結合する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0110】

抗体は、細胞表面結合性のヒト BMP2 または BMP4 を有する CHO 細胞にも結合しうる。BMP2 または BMP4 は、細胞表面上の受容体または二価のエンティティ (entity) に結合されうるかまたは膜貫通ドメインを有する融合タンパク質として発現されうる。

【0111】

様々な実施形態では、抗体は、例えばヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体でありう

10

20

30

40

50

る。

【0112】

他の実施形態では、 V_H および / または V_L アミノ酸配列は、上記で示される配列に 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 相同でありうる。上記で示される配列の V_H および V_L 領域に対して高い (すなわち 80 % 以上の) 相同性を有する V_H および V_L 領域を有する抗体を、配列番号 31、32、33、34、35、および 36 をコードする核酸分子の突然変異誘発 (例えば、部位特異的突然変異誘発または PCR による (PCR-mediated) 突然変異誘発) と、その後の本明細書中に記載のアッセイを用いてのコードされた改変抗体の保持された機能についての試験により得ることができる。

10

【0113】

本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分も提供し、ここで

(a) 重鎖可変領域は、本明細書中に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含み、ここで重鎖可変領域は BMPR1A、BMPR1B、および / もしくは BMPR2 から選択される骨形態形成タンパク質受容体に対し、および / または ACTR1 から選択されるアクチビンタイプ 1 受容体に対して特異的に結合する抗体に由来し、

(b) 軽鎖可変領域は、本明細書中に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 80 % 相同なアミノ酸配列を含み、ここで軽鎖可変領域は BMPR1A、BMPR1B、および / もしくは BMPR2 から選択される骨形態形成タンパク質受容体に対し、および / または ACTR1 から選択されるアクチビンタイプ 1 受容体に対して特異的に結合する抗体に由来し、かつ

20

(c) 抗体は、BMPR1A、BMPR1B、および / もしくは BMPR2 から選択される骨形態形成タンパク質受容体に対し、および / または ACTR1 から選択されるアクチビンタイプ 1 受容体に対して特異的に結合する。

【0114】

他の実施形態では、 V_H および / または V_L アミノ酸配列は、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、および / もしくは抗-BMPR2 抗体に対し、および / または本明細書中に示される抗-ACTR1 配列に対して 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % もしくは 99 % 同一でありうる。本明細書中に示される配列の V_H および V_L 領域に対して高い (すなわち 80 % 以上の) 同一性を有する V_H および V_L 領域を有する抗体を、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B および / または抗-BMPR2 抗体の、および / または抗-ACTR1 の V_H または V_L 領域をコードする核酸分子の突然変異誘発 (例えば、部位特異的または PCR による突然変異誘発) により得ることができる。

30

【0115】

本明細書で用いられる 2 つの配列間の同一性パーセントは、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列で共有される同一位置の数の関数 (すなわち 相同性 % = 同一位置の数 / 位置の全体数 \times 100) であり、2 つの配列の最適なアラインメントにおいて導入される必要がある。配列の比較および 2 つの配列間の同一性パーセントの決定は、下記の非限定例にて記載のように数学的アルゴリズムを用いて行われうる。

40

【0116】

2 つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、E. メイヤーズ (E. Meyers) および W. ミラー (W. Miller) のアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 頁 (1988 年)) を用いて決定可能であり、同アルゴリズムは PAM120 重み残基テーブル (weight residue table)、12 のギャップ長ペナルティ (Gap length penalty) および 4 のギャップペナルティを用いて ALIGN プログラム (バージョン 2.0) に導入されている。さらに、2 つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ニードルマン (Needleman) および ユンシュ (Wunsch) (J. Mol. Biol. 48: 444-453 頁 (1

50

970年)) アルゴリズムを用いて決定可能であり、同アルゴリズムはブロッサム (Blossum) 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかと、16、14、12、10、8、6もしくは4のギャップ重量および1、2、3、4、5もしくは6の長さ重量を用いてGCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>で入手可能) 内のGAPプログラム中に含まれている。

【0117】

さらにまたはその他として、本発明のタンパク質配列をさらに「クエリー配列」として用い、公的データベースで探索を行い、例えば関連配列を同定することが可能である。かかる探索は、アルツシュル (Altschul) ら、(1990年) J. Mol. Biol. 215: 403-10頁のXBLASTプログラム (バージョン2.0) を用いて実行可能である。BLASTタンパク質の探索をXBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を用いて行うことで、本発明の抗体分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップドアラインメント (gapped alignments) を得るため、アルツシュル (Altschul) ら、(1997年) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402頁に記載のようにギャップドBLAST (Gapped BLAST) を用いることができる。BLASTおよびギャップドBLAST (Gapped BLAST) プログラムを用いる場合、各プログラムのデフォルトパラメータ (例えばXBLASTおよびNBLAST) を用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照のこと。

10

【0118】

20

保存的修飾を有する抗体

特定の実施形態では、本発明の抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここでこれらのCDR配列のうちの1つ以上は本明細書中に記載の典型的な抗体に基づく特定のアミノ酸配列またはその保存的修飾を含み、かつ抗体は本発明のモノクローナル抗体の所望の機能特性を保持する。

【0119】

したがって、本発明は、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで

30

(a) 重鎖可変領域のCDR3配列は、配列番号19、20、および21のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、

(b) 軽鎖可変領域のCDR3配列は、配列番号28、29、および30のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ

(c) 抗体は 1×10^{-7} M以下の K_D でヒトBMP2またはBMP4に結合する。

【0120】

抗体は、細胞表面結合性のBMP2またはBMP4を有するCHO細胞にも結合しうる。

【0121】

好ましい実施形態では、重鎖可変領域のCDR2配列は、配列番号16、17、および18のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ軽鎖可変領域のCDR2配列は、配列番号25、26、および27からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含む。

40

【0122】

別の好ましい実施形態では、重鎖可変領域のCDR1配列は、配列番号13、14、および15のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ軽鎖可変領域のCDR1配列は、配列番号22、23、および24からなる群から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含む。

【0123】

様々な実施形態では、抗体は、例えばヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体でありう

50

る。

【0124】

本発明は、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分も提供し、ここで

(a) 重鎖可変領域のCDR3配列は、本明細書中に開示される抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および抗-BMPR2モノクローナル抗体から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、

(b) 軽鎖可変領域のCDR3配列は、本明細書中に開示される抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および抗-BMPR2モノクローナル抗体から選択されるアミノ酸配列とその保存的修飾を含み、かつ

(c) 抗体はBMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2に対して特異的に結合する。

【0125】

本明細書で用いられる「保存的配列修飾 (conservative sequence modifications)」という用語は、アミノ酸配列を有する抗体の結合特性に対して有意に作用または改変することのないアミノ酸修飾を示すように意図されている。かかる保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。修飾は、当該技術分野で公知の標準技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCRによる突然変異誘発により本発明の抗体に導入されうる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置換される置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分岐側鎖を有するアミノ酸 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族側鎖を有するアミノ酸 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を含む。したがって、本発明の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基は同じ側鎖ファミリー由来の他のアミノ酸残基で置換可能であり、改変抗体は保持された機能 (すなわち (c) に示される機能) について本明細書中に記載の機能アッセイを用いて試験可能である。

【0126】

本発明の抗体と同じエピトープに結合する抗体

別の実施形態では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体のいずれかと同じヒトBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2上のエピトープに結合する抗体 (すなわち、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2に結合するのに本発明のモノクローナル抗体のいずれかと交差競合する能力を有する抗体) を提供する。いくつかの実施形態では、交差競合試験のための参照抗体は本明細書中に開示されるモノクローナル抗体でありうる。かかる交差競合抗体は、標準のBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2結合アッセイにおいて、それが本明細書中に開示される抗体と交差競合する能力に基づいて同定されうる。

【0127】

好ましい実施形態では、交差競合試験における参照抗体は、モノクローナル抗体6H4 (配列番号31および34で示されるV_HおよびV_L配列を有する)、モノクローナル抗体11F2 (配列番号32および35で示されるV_HおよびV_L配列を有する)、モノクローナル抗体12E3 (配列番号33および36で示されるV_HおよびV_L配列を有する)、または実施例1および2で同定されるモノクローナル抗体のうちの任意の1つでありうる。かかる交差競合抗体は、標準のBMP2またはBMP4結合アッセイにおいてこれ

らの抗体と交差競合するその能力に基づいて同定されうる。例えば、ピアコア (B I A c o r e) 分析、E L I S A アッセイまたはフローサイトメトリーを用い、本発明の抗体との交差競合を実証することが可能である。試験抗体の例えば 6 H 4、1 1 F 2、または 1 2 E 3 のヒト B M P 2 または B M P 4 に対する結合を阻害する能力により、試験抗体がヒト B M P 2 または B M P 4 への結合において 6 H 4、1 1 F 2、または 1 2 E 3 と競合可能であり、それにより 6 H 4、1 1 F 2、または 1 2 E 3 と同じヒト B M P 2 または B M P 4 上のエピトープに結合することが示される。好ましい実施形態では、6 H 4、1 1 F 2、または 1 2 E 3 と同じヒト B M P 2 または B M P 4 上のエピトープに結合する抗体はヒトモノクローナル抗体である。かかるヒトモノクローナル抗体は、実施例に記載のように調製され、単離されうる。

10

【0128】

改変され修飾された抗体

さらに、本発明の抗体を出発原料として本明細書中に開示される V_H および / または V_L 配列のうちの 1 つ以上を有する抗体を用いて調製し、修飾抗体を改変することが可能であり、ここで修飾抗体は最初の抗体からの改変された特性を有しうる。抗体は、一方もしくはは両方の可変領域 (すなわち V_H および / または V_L) 内、例えば 1 つ以上の C D R 領域内および / または 1 つ以上のフレームワーク領域内での 1 つ以上の残基の修飾によって改変可能である。さらにまたはその他として、抗体は、例えば定常領域内で残基を修飾し、抗体のエフェクター機能を改変することによって改変可能である。

20

【0129】

実施可能な可変領域の改変の 1 つのタイプは C D R 移植である。抗体は、6 つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域 (C D R) 内に位置するアミノ酸残基全体に支配的な標的抗原と相互作用する。この理由のため、C D R 内のアミノ酸配列は、各抗体間で C D R 外部の配列よりも多様である。C D R 配列が大部分の抗体 - 抗原相互作用に関与することから、特定の天然の抗体の特性を模倣する組換え抗体を、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列上に移植された特定の天然抗体由来の C D R 配列を含む発現ベクターの作成により発現させることは可能である (例えば、リーヒマン L. (R i e c h m a n n L.) ら (1998 年) N a t u r e 332:323-327 頁; ジョーンズ P. (J o n e s P.) ら (1986 年) N a t u r e 321:522-525 頁; クイーン C. (Q u e e n C.) ら (1989 年) P r o c . N a t l . A c a d . S e e . U . S . A . 86:10029-10033 頁; ウインター (W i n t e r) に交付された米国特許第 5,225,539 号明細書ならびにクイーン (Q u e e n) らに交付された米国特許第 5,530,101 号明細書; 米国特許第 5,585,089 号明細書; 米国特許第 5,693,762 号明細書および米国特許第 6,180,370 号明細書を参照)。

30

【0130】

したがって、本発明の別の実施形態は、本明細書中に示される第 1 の抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 抗体に由来するアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む重鎖可変領域と、第 2 の抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 に由来するアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域とを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。好ましい実施形態では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分は、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列 (各々、配列番号 13、14、および 15、配列番号 16、17、および 18、ならびに配列番号 19、20、および 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む) を含む重鎖可変領域と、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列 (各々、配列番号 22、23、および 24、配列番号 25、26、および 27、ならびに配列番号 28、29、および 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む) を含む軽鎖可変領域とを含む。したがって、かかる抗体は、モノクローナル抗体 6 H 4、1 1 F 2、および 1 2 E 3 の

40

50

V_H および V_L CDR 配列を有し、これらはさらにこれらの抗体由来の異なるフレームワーク配列を有しうる。

【0131】

かかるフレームワーク配列は、例えば生殖細胞系の抗体遺伝子配列を含む公的な DNA データベースまたは出版された参考文献から得ることが可能である。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子における生殖細胞系 DNA 配列は、(インターネット上の www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase で入手可能な)「V ベース (V Base)」ヒト生殖細胞系配列データベースや、カバト E. A. (Kabato E. A.) ら (1991 年)「免疫学的利益に関するタンパク質配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest) (第 5 版)」、米国保健福祉省 (U. S. Department of Health and Human Services)、NIH Publication No. 91-3242; トムリンソン I. M. (Tomlinson I. M.) ら (1992 年)「The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops」J. Mol. Biol. 227: 776-798; ならびにコックス J. P. L. (Cox J. P. L.) ら (1994 年)「A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage」Eur. J. Immunol. 24: 827-836 頁 (これら各々の内容全体は参照により本明細書中に明示的に援用される) において見出されうる。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子における生殖細胞系 DNA 配列は、Genbank データベース内に見出されうる。例えば、HCo7 HuMAb マウス内で見出される以下の重鎖生殖細胞系配列は、付属の Genbank アクセッション番号: 1-69 (NG_0010109、NT_024637 および BC070333)、3-33 (NG_0010109 および NT_024637) ならびに 3-7 (NG_0010109 および NT_024637) にて入手可能である。別の例として、HCo12 HuMAb マウス内で見出される以下の重鎖生殖細胞系配列は、付属の Genbank アクセッション番号: 1-69 (NG_0010109、NT_024637 および BC070333)、5-51 (NG_0010109 および NT_024637)、4-34 (NG_0010109 および NT_024637)、3-30.3 (CAJ556644) ならびに 3-23 (AJ406678) にて入手可能である。

【0132】

抗体タンパク質配列は、当業者に周知のギャップド BLAST (Gapped BLAST) と称される配列類似性を探索する方法 (アルツシュル (Altschul) ら (1997 年) Nucleic Acids Research 25: 3389-3402 頁) の 1 つを用いて集められたタンパク質配列データベースに対して比較される。BLAST は、抗体配列とデータベース配列の間での統計的に有意なアラインメントが整列されたワードの高スコアリングセグメント対 (HSP) を有する傾向が高いという点でヒューリスティックアルゴリズムである。スコアが延長またはトリミングにより改善されえないセグメント対はヒットと称される。つまり、V ベース (VBASE) 由来のヌクレオチド配列 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) が翻訳され、かつ FR1 ~ FR3 フレームワーク領域の間の領域および同領域を含む領域が保持される。データベース配列は平均 98 残基長を有する。タンパク質の全長にわたり正確に一致する二重配列が除去される。オフの低複雑性フィルタを除くデフォルトの標準パラメータおよび BLOSUM62 の置換マトリックスを備えた blastp プログラムを用いるタンパク質についての BLAST 探索では、配列一致をもたらす上位 5 つのヒットがフィルタにかけられる。ヌクレオチド配列は全部で 6 つのフレームで翻訳され、データベース配列の一致するセグメント内に停止コドンを含み有しないフレームはヒットの可能性があると考えられる。次いで、これは BLAST プログラム

t b l a s t x を用いて確認される。これにより全部で6つのフレーム内で抗体配列が翻訳され、全部で6つのフレーム内で動的に翻訳されたVベース（V B A S E）ヌクレオチド配列に対する翻訳が比較される。

【0133】

同一性は、抗体配列と配列の全長にわたるタンパク質データベースの間の正確なアミノ酸の一致である。正（同一性＋置換の一致）は同一ではなく、B L O S U M 6 2 置換マトリックスによって導かれるアミノ酸置換である。抗体配列が同じ同一性を有するデータベース配列のうちの2つに一致する場合、大部分の正を伴うヒットであれば一致する配列ヒットであることが決定されることになる。

【0134】

10

本発明の抗体において用いられる好ましいフレームワーク配列は、本発明の選択された抗体によって用いられるフレームワーク配列に構造的に類似する、例えば本発明の好ましいモノクローナル抗体によって用いられるV_H 4 - 59フレームワーク配列（配列番号43）、および/またはV_H 3 - 33フレームワーク配列（配列番号44）、および/またはV_H 4 - 34フレームワーク配列（配列番号51）、および/またはV_H 1 - 69フレームワーク配列、および/またはV_K A 27フレームワーク配列（配列番号48）、および/またはV_K L 15フレームワーク配列（配列番号49）、および/またはL 6 V_Kフレームワーク配列（配列番号54）に類似する配列である。V_H C D R 1、C D R 2、およびC D R 3配列、ならびにV_K C D R 1、C D R 2、およびC D R 3配列は、フレームワーク配列の元となる生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子内に見出される配列と同一の配列を有するフレームワーク領域上に移植されうるか、またはC D R配列は、生殖細胞系配列と比べて1つ以上の突然変異を有するフレームワーク領域上に移植されうる。例えば、特定の例ではフレームワーク領域内で残基を変異させ、抗体の抗原結合能を維持または促進することが有効であることが見出されている（例えば、クイーン（Queen）らに交付された米国特許第5,530,101号明細書；米国特許第5,585,089号明細書；米国特許第5,693,762号明細書および米国特許第6,180,370号明細書を参照）。

20

【0135】

可変領域修飾の別のタイプは、アミノ酸残基をV_H および/またはV_K のC D R 1、C D R 2 および/またはC D R 3領域内で変異させ、それにより目的の抗体の1つ以上の結合特性（例えば親和性）を改善するものである。部位特異的突然変異誘発またはP C Rによる突然変異誘発を行い突然変異を導入可能であり、かつ、目的の抗体の結合または他の機能特性に対する効果が、本明細書中に記載されかつ実施例に提供されるインビトロまたはインビボアッセイにおいて評価されうる。典型的には、（上記で考察の）保存的修飾が導入される。突然変異は、アミノ酸の置換、付加または欠失でありうるが、典型的には置換である。さらに典型的には、C D R領域内の1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つ以下の残基が改変される。

30

【0136】

したがって、別の実施形態では、本開示は、（a）配列番号13、14、および15からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号13、14、および15に対して1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_H C D R 1領域；（b）配列番号16、17、および18からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号16、17、および18に対して1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_H C D R 2領域；（c）配列番号19、20、および21からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号19、20、および21に対して1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_H C D R 3領域；（d）配列番号22、23、および24からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号22、23、および24に対して1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_K C D R 1領域；（e）配列番号

40

50

25、26、および27からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号25、26、および27に対して1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_KCDR2領域；ならびに(f)配列番号28、29、および30からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号28、29、および30に対して1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を含むV_KCDR3領域を含む重鎖可変領域を含む、単離された抗-BMP2/BMP4モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0137】

さらに別の実施形態では、本発明は、(a)V_HCDR1領域；(b)V_HCDR2領域；(c)V_HCDR3領域；(d)V_KCDR1領域；(e)V_KCDR2領域；および(f)V_KCDR3領域を含む重鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで各V_HのCDR1、CDR2、および/またはCDR3領域ならびに各V_KのCDR1、CDR2、および/またはCDR3領域は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-BMPR1A抗体；1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-BMPR1B抗体；1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-ACR1抗体、および/または1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-BMPR2抗体；または1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-BMPR1A抗体に対して1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸の置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列；1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-BMPR1B抗体；1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-ACR1抗体；および/または1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの異なる抗-BMPR2抗体に由来する。

【0138】

本発明の改変抗体は、例えば抗体の特性を改善するためにV_Hおよび/またはV_K内のフレームワーク残基に修飾が施されている場合の抗体を含む。典型的には、かかるフレームワーク修飾を施すことで抗体の免疫原性が低下する。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基に対応する生殖細胞系配列に「復帰突然変異する(backmutate)」ことである。より詳細には、体細胞突然変異を経ている抗体は、その抗体が由来する生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を有しうる。かかる残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖細胞系配列と比較することにより同定されうる。かかる「復帰突然変異された(backmutated)」抗体はまた、本発明に包含されるように意図されている。

【0139】

例えば、6H4においては、カバト(Kabat)番号付与系を用いると、V_Hのアミノ酸残基#3(FR1内)がヒスチジン(配列番号31)である一方、対応するV_H4-34生殖細胞系配列内のこの残基はグルタミン(配列番号51)である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である(例えば、6H4のV_Hの残基#3(FR1の残基#3)はヒスチジンからグルタミンに「復帰突然変異」可能である)。

【0140】

別の例として、11F2においては、V_Hのアミノ酸残基#27(FR1内)がアスパルテート(配列番号32)である一方、対応するV_H4-59生殖細胞系配列内のこの残基はグリシン(配列番号43)である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である(例えば、11F2のV_Hの残基#27(FR1の残基#27)はアスパルテートからグリシンに「復帰突然変異」可能である)。

【0141】

別の例として、11F2においては、V_Hのアミノ酸残基#30(FR1内)がアルギ

ニン（配列番号 32）である一方、対応する V_H 4 - 59 生殖細胞系配列内のこの残基はセリン（配列番号 43）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発または PCR による突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、11F2 の V_H の残基 # 30（FR1 の残基 # 30）はアルギニンからセリンに「復帰突然変異」可能である）。

【0142】

別の例として、11F2 においては、V_H のアミノ酸残基 # 54（CDR2 内）がアルギニン（配列番号 32）である一方、対応する V_H 4 - 59 生殖細胞系配列内のこの残基はセリン（配列番号 43）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発または PCR による突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、11F2 の V_H の残基 # 54（CDR2 の残基 # 5）はアルギニンからセリンに「復帰突然変異」可能である）。

10

【0143】

別の例として、11F2 においては、V_H のアミノ酸残基 # 58（CDR2 内）がヒスチジン（配列番号 32）である一方、対応する V_H 4 - 59 生殖細胞系配列内のこの残基はアスパラギン（配列番号 43）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発または PCR による突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、11F2 の V_H の残基 # 58（CDR2 の残基 # 9）はヒスチジンからアスパラギンに「復帰突然変異」可能である）。

20

【0144】

別の例として、12E3 においては、V_H のアミノ酸残基 # 52A（CDR2 内）がアスパルテート（配列番号 33）である一方、対応する V_H 3 - 33 生殖細胞系配列内のこの残基はチロシン（配列番号 44）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発または PCR による突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、12E3 の V_H の残基 # 52A（CDR2 の残基 # 4）はアスパルテートからチロシンに「復帰突然変異」可能である）。

30

【0145】

別の例として、12E3 においては、V_H のアミノ酸残基 # 55（CDR2 内）がアルギニン（配列番号 33）である一方、対応する V_H 3 - 33 生殖細胞系配列内のこの残基はセリン（配列番号 44）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発または PCR による突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、12E3 の V_H の残基 # 55（CDR2 の残基 # 7）はアルギニンからセリンに「復帰突然変異」可能である）。

【0146】

別の例として、12E3 においては、V_H のアミノ酸残基 # 56（CDR2 内）がリジン（配列番号 33）である一方、対応する V_H 3 - 33 生殖細胞系配列内のこの残基はアスパラギン（配列番号 44）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発または PCR による突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、12E3 の V_H の残基 # 56（CDR2 の残基 # 8）はリジンからアスパラギンに「復帰突然変異」可能である）。

40

【0147】

別の例として、11F2 においては、V_H のアミノ酸残基 # 82（FR3 内）がメチオニン（配列番号 32）である一方、対応する V_H 4 - 59 生殖細胞系配列内のこの残基はロイシン（配列番号 43）である。フレームワーク領域配列をその生殖細胞系の配置に戻

50

すため、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発により生殖細胞系配列に「復帰突然変異」可能である（例えば、11F2のV_Hの残基#82（FR3の残基#17）はメチオニンからロイシンに「復帰突然変異」可能である）。

【0148】

フレームワーク修飾の別のタイプは、フレームワーク領域内またはさらに1つ以上のCDR領域内で1つ以上の残基を変異させ、T細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的な免疫原性を低下させることを含む。このアプローチは、「脱免疫（deimmunization）」とも称され、Carrrらによる米国特許公開第20030153043号明細書にさらに詳述されている。

10

【0149】

本発明の改変抗体は、修飾をアミノ酸残基に施し、抗体上でのT細胞エピトープの相互作用を改変するアミノ酸修飾を通じて免疫原性応答を増大または低下させる場合の抗体も含む（例えば、米国特許第6,835,550号明細書；米国特許第6,897,049号明細書および米国特許第6,936,249号明細書を参照）。

【0150】

フレームワークまたはCDR領域内でなされる修飾に加えまたはその他として、本発明の抗体は、Fc領域内で修飾を含み、典型的には抗体の1つ以上の機能特性、例えば血清半減期、補体固定、Fc受容体結合性および/または抗原依存性の細胞毒性を変化させるように改変されうる。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾されうる（例えば1つ以上の化学的部分が抗体に付着されうる）か、または修飾によりそのグリコシル化が改変されさらに抗体の1つ以上の機能特性が改変されうる。これらの各実施形態は下記にさらに詳述されている。Fc領域内の残基の番号付与はKabattのEU指数のものである。

20

【0151】

一実施形態では、CH1のヒンジ領域が、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化する、例えば増加または減少するように修飾される。このアプローチは、ボドマー（Bodmer）らによる米国特許第5,677,425号明細書にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化することで、例えば軽鎖および重鎖の構築が促進されるかあるいは抗体の安定性が増大または低下する。

【0152】

別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域の突然変異により抗体の生物学的半減期が減少する。より詳細には、天然Fc-ヒンジドメインSpA結合と比較して、抗体のブドウ球菌（Staphylococcus）プロテインA（SpA）への結合が低下しているように、1つ以上のアミノ酸変異がFc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、ワード（Ward）らによる米国特許第6,165,745号明細書にさらに詳述されている。

30

【0153】

別の実施形態では、抗体の修飾によりその生物学的半減期が増加する。様々なアプローチが可能である。例えば、ワード（Ward）に交付された米国特許第6,277,375号明細書に記載のように、1つ以上の下記の変異、すなわちT252L、T254S、T256Fが導入可能である。あるいは、プレスタ（Presta）らによる米国特許第5,869,046号明細書および米国特許第6,121,022号明細書に記載のように、生物学的半減期を増加させるため、抗体は、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得られるサルベージ（salvage）受容体結合エピトープを有するようにCH1またはCL領域内で改変されうる。

40

【0154】

別の実施形態では、抗体は国際公開第2007/059782号パンフレット（その全体が参照により本明細書中に援用される）に記載のUniBodyとして産生される。

【0155】

さらに他の実施形態では、Fc領域は、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ

50

酸残基と置換して抗体のエフェクター機能を改変することにより改変される。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対して改変された親和性を有するが親抗体の抗原への結合能は保持するように、アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 および 322 から選択される 1 つ以上のアミノ酸が、異なるアミノ酸残基と置換されうる。親和性が改変される対象のエフェクターリガンドは、例えば Fc 受容体または補体の C1 成分でありうる。このアプローチは、米国特許第 5,624,821 号明細書および米国特許第 5,648,260 号明細書（いずれもウインター（Winter）らによる）にさらに詳述されている。

【0156】

別の例では、抗体の、C1q 結合が改変されかつ/または補体依存性の細胞毒性（CDC）が低減または消失しているように、アミノ酸残基 329、331 および 322 から選択される 1 つ以上のアミノ酸が、異なるアミノ酸残基と置換されうる。このアプローチは、米国特許第 6,194,551 号明細書（イドゥソギー（Idusogie）らによる）にさらに詳述されている。

【0157】

別の例では、アミノ酸位置 231 および 239 内の 1 つ以上のアミノ酸残基が改変されることにより、抗体の補体を固定する能力が改変される。このアプローチは、ボドマー（Bodmer）らによる PCT 国際公開公報第 94/29351 号パンフレットにさらに記載されている。

【0158】

さらに別の例では、以下の位置、すなわち 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 もしくは 439 での 1 つ以上のアミノ酸の修飾による Fc 領域の修飾により、抗体の、抗体依存性細胞毒性（ADCC）を媒介する能力が増大しおよび/または抗体の Fc 受容体に対する親和性が増大する。このアプローチは、PCT 国際公開公報第 00/42072 号パンフレット（プレスタ（Presta）による）にさらに記載されている。さらに、ヒト IgG1 上の Fc R1、Fc RI I、Fc RI I I および Fc Rn に対する結合部位がマッピングされており、かつ結合が改善された変異体についての記載がなされている（シールドズ R.L.（Shields R.L.）ら（2001 年）J. Biol. Chem. 276:6591-6604 頁を参照）。位置 256、290、298、333、334 および 339 での特異的変異が Fc RI I I に対する結合を改善することが示された。さらに、以下の変異体の組み合わせ、すなわち T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A および S298A/E333A/K334A が Fc RI I I に対する結合を改善することが示された。

【0159】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化が修飾される。例えば、アグリコシル化（aglycosylated）抗体が作製されうる（すなわち抗体におけるグリコシル化が失われる）。グリコシル化の改変により、例えば抗体の抗原に対する親和性が増大しうる。かかる糖質修飾は、例えば抗体配列内の 1 つ以上のグリコシル化部位を改変することによりなされうる。例えば、1 つ以上のアミノ酸置換がなされうる結果、1 つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去によりその部位でのグリコシル化が失われる。かかるアグリコシル化により、抗原に対する抗体の親和性が増大しうる。かかるアプローチは、米国特許第 5,714,350 号明細書および米国特許第 6,350,861 号明細書（コ（Co）らによる）にさらに詳述されている。

【0160】

さらにまたはその他として、グリコシル化の改変タイプを有する抗体、例えば減量されたフコシル残基を有する低フコシル化(hypofucosylated)抗体または増強されたGlcNac二分構造を有する抗体が作製されうる。かかる改変されたグリコシル化パターンにより、抗体のADCC能力が増大することが示されている。かかる糖質修飾は、例えばグリコシル化機構が改変された宿主細胞内で抗体を発現させることにより行われうる。グリコシル化機構が改変された細胞は、当該技術分野で記載がなされており、本発明の組換え抗体を発現し、それによりグリコシル化が改変された抗体を産生する宿主細胞として用いられうる。例えば、細胞系Ms704、Ms705およびMs709は、Ms704、Ms705およびMs709細胞系内で発現される抗体がその糖質上にフコースを含まないように、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8((1,6)フコシルトランスフェラーゼ)を含まない。Ms704、Ms705およびMs709細胞系は、2つの置換ベクターを用いたCHO/DG44細胞内での標的化されたFUT8遺伝子の破壊により作製された(ヤマネ(Yamane)らによる米国特許公開第20040110704号明細書およびヤマネ-オオヌキ(Yamane-Ohnuki)ら(2004年)Biotechnol Bioeng 87:614-22頁を参照)。別の例として、ハナイ(Hanai)らによる欧州特許第1,176,195号明細書は、機能的に破壊されたフコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を有する細胞系について記載している。かかる細胞系内で発現される抗体は、1,6結合に関連した酵素の低減または除去により低フコシル化(hypofucosylation)を示す。ハナイ(Hanai)らは、フコースを抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンに添加するのに低い酵素活性を有するかまたは酵素活性を有することのない細胞系、例えばラット骨髄腫細胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)についても記載している。プレスタ(Presta)によるPCT国際公開公報第03/035835号パンフレットには、フコースをAsn(297)に連結された糖質に付着させる能力が低下した(その宿主細胞内で発現される抗体の低フコシル化ももたらす)変異CHO細胞系、Lec13細胞について記載されている(シールズR.L.(Shields R.L.)ら(2002年)J. Biol. Chem. 277:26733-26740頁も参照)。ウマナ(Umana)らによるPCT国際公開公報第99/54342号パンフレットには、糖タンパク質を修飾するグリコシルトランスフェラーゼ(例えば(1,4)-N-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を、改変された細胞系内で発現される抗体が抗体のADCC活性の増大をもたらすGlcNac二分構造の増大を示すように発現するように改変された細胞系について記載されている(ウマナ(Umana)ら(1999年)Nat. Biotech. 17:176-180頁も参照)。あるいは、抗体のフコース残基はフコシダーゼ酵素を用いて切断されうる。例えば、フコシダーゼの-L-フコシダーゼはフコシル残基を抗体から除去する(タランティーノA.L.(Tarentino A.L.)ら(1975年)Biochem. 14:5516-23頁)。

【0161】

脱フコシル化(Defucosylation)は、「Cells Producing Antibody Compositions with Increased Antibody Dependent Cytotoxic Activity」という表題の米国特許第6,946,292号明細書(日本、東京(Tokyo)の協和発酵工業(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))に記載のポテリジェント(Potelligent)(商標)の方法によっても成し遂げられてもよい。この方法により、フコシルトランスフェラーゼを欠損した宿主細胞が、抗体依存性細胞毒性(ADCC)活性のレベルが上昇した抗体を産生するために用いられる。

【0162】

本発明に記載の脱フコシル化(defucosylated)抗体を産生するための他のアプローチでは、チュー(Zhu)ら、「Production of Human Monoclonal Antibody in Eggs of Chimeric

Chickens」Nature Biotech. 23: 1159 - 1169 頁 (2005 年) に記載の方法が用いられる。この方法により、完全に機能的なモノクローナル抗体がキメラニワトリの卵の卵白内に卵 1 個当たり約 3 ミリグラムの収量で発現される [カリフォルニア州バーリングアム (Burlingame) のオリゲン・セラピューティクス (Origon Therapeutics)]。このようにして産生される抗体には末端シアル酸およびフコース残基が欠如し、それは結果的に従来の哺乳類細胞培養物 (例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞) 内で産生される抗体よりも最大で 100 倍大きい抗体依存性細胞毒性を有する。典型的には、本発明の抗体の可変ドメインはベクター系にクローン化され (チュー (Zhu) らに記載)、ニワトリの ES 細胞に形質移入され、ニワトリ胚に導入され、それによりキメラニワトリのバイオリアクターが生成される。

10

【0163】

本発明で検討される本明細書中の抗体の別の修飾がペグ化 (pegylation) である。抗体をペグ化することで、例えば抗体の生物学的 (例えば血清) 半減期が増加される。抗体をペグ化するため、抗体またはその断片を典型的にはポリエチレングリコール (PEG)、例えば PEG の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体と、1 つ以上の PEG 基が抗体または抗体断片に付着した状態になるという条件下で反応させる。典型的には、ペグ化は、反応性 PEG 分子 (または類似反応性の水 - 可溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われる。本明細書で用いられる「ポリエチレングリコール」という用語は、他のタンパク質、例えばモノ (C1 - C10) アルコキシ - もしくはアリールオキシ - ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール - マレイミドを誘導体化するのに用いられている PEG の形態のいずれかを包含するように意図されている。特定の実施形態では、ペグ化されるべき抗体はアグリコシル化 (aglycosylated) 抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当該技術分野で公知であり、本発明の抗体に適用可能である。例えば、ニシムラ (Nishimura) らによる欧州特許第 0154316 号明細書およびイシカワ (Ishikawa) らによる欧州特許第 0401384 号明細書を参照のこと。

20

【0164】

抗体の物理的特性

本発明の抗体は、BMP2 / BMP4 抗体の様々な物理的特性によりさらに特徴づけられる。様々なアッセイを用い、これらの物理的特性に基づいて抗体の異なるクラスの検出および / または識別が可能である。

30

【0165】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、軽鎖または重鎖可変領域のいずれかにおいて 1 つ以上のグリコシル化部位を有しうる。可変領域内に 1 つ以上のグリコシル化部位が存在する結果、抗原結合の改変により抗体の免疫原性または抗体の pK の変化が増大する (マーシャル (Marshall) ら (1972 年) Annu Rev Biochem 41: 673 - 702 頁; ガラ F. A. (Gala F. A.) およびモリソン S. L. (Morrison S. L.) (2004 年) J Immunol 172: 5489 - 94 頁; ワリック (Wallick) ら (1988 年) J Exp Med 168: 1099 - 109 頁; スピロ R. G. (Spiro R. G.) (2002 年) Glycobiology 12: 43R - 56R; パレク (Parekh) ら (1985 年) Nature 316: 452 - 7 頁; ミムラ (Mimura) ら (2000 年) Mol Immunol 37: 697 - 706 頁)。グリコシル化は N - X - S / T 配列を有するモチーフで生じることが知られている。可変領域のグリコシル化はグライコプロット (Glycoblot) アッセイを用いて試験可能であり、同アッセイでは、抗体の切断により Fab が産生され、次いで過ヨウ素酸酸化およびシッフ塩基形成を測定するアッセイを用いてグリコシル化が試験される。あるいは、可変領域のグリコシル化はディオネックス (Dionex) 光クロマトグラフィー (ディオネックス - LC (Dionex - LC)) を用いて試験可能であり、そこでは糖類が Fab から切断されて単糖類にされ、各糖類の含量が分析される。いくつかの例では、可変領域グリコシル化を含有し

40

50

ない抗 - C D 1 9 抗体を有することが好ましい。これは、可変領域内にグリコシル化モチーフを有することのない抗体を選択するかまたはグリコシル化モチーフ内の残基を当該技術分野で周知の標準技術を用いて突然変異させることにより実現されうる。

【 0 1 6 6 】

好ましい実施形態では、本発明の抗体はアスパラギン異性部位を有することがない。脱アミドまたはイソアスパラギン酸効果が各々、N - GまたはD - G配列上で生じうる。脱アミドまたはイソアスパラギン酸効果の結果、主鎖ではなく側鎖のカルボキシ末端から離れてキंक構造 (k i n k e d s t r u c t u r e) を生成することにより抗体の安定性を低下させるイソアスパラギン酸が生成される。イソアスパラギン酸の生成は異性体定量分析 (i s o - q u a n t a s s a y) を用いて測定可能であり、ここでは逆相 H P L C を用いてイソアスパラギン酸についての試験が行われる。

10

【 0 1 6 7 】

各抗体は特有の等電点 (p I) を有することになるが、一般に抗体は 6 ~ 9 . 5 の p H 範囲に収まることになる。I g G 1 抗体における p I は典型的には 7 ~ 9 . 5 の p H 範囲内に収まり、かつ I g G 4 抗体における p I は典型的には 6 ~ 8 の p H 範囲内に収まる。抗体はこの範囲外の p I を有する場合がある。効果は一般に未知であるが、正常な範囲外の p I を有する抗体がインビボ条件下である程度のアンフォールディングおよび不安定性を有しうるということが推定される。等電点はキャピラリー等電点電気泳動アッセイを用いて試験可能であり、それは p H 勾配を生成し、ここでは精度向上のためにレーザー集光が用いられうる (ジャニニ (J a n i n i) ら (2 0 0 2 年) E l e c t r o p h o r e s i s 2 3 : 1 6 0 5 - 1 1 頁 ; マ (M a) ら (2 0 0 1 年) C h r o m a t o g r a p h i a 5 3 : 5 7 5 - 8 9 頁 ; ハント (H u n t) ら (1 9 9 8 年) J C h r o m a t o g r A 8 0 0 : 3 5 5 - 6 7 頁) 。いくつかの例では、正常な範囲内に収まる p I 値を有する抗 - C D 1 9 抗体を有することが好ましい。これは、正常な範囲内の p I を有する抗体を選択するかまたは帯電した表面残基を当該技術分野で周知の標準の技術を用いて突然変異することにより成し遂げることが可能である。

20

【 0 1 6 8 】

各抗体は、熱安定性を示す融解温度を有すると考えられる (クリシュナムルティ R . (K r i s h n a m u r t h y R .) およびマニング M . C . (M a n n i n g M . C .) (2 0 0 2 年) C u r r P h a r m B i o t e c h n o l 3 : 3 6 1 - 7 1 頁) 。より高い熱安定性は、インビボで全体的により高い抗体安定性を示す。抗体の融解点は、示差走査熱量測定などの技術を用いて測定されうる (チェン (C h e n) ら (2 0 0 3 年) P h a r m R e s 2 0 : 1 9 5 2 - 6 0 頁 ; ガーランド (G h i r l a n d o) ら (1 9 9 9 年) I m m u n o l L e t t 6 8 : 4 7 - 5 2 頁) 。 T_{M1} は抗体の初期のアンフォールディングの温度を示す。 T_{M2} は抗体の完全なアンフォールディングの温度を示す。一般に、本発明の抗体の T_{M1} が 6 0 より高く、好ましくは 6 5 より高く、さらにより好ましくは 7 0 より高いことが好ましい。あるいは、抗体の熱安定性は円二色性を用いて測定されうる。 (マレイ (M u r r a y) ら (2 0 0 2 年) J C h r o m a t o g r S c i 4 0 : 3 4 3 - 9 頁) 。

30

【 0 1 6 9 】

好ましい実施形態では、急速に分解することのない抗体が選択される。抗 - C D 1 9 抗体の断片化は、当該技術分野で十分に理解されているようにキャピラリー電気泳動 (C E) および M A L D I - M S を用いて測定されうる (アレキサンダー A . J . (A l e x a n d e r A . J .) およびヒュー D . E . (H u g h e s D . E .) (1 9 9 5 年) A n a l C h e m 6 7 : 3 6 2 6 - 3 2 頁) 。

40

【 0 1 7 0 】

別の好ましい実施形態では、最小の凝集効果を有する抗体が選択される。凝集が、望ましくない免疫応答および / または改変されるかもしくは好ましくない薬物動態学的特性の誘因となりうる。一般に、抗体では、2 5 % 以下、好ましくは 2 0 % 以下、さらにより好ましくは 1 5 % 以下、さらにより好ましくは 1 0 % 以下およびさらにより好ましくは 5 %

50

以下の凝集が許容される。凝集は、単量体、二量体、三量体または多量体を同定するためのサイズ排除カラム (SEC) 高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) および光散乱を含む、当該技術分野で周知のいくつかの技術により測定されうる。

【0171】

抗体を改変する方法

上記で考察したように、本明細書中に開示される V_H および V_K 配列を有する抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体を用い、 V_H および / または V_K 配列またはそれらに付着された定常領域の修飾により、新しい抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体を作製可能である。したがって、本発明の別の態様では、本発明の抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体の構造的特徴を用い、本発明の抗体の少なくとも 1 つの機能特性、例えばヒト BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 に対する特異的結合性を保持する構造的に関連した抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体が作製される。例えば、上記で考察したように、本発明の抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / もしくは抗 - BMP R 2 抗体またはそれらの変異体の 1 つ以上の CDR 領域を、公知のフレームワーク領域および / または他の CDR と組換え結合させ、さらなる組換え操作された本発明の抗体が作製可能である。

10

20

【0172】

修飾の他のタイプとして、前セクションに記載のタイプが挙げられる。改変方法における出発原料は、本明細書中に提供される 1 つ以上の V_H および / もしくは V_K 配列またはそれらの 1 つ以上の CDR 領域である。改変抗体を作製するのに、本明細書中に提供される 1 つ以上の V_H および / もしくは V_K 配列またはそれらの 1 つ以上の CDR 領域を有する抗体を実際に調製する (すなわちタンパク質として発現させる) 必要はない。それに対し、配列内に含まれる情報を出発原料として用い、元の配列由来の「第二世代」配列が作製され、次いで「第二世代」配列が調製され、タンパク質として発現される。

【0173】

したがって、別の実施形態では、本発明は、抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体を調製するための方法を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、抗 - BMP 2 / BMP 4 抗体を調製するための方法であって、

30

(a) (i) 配列番号 13、14、および 15 からなる群から選択される CDR 1 配列、配列番号 16、17、および 18 からなる群から選択される CDR 2 配列、および / または配列番号 19、20、および 21 からなる群から選択される CDR 3 配列を含む重鎖可変領域抗体配列; ならびに / あるいは (ii) 配列番号 22、23、および 24 からなる群から選択される CDR 1 配列、配列番号 25、26、および 27 からなる群から選択される CDR 2 配列、および / または配列番号 28、29、および 30 からなる群から選択される CDR 3 配列を含む軽鎖可変領域抗体配列を提供する工程と、

40

(b) 重鎖可変領域抗体配列および / または軽鎖可変領域抗体配列の内部の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を改変し、少なくとも 1 つの改変抗体配列を作製する工程と、

(c) 改変抗体配列をタンパク質として発現させる工程と

を含む方法を提供する。

【0174】

標準の分子生物学技術を用い、改変抗体配列の調製および発現が可能である。

【0175】

典型的には、改変抗体配列によりコードされる抗体は本明細書中に記載の 1 つ以上の抗体の機能特性のうちの 1 つ、一部もしくは全部を保持する抗体であり、ここで機能特性は BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP

50

R 2 に対する特異的結合を含むがそれに限定されない。

【0176】

改変抗体の機能特性は、当該技術分野で使用可能であり、かつ／または本明細書中に記載の標準アッセイ、例えば実施例で示されるアッセイ（例えば、フローサイトメトリー、結合アッセイ）を用いて評価可能である。

【0177】

本発明の抗体を改変する方法の特定の実施形態では、変異が、抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACT R 1、および／または抗 - BMP R 2 抗体のコード配列の全部もしくは一部に沿ってランダムまたは選択的に導入可能であり、かつ、得られる修飾された抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACT R 1、および／または抗 - BMP R 2 抗体は、本明細書中に記載の、結合活性および／または他の機能特性についてスクリーニング可能である。突然変異方法については当該技術分野で記載がなされている。例えば、ショート (Short) による PCT 国際公開公報第 02 / 092780 号パンフレットでは、抗体変異を飽和突然変異誘発、合成的ライゲーションアセンブリー (synthetic ligation assembly) またはそれらの組み合わせを用いて作製しスクリーニングするための方法が記載されている。あるいは、レーザー (Lazar) らによる PCT 国際公開公報第 03 / 074679 号パンフレットでは、コンピュータによるスクリーニング方法を用いて抗体の生理化学的特性を最適化する方法が記載されている。

【0178】

本発明の抗体をコードする核酸分子

本発明の別の態様は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞内に、細胞溶解液中にまたは部分精製形態もしくは実質的に純粋な形態で存在しうる。核酸は、当該技術分野で周知のアルカリ / SDS 処理、CsCl バンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動およびその他を含む標準技術により、他の細胞成分または他の汚染物質、例えば他の細胞核酸もしくはタンパク質から除去精製される場合、「単離される」かまたは「実質的に純粋な状態にされる」。F. アウスベル (F. Ausubel) ら編 (1987 年) 「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、ニューヨーク (New York) のグリーン・パブリッシング・アンド・ワイリー・インターサイエンス (Greene Publishing and Wiley Interscience) を参照のこと。本発明の核酸が例えば DNA または RNA でありうるとともに、イントロン配列を有するかまたは有しない場合がある。好ましい実施形態では核酸は cDNA 分子である。

【0179】

本発明の核酸を、標準の分子生物学技術を用いて得ることができる。ハイブリドーマ (例えば、下記にさらに記載のヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスから調製されるハイブリドーマ) によって発現される抗体においては、ハイブリドーマによって作製される抗体の軽鎖および重鎖をコードする cDNA は、標準の PCR 増幅または cDNA クローニング技術によって得られうる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリから得られる (例えばファージディスプレイ技術を用いて) 抗体をコードする核酸が回収されうる。本発明の典型的な核酸分子は、本明細書中に示される抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACT R 1、および／または抗 - BMP R 2 モノクローナル抗体の V_H および V_L 配列をコードするものである。

【0180】

本発明の好ましい核酸分子は、6H4、11F2、および 12E3 モノクローナル抗体の V_H および V_L 配列をコードするものである。6H4、11F2、および 12E3 の V_H 配列をコードする DNA 配列は各々、配列番号 37、38、および 39 で示される。6H4、11F2、および 12E3 の V_L 配列をコードする DNA 配列は各々、配列番号 40、41、および 42 で示される。

【0181】

本発明の他の好ましい核酸は、配列番号37、38、39、40、41、もしくは42に示される配列のうちの1つと、少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸である。

【0182】

2つの核酸配列間の同一性パーセントは、配列内でヌクレオチドが同一である位置の数であり、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮しており、このことは2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要がある。2つの配列間での配列の比較および同一性パーセントの判定は、数学的アルゴリズム、例えばメイヤーズ (Meyers) およびミラー (Miller) のアルゴリズムまたは上記のアルツシュル (Altschul) のXBLASTプログラムを用いて行われうる。

10

【0183】

本発明のさらに好ましい核酸は、配列番号37、38、39、40、41、および42に示される核酸配列の1つ以上のCDRコード部分を含む。この実施形態では、核酸は、6H4、11F2、および12E3の重鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3配列、あるいは6H4、11F2、および12E3の軽鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3配列をコードしうる。

【0184】

配列番号37、38、39、40、41、もしくは42のかかるCDRコード部分と、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する核酸は、本発明の好ましい核酸でもある。かかる核酸は、非CDRコード領域内および/またはCDRコード領域内の配列番号37、38、39、40、41、もしくは42の対応する部分とは異なる場合がある。差がCDRコード領域内に存在する場合、核酸によりコードされる核酸CDR領域は、典型的には、6H4、11F2、および12E3の対応するCDR配列に対する本明細書中に定義される1つ以上の保存的配列修飾を含む。

20

【0185】

一旦V_HおよびV_LセグメントをコードするDNA断片が得られると、これらのDNA断片を標準の組換えDNA技術によりさらに操作することで、例えば可変領域遺伝子が完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子またはscFv遺伝子に変換されうる。これらの操作では、V_LもしくはV_HをコードするDNA断片が、別のタンパク質、例えば抗体の定常領域またはフレキシブルリンカー (flexible linker) をコードする別のDNA断片に作動可能に連結される。これに関連して用いられる「作動可能に連結される」という用語は、2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように、2つのDNA断片が連結されることを意味するように意図されている。

30

【0186】

V_H領域をコードする単離されたDNAは、V_HをコードするDNAを重鎖定常領域 (CH1、CH2、およびCH3) をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより完全長重鎖遺伝子に変換されうる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で公知であり (例えばカバト E. A. (Kabat E. A.) 「免疫学的利益に関するタンパク質配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest) (第5版)」、米国保健福祉省 (U. S. Department of Health and Human Services)、NIH Publication No. 91-3242、1991年を参照)、これらの領域を包含するDNA断片は標準のPCR増幅により得ることが可能である。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域でありうるが、最も典型的にはIgG1またはIgG4定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子については、V_HをコードするDNAが、重鎖CH1定常領域のみをコー

40

50

ドする別のDNA分子に作動可能に連結されうる。

【0187】

V_L領域をコードする単離されたDNAは、V_LをコードするDNAを、軽鎖定常領域C_Lをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより完全長軽鎖遺伝子（およびFab軽鎖遺伝子）に変換されうる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で公知であり（例えばカバト E. A. (Kabat E. A.) ら「免疫学的利益に関するタンパク質配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest) (第5版)」、米国保健福祉省 (U. S. Department of Health and Human Services)、NIH Publication No. 91-3242、1991年を参照）、これらの領域を包含するDNA断片は標準のPCR増幅により得ることが可能である。軽鎖定常領域はカップまたはラムダ定常領域でありうるが、最も典型的にはカップ定常領域である。

10

【0188】

scFv遺伝子を作製するために、V_HおよびV_LをコードするDNA断片がフレキシブルリンカー、例えばアミノ酸配列 (Gly₄-Ser)₃ をコードする別の断片に作動可能に連結されることで、V_HおよびV_L配列はフレキシブルリンカーで連結されたV_LおよびV_H領域を有する隣接した一本鎖タンパク質として発現されうる（例えば、バード (Bird) ら Science 242: 423-426 頁 (1988年)；ハストン (Huston) ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 頁 (1988年)；およびマッカファーティ (McCafferty) ら、Nature 348: 552-554 頁 (1990年) を参照）。

20

【0189】

本発明のモノクローナル抗体の産生

本発明のモノクローナル抗体 (mAb) は、従来のモノクローナル抗体の方法、例えばコーラー (Kohler) およびミルスタイン (Milstein) Nature 256: 495 頁 (1975年) の標準の体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む種々の技術により産生可能である。原理上、体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいが、モノクローナル抗体を産生するための他の技術、例えばBリンパ球のウイルス性または発癌性の形質転換が用いられうる。

【0190】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ生成は極めて十分に確立された方法である。融合のために免疫された脾細胞を単離するための免疫プロトコルおよび技術は当該技術分野で公知である。融合相手（例えばマウス骨髄腫細胞）および融合方法についても公知である。

30

【0191】

本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製されるマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製されうる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的のマウスハイブリドーマから得られ、標準の分子生物学技術を用いて非マウス（例えばヒト）免疫グロブリン配列を有するように改変されうる。例えば、キメラ抗体を作製するため、マウス可変領域は当該技術分野で公知の方法を用いてヒト定常領域に連結されうる（例えばキャビリー (Cabilly) らに交付された米国特許第4, 816, 567号明細書）。ヒト化抗体を作製するため、マウスCDR領域は当該技術分野で公知の方法を用いてヒトフレームワークに挿入されうる（例えば、ウィンター (Winter) に交付された米国特許第5, 225, 539号明細書ならびにクイーン (Queen) らに交付された米国特許第5, 530, 101号明細書；米国特許第5, 585, 089号明細書；米国特許第5, 693, 762号明細書および米国特許第6, 180, 370号明細書を参照）。

40

【0192】

好ましい実施形態では、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に特異的

50

なかかるヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックまたはトランスクロモゾームマウスを用いて産生されうる。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモゾームマウスは、本明細書中で各々HuMAbマウス（登録商標）およびKMマウス（登録商標）と称されるマウスを含み、本明細書中で総称して「ヒトIgマウス」と称される。

【0193】

HuMAbマウス（登録商標）（メダレックス社（Medarex, Inc.））は、内因性 μ および鎖遺伝子座を不活性化する標的化された変異とともに未転位のヒト重鎖（ μ および）ならびに軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座（mini loci）を有する（例えば、ロンバーグ（Lonberg）ら Nature 368（6474）：856 - 859頁（1994年）を参照）。したがって、マウスは、マウスIgMまたはの発現の低下を示し、免疫に応答し、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランス遺伝子がクラススイッチおよび体細胞突然変異を受け、高親和性のヒトIgGモノクローナルが産生される（ロンバーグ（Lonberg）ら、上記；ロンバーグ（Lonberg）の「Handbook of Experimental Pharmacology」113：49 - 101頁（1994年）にレビュー；ロンバーグ（Lonberg）およびハスザー（Huszar）Intern. Rev. Immunol. 13：65 - 93頁（1995年）ならびにハーディング（Harding）およびロンバーグ（Lonberg）Ann. N. Y. Acad. Sci. 764：536 - 546頁（1995年））。HuMAbマウスの調製および使用ならびにかかるマウスにより保有されるゲノム修飾は、テイラー（Taylor）ら Nucleic Acids Research 20：6287 - 6295頁（1992年）；チェン（Chen）ら「International Immunology」5：647 - 656頁（1993年）；テュアイヨン（Tuail lon）ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：3720 - 3724頁（1995年）；チョイ（Choi）ら Nature Genetics 4：117 - 123頁（1993年）；チェン（Chen）ら EMBO J. 12：821 - 830頁（1993年）；テュアイヨン（Tuail lon）ら J. Immunol. 152：2912 - 2920頁（1994年）；テイラー（Taylor）ら「International Immunology」6：579 - 591頁（1994年）；ならびにフィッシュワイルド（Fishwild）ら Nature Biotechnology 14：845 - 851頁（1996年）においてさらに記載されている（これらすべての内容はその全体が参照により本明細書中に具体的に援用される）。さらに、米国特許第5,545,806号明細書；米国特許第5,569,825号明細書；米国特許第5,625,126号明細書；米国特許第5,633,425号明細書；米国特許第5,789,650号明細書；米国特許第5,877,397号明細書；米国特許第5,661,016号明細書；米国特許第5,814,318号明細書；米国特許第5,874,299号明細書；および米国特許第5,770,429号明細書（すべてはロンバーグ（Lonberg）およびケイ（Kay）に交付）、スラニ（Surani）らに交付された米国特許第5,545,807号明細書；PCT国際公開公報第92/03918号パンフレット、国際公開第93/12227号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第97/13852号パンフレット、国際公開第98/24884号パンフレットおよび国際公開第99/45962号パンフレット（すべてはロンバーグ（Lonberg）およびケイ（Kay）に交付）、ならびにコーマン（Korman）らに交付されたPCT国際公開公報第01/14424号パンフレットを参照のこと。

【0194】

関連の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子の一部を保有するマウスが免疫されうる。例えば、マウスはヒト免疫グロブリン遺伝子のV領域のみを保有しうる。これら動物への免疫の結果、キメラ抗体が産生されることになる。

【0195】

915号明細書および米国特許第6,593,081号明細書を参照のこと。

【0200】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト抗体反応が免疫時に生成されうるようにヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを用いて調製されう。かかるマウスは、例えばウィルソン(Wilson)らに交付された米国特許第5,476,996号明細書および米国特許第5,698,767号明細書に記載されている。

【0201】

本発明に記載の抗体は、レックス・システム(LEX System)(商標)およびプランティボディーズ(Plantibodies)(商標)[ノースカロライナ州ピッツボロ(Pittsboro)のバイオレックス社(Biolex, Inc.)]の方法によっても産生可能であり、ここで本発明の抗体はトランスジェニック植物内で産生される。最近交付された「Method of Use of Transgenic Plant Expressed Antibodies」という表題の米国特許第6,852,319号明細書を参照のこと。レックス・システム(LEX System)(商標)は、小さい緑色の水生植物のウキクサ科(Lemnaceae)の自然の特性と、遺伝子工学およびタンパク質回収方法とを合わせることで発生および産生技術を創出し、それらにより、考えられる明確な用途に応じ、既存の細胞培養系およびトランスジェニック発現系全般に特定の利点をもたらしう。(形質転換および選択の方法、トランスジェニック植物再生の方法、成長および回収の方法、複数の遺伝子およびベクターの使用、ならびに形質転換された組織および植物について開示する)「Genetically Engineered Duckweed」という表題の米国特許第6,040,498号明細書およびPCT特許出願公開、国際公開第99/07210号パンフレット;(発現のための方法および組成物、回収のための方法および組成物、発現レベルを高めるための方法、ならびに特異的分泌のための方法を開示する)「Expression of Biologically Active Polypeptides in Duckweed」という表題のPCT特許出願公開、国際公開第02/10414号パンフレット;「Plate and Method for High Throughput Screening」という表題のPCT特許出願公開、国際公開第02/097029号パンフレット;「Use of Duckweed in High Throughput Screening」という表題のPCT特許出願公開、国際公開第02/097433号パンフレット;ならびに「LED Array for Illuminating Cell Well Plates and Automated Rack System for Handling the Same」という表題の米国特許第6,680,200号明細書を参照のこと。植物内でヒトおよび他の抗体を発現させるためのプランティボディーズ(Plantibodies)(商標)の方法が、米国特許第6,417,429号明細書;米国特許第5,202,422号明細書;米国特許第5,639,947号明細書;米国特許第5,959,177号明細書;および米国特許第6,417,429号明細書に開示されている。これらの特許および特許出願の各々は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【0202】

ヒトIgマウスの免疫

ロンバーグ(Lonberg)ら Nature 368(6474):856-859頁(1994年);フィッシュワイルド(Fishwild)ら Nature Biotechnology 14:845-851頁(1996年);ならびにPCT国際公開公報第98/24884号パンフレットおよび国際公開第01/14424号パンフレットに記載によると、ヒトIgマウスを用いて本発明のヒト抗体が産生される場合、かかるマウスは、本発明のBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2抗体、本発明のBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2抗体、本発明のBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2抗体を発現する細胞

系、BMP 2、BMP 4、BM P R 1 A、BM P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 抗原の精製または濃縮された調製物、ならびに / あるいは組換え BMP 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2、あるいは B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 融合タンパク質で免疫されうる。典型的には、マウスは 1 回目の免疫時に 6 ~ 16 週齢となる。例えば、ヒト Ig マウスの腹腔内に免疫するために、抗原の、精製または組換え調製物 (5 ~ 50 μ g) を用いることができる。

【 0 2 0 3 】

BMP 2、BMP 4、BM P R 1 A、BM P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 に対する完全ヒトモノクローナル抗体を産生するための詳細な方法が、下記の実施例 1 に記載されている。様々な抗原を用いる試験を重ねることで、トランスジェニックマウスが、最初に完全フロイントアジュバント中の抗原で腹腔内 (I P) に免疫され、それに続き、不完全フロイントアジュバント中の抗原で隔週、最大で全 6 回 I P 免疫された場合、応答することが示されている。しかし、フロイント以外のアジュバントについても有効であることが見出されている。さらに、アジュバントの非存在下では全細胞における免疫原性が高いことが見出されている。免疫応答は、例えば後眼窩 (r e t r o o r b i t a l) の出血により得られる血漿試料を用いる免疫プロトコルを通して監視可能である。血漿は E L I S A でスクリーニング可能であり、十分な力価のヒト免疫グロブリンを有するマウスが融合に用いられうる (実施例 1 に記載のように)。マウスを、屠殺および脾臓摘出の 3 日前、抗原で静脈内に追加免疫することができる。免疫ごとに 2 ~ 3 の融合がなされる必要がありうることが想定される。典型的にはマウス 6 ~ 24 匹が各抗原について免疫される。通常、H C o 7 および H C o 1 2 株の双方が用いられる。H C o 7 および H C o 1 2 マウス株の生成については、各々、米国特許第 5 , 7 7 0 , 4 2 9 号明細書および P C T 国際公開公報第 0 1 / 0 9 1 8 7 号パンフレットの実施例 2 に記載されている。さらに、H C o 7 および H C o 1 2 トランス遺伝子は共に、2 つの異なるヒト重鎖トランス遺伝子 (H C o 7 / H C o 1 2) を有する単一のマウスに育種されうる。その他としてまたはさらに、K M マウス (登録商標) 株が P C T 国際公開公報第 0 2 / 4 3 4 7 8 号パンフレットに記載のように用いられうる。

【 0 2 0 4 】

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するため、免疫されたマウス由来の脾細胞および / またはリンパ節細胞が単離され、適切な不死化細胞系、例えばマウス骨髄腫細胞系に融合されうる。生成されたハイブリドーマでは、抗原特異的な抗体の産生についてスクリーニング可能である。例えば、免疫されたマウス由来の脾臓リンパ球の単一の細胞懸濁液が、50 % P E G とともに P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 非分泌マウス骨髄腫細胞 (A T C C、C R L 1 5 8 0) の数の 1 / 6 に融合されうる。あるいは、免疫されたマウス由来の脾臓リンパ球の単一の細胞懸濁液は、サイト・パルス (C y t o P u l s e) 大型チャンバ細胞融合エレクトロポレーター (メリーランド州グレンバーニー (G l e n B u r n i e) のサイト・パルス・サイエンス社 (C y t o P u l s e S c i e n c e s , I n c .)) を用いる、電場に基づく電気融合法を用いて融合されうる。細胞を平底マイクロタイタープレート内に約 2×10^5 でプレーティング後、L - グルタミンおよびピルビン酸ナトリウム (バージニア州ハーンドン (H e r n d o n) のメディアテック社 (M e d i a t e c h , I n c .)) と、さらに 20 % ウシ胎仔血清 (ユタ州ローガン (L o g a n) のハイクローン (H y c l o n e))、18 % P 3 8 8 D I 条件培地、5 % オリゲンハイブリドーマクローニングファクター (O r i g e n H y b r i d o m a c l o n i n g f a c t o r) (バージニア州ゲチスバーグ (G a i t h e r s b u r g) のバイオペリス (B i o V e r i s))、4 mM L - グルタミン、5 mM ヘペス、0 . 0 5 5 mM - メルカプトエタノール、50 単位 / ml のペニシリン、50 mg / ml のストレプトマイシンおよび 1 x ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン (H A T) 培地 (シグマ (S i g m a) ; H A T は融合の 24 時間後

10

20

30

40

50

に添加される)を含有するDME M高グルコース培地内で1週間インキュベートした。1週間後、HATが用いられた培地内で培養された細胞がHTと交換された。次いで、各ウェルでは、ヒトモノクローナルIgMおよびIgG抗体についてのスクリーニングをELISAにより行うことができる。通常で10~14日後、ハイブリドーマの成長が観察されうる。抗体を分泌するハイブリドーマは、再プレーティングされ、再びスクリーニングされ、依然としてヒトIgG陽性である場合、モノクローナル抗体は限界希釈により少なくとも2回サブクロニングされうる。次いで、特徴づけのため、安定なサブクローンをインピットロで培養することで、組織培地内に少量の抗体が産生されうる。

【0205】

ヒトモノクローナル抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマをモノクローナル抗体の精製用の2リットルのスピナーフラスコ内で成長させることができる。親和性クロマトグラフィー前に、上清をプロテインA-セファロース(ニュージャージー州ピスカタウェイ(Piscataway)のファルマシア(Pharmacia))を用いて濾過し、濃縮する。溶出されたIgGをゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーで検査することで、純度を保証することができる。緩衝溶液はPBSに交換可能であり、濃度は1.43の減衰係数を用い、OD280により判定可能である。モノクローナル抗体は、一定量に分割され、-80℃で保存されうる。

【0206】

本発明のモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの生成

本発明の抗体は、例えば当該技術分野で周知のように組換えDNA技術と遺伝子形質移入方法を併用し、宿主細胞のトランスフェクトーマ内でも産生されうる(例えば、Morrison Science 229:1202頁(1985年))。

【0207】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現させるため、部分長または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAが標準の分子生物学技術(例えば目的の抗体を発現するハイブリドーマを用いるPCR増幅またはcDNAクローニング)により得られ、DNAは、遺伝子が転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように発現ベクターに挿入されうる。これに関連し、「作動可能に連結される」という用語は、抗体遺伝子が、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというその意図された機能を果たすようにベクターにライゲートされることを意味するように意図されている。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞と適合可能であるように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入されうるかまたは、より典型的には両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準の方法(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上での相補的制限部位のライゲーションまたは制限部位が全く存在しない場合での平滑末端ライゲーション)により、発現ベクターに挿入される。

【0208】

本明細書中に記載の抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用い、それらを、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターに、 V_H セグメントがベクター内の C_H セグメントに作動可能に連結されかつ V_K セグメントがベクター内の C_L セグメントに作動可能に連結されるように挿入することにより、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製可能である。さらにまたはその他として、組換え発現ベクターは、抗体鎖の宿主細胞からの分泌を促進するシグナルペプチドをコードしうる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームに連結されるようにベクターにクローン化されうる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種のシグナルペプチド(すなわち非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)でありうる。

【0209】

抗体鎖遺伝子に加え、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞内で抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保有する。「調節配列」という用語は、抗体鎖遺伝子の転写また

は翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御因子（例えばポリアデニル化シグナル）を含むように意図されている。かかる調節配列は、例えばゲッデル（Goeddel）（「遺伝子発現技術（Gene Expression Technology）」Methods in Enzymology 185、アカデミック・プレス（Academic Press）、カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）（1990年））に記載されている。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計が形質転換対象の宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの要素に依存することが当業者により理解されるであろう。哺乳類宿主細胞の発現における好ましい調節配列は、哺乳類細胞内で高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルス因子、例えばサイトメガロウイルス（CMV）、サルウイルス40（SV40）、アデノウイルス（例えばアデノウイルスメジャー後期プロモーター（AdMLP））およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーを含む。あるいは、非ウイルス調節配列、例えばユビキチンプロモーターまたは - グロビンプロモーターが用いられうる。さらに、異なる供給源由来の配列からなる調節因子、例えばSRプロモーター系は、ヒトT細胞白血病ウイルスタイプ1のSV40初期プロモーターおよび長い末端リピートに由来する配列を含有するものである（タケベ（Takebe）ら、Mol. Cell. Biol. 8 : 466 - 472 頁（1988年））。

10

【0210】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加え、本発明の組換え発現ベクターは、追加配列、例えば宿主細胞内でのベクターの複製（例えば複製の起点）を調節する配列および選択可能マーカー遺伝子を保有しうる。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する（例えば、米国特許第4,399,216号明細書、米国特許第4,634,665号明細書および米国特許第5,179,017号明細書（いずれもアクセル（Axel）らによる）を参照）。例えば典型的には、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に対して薬物、例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートへの耐性を与える。好ましい選択可能マーカー遺伝子は、（メトトレキセートの選択/増幅の場合にdhfr - 宿主細胞内で用いられる）ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子および（G418の選択用の）neo遺伝子を含む。

20

【0211】

軽鎖および重鎖の発現においては、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターは、標準技術により宿主細胞に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は、外因性DNAの原核または真核宿主細胞への導入のために一般に用いられる多種多様な技術、例えば、エレクトロポレーション、カルシウム - リン酸塩の沈降、DEAE - デキストランによる形質移入などを包含するように意図されている。原核または真核宿主細胞のいずれかにおいて本発明の抗体を発現させることは理論的に可能であるが、原核細胞よりもかかる真核細胞および特に哺乳類細胞の方が、適切に折り畳まれ免疫学的に活性な抗体を構築し分泌する可能性が高いことから、真核細胞内および最も典型的には哺乳類宿主細胞内での抗体の発現が最も好ましい。原核生物での抗体遺伝子の発現は、高収量の活性抗体の産生にとって無効であることが報告されている（ボス（Boss）およびウッド（Wood）、Immunology Today 6 : 12 - 13 頁（1985年））。

30

40

【0212】

本発明の組換え抗体を発現させるための好ましい哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（例えばカウフマン（Kaufman）およびシャープ（Sharp）Mol. Biol. 159 : 601 - 621 頁（1982年）に記載のように、DHFR選択可能マーカーとともに用いられる、ウアラウブ（Urlaub）およびチェイシン（Chasin）、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77 : 4216 - 4220 頁（1980年）に記載のdhfr - CHO細胞を含む）、NSO骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む。特に、NSO骨髓腫細胞の場合の使用においては、別の好ましい発現系は、国際公開第87/04462号パンフレット、国際公開第89/01036号パンフレットおよび欧州特許第338,841号明細書に開示さ

50

れるGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳類宿主細胞に導入される場合、抗体は、宿主細胞内での抗体の発現、またはより典型的には抗体の宿主細胞を成長させる培地への分泌を実現するのに十分な期間、宿主細胞を培養することにより産生される。抗体は、標準のタンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。

【0213】

抗原に対して結合する抗体の特徴づけ

本発明の抗体では、例えばフローサイトメトリーにより、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対する結合について試験してもよい。つまり、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2発現細胞を、組織培養フラスコおよび調製された単一の細胞懸濁液から新たに回収する。BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2を発現する細胞懸濁液を、透過処理ありまたは無しで、1%パラホルムアルデヒドPBSを用いた固定後かまたは直接に、一次抗体で染色する。約100万個の細胞を、0.5%BSAおよび50~200 μ g/mlの一次抗体を含有するPBS中に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートする。細胞を、0.1%BSA、0.01%NaN₃を含有するPBSで2回洗浄し、1:100希釈のFITCと複合されたヤギ-抗-ヒトIgG(ペンシルバニア州ウエストグローブ(West Grove)のジャクソン・イムノリサーチ(Jackson ImmunoResearch))100 μ l中に再懸濁し、氷上でさらに30分間インキュベートする。細胞を再び洗浄用緩衝液0.5mlで2回洗浄し、ファックスキャリバー(FACSCalibur)血球計算器(カリフォルニア州サンノゼ(San Jose)のベクトン・ディッキンソン(Becton-Dickinson))上で蛍光染色について分析する。

【0214】

あるいは、本発明の抗体では、標準ELISAにより、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対する結合について試験してもよい。つまり、マイクロタイタープレートを、PBS中、0.25 μ g/mlでの精製されたBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2でコートし、次いでPBS中、5%ウシ血清アルブミンでブロックする。抗体の希釈物(例えば、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2で免疫されたマウス由来の血漿の希釈物)を各ウェルに添加し、37で1-2時間インキュベートする。プレートをPBS/トウインで洗浄し、次いでアルカリホスファターゼに複合された二次試薬(例えば、ヒト抗体においてはヤギ-抗-ヒトIgGFcに特異的なポリクロール試薬)とともに37で1時間インキュベートする。洗浄後、プレートをpNPP基質(1mg/ml)で発色させ、OD405-650で分析する。典型的には、最高力価を生じるマウスは融合に用いられることになる。

【0215】

上記のELISAアッセイを用い、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2免疫原との反応性で陽性を示すハイブリドーマのスクリーニングも可能である。BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対して高い結合活性で結合するハイブリドーマはサブクロニングされ、さらに特徴づけられる。各ハイブリドーマ由来の1つのクローンは、(ELISAにより)親細胞の反応性を保持し、-140で保存された5~10のバイアルの細胞バンクの作製および抗体精製のために選択されうる。

【0216】

抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体を精製するため、選択されたハイブリドーマを2リットルのスピナーフラスコ内で成長させ、モノクローナル抗体の精製を行ってもよい。上清を、プロテインA-セファロース(ニュージャージー州ピスカタウェイ(Piscataway))

away) のファルマシア (Pharmacia)) を用いる親和性クロマトグラフィー前に濾過し、濃縮してもよい。溶出された IgG をゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーにより検査し、純度を保証してもよい。緩衝溶液を PBS に交換し、濃度を、1.43 消衰係数を用いる OD₂₈₀ によって決定してもよい。モノクローナル抗体を一定量に分割し、-80 で保存してもよい。

【0217】

選択された抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するか否かを判定するため、各抗体を市販の試薬(イリノイ州ロックフォード(Rockford)のピアス(Pierce))を用いてビオチン化してもよい。未標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を有する競合試験を、上記のBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2でコートされたELISAプレートを用いて行ってもよい。ビオチン化mAbの結合性を、ストレプトアビジン(strep-avidin)-アルカリホスファターゼプローブで検出してもよい。あるいは、下記の実施例でさらに記載のように、競合試験を、放射性標識抗体を用いて行い、未標識競合抗体をスカッチャード(Scatchard)分析で検出してもよい。

10

【0218】

精製抗体アイソタイプを判定するため、アイソタイプELISAを特定のアイソタイプの抗体に対して特異的な試薬を用いて行ってもよい。例えば、ヒトモノクローナル抗体アイソタイプを判定するため、マイクロタイタープレートのウェルを1μg/mlの抗-ヒト免疫グロブリンで4で一晩コートしてもよい。1%BSAでブロック後、プレートを1μg/ml以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプ対照と周囲温度で1~2時間反応させる。次いで、ウェルをヒトIgG1またはヒトIgMのいずれかに特異的なアルカリホスファターゼと複合されたプローブと反応させてもよい。プレートを発色させ、上記のように分析される。

20

【0219】

抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2ヒトIgGを、ウエスタンブロッティングにより、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2抗原との反応性についてさらに試験することができる。つまり、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2を調製し、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離された抗原はニトロセルロース膜に移され、10%ウシ胎仔血清でブロックされ、試験対象のモノクローナル抗体で探索される。ヒトIgGの結合性を、抗-ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出し、BCIP/NBT基質タブレット(ミズーリ州セントルイス(St. Louis)のシグマ・ケミカル(Sigma Chem. Co.))を用いて発色させてもよい。

30

【0220】

免疫複合体

40

別の態様では、本発明は、治療的部分、例えば細胞毒素、薬剤(例えば免疫抑制剤)または放射性毒素に複合された、抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体、またはそれらの断片を特徴とする。かかる複合体は本明細書中で「免疫複合体」と称される。1つ以上の細胞毒素を含む免疫複合体は「免疫毒素」と称される。細胞毒素または細胞毒性物質は、細胞に対して有害な(例えば細胞を殺滅する)任意の作用物質を含む。例として、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド(tenoposide)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン

50

、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。治療物質は、例えば、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン（5-fluorouracil decarbazine）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）も含む。

【0221】

本発明の特定の態様内では、[毒素（例えばビンブラスチン、リシン（risin）、ジフテリア毒素、アブリン、ビンブラスチンヒドラジド、メトトレキセートヒドラジド、アントラサイクリン、インジウムとイットリウムとのキレート、ならびに金属キレート）が、ポリエチレングリコールおよびジペプチドを含む切断可能なスパーサーを介して例えば抗体またはその断片上の残基に結合された毒素複合体について記載する]米国特許第6,1003,236号明細書および米国特許第6,638,509号明細書；[細胞毒性物質、ジスルフィドプロドラッグ、ペプチジルプロドラッグ、および化学的リンカーを含むリンカーについて記載する]米国特許第6,989,452号明細書および米国特許出願第10/160,972号明細書、米国特許出願第10/161,234号明細書、米国特許出願第11/133,970号明細書、米国特許出願第11/134,685号明細書、米国特許出願第11/134,826号明細書、米国特許出願第11/224,580号明細書、および米国特許出願第11/398,854号明細書に開示のように、ウルトラ・ポテント・セラピューティック（Ultra-potent Therapeutic）（UPT（商標）；カリフォルニア州ミルピタス（Milpitas）のメダレックス社（Medarex, Inc.））である治療部分に複合された抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/もしくは抗-BMPR2抗体、またはそれらの断片を含む、免疫複合体が提供される。

【0222】

本発明の抗体に複合可能な細胞毒素治療薬の他の好ましい例として、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシンおよびオーリスタチン（auristatins）およびそれらの誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体複合体の例として市販のもの（ミロターグ（Mylotarg）（登録商標）；アメリカン・ホーム・プロダクツ（American Home Products））が挙げられる。

【0223】

細胞毒素は、当該技術分野で利用可能なリンカー技術を用いて本発明の抗体に複合される。細胞毒素を抗体に複合させるのに用いられているリンカータイプの例として、限定はされないが、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィドおよびペプチドを含むリンカーが挙げられる。例えば、リソソーム区画内で低いpHにより切断を受けやすいかまたはプロテアーゼ、例えばカテプシン（例えば、カテプシンB、C、D）などの腫瘍組織内で優先的に発現されるプロテアーゼにより切断を受けやすいリンカーを選択してもよい。

【0224】

細胞毒素の例が、例えば、米国特許第6,989,452号明細書、米国特許第7,087,600号明細書、および米国特許第7,129,261号明細書、ならびにPCT出願番号、PCT/US02/17210号明細書、PCT/US2005/017804号明細書、PCT/US06/37793号明細書、PCT/US06/060050

10

20

30

40

50

号明細書、PCT/US2006/060711号明細書、国際公開第2006/110476号パンフレット、ならびに米国特許出願第60/891,028号明細書に記載されている（これらのすべてはそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。細胞毒素のタイプ、リンカーおよび治療物質を抗体に複合させるための方法についてのさらなる考察としては、サイトウ G. (Saito G.) ら (2003年) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215頁;トレイル P. A. (Trail P. A.) ら (2003年) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337頁;ペイン G. (Payne G.) (2003年) Cancer Cell 3:207-212頁;アレン T. M. (Allen T. M.) (2002年) Nat. Rev. Cancer 2:750-763頁;バスタン I. (Pastan I.) およびクレイトマン R. J. (Kreitman R. J.) (2002年) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091頁;センター P. D. (Senter P. D.) およびスプリングー C. J. (Springer C. J.) (2001年) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264頁も参照のこと。

10

【0225】

本発明の抗体を、放射性同位体にも複合し、放射性免疫複合体とも称される細胞毒性のある放射性医薬品を生成してもよい。診断または治療用途として抗体に複合可能な放射性同位体の例として、限定はされないが、ヨウ素¹³¹、ヨウ素¹²⁵、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰ およびルテチウム¹⁷⁷ が挙げられる。放射性免疫複合体を調製するための方法は、当該技術分野で確立されている。放射性免疫複合体の例は、ゼバリン (Zevalin) (商標) (バイオジェン (Biogen) (登録商標) IDEC) およびベキサール (Bexxar) (商標) (グラクソ・スミスクライン (Glaxo-SmithKline)) および (登録商標) (コリクサ・ファーマシューティカルズ (Corixa Pharmaceuticals)) などが市販されており、同様の方法を用い、本発明の抗体を用いて放射性免疫複合体を調製してもよい。

20

【0226】

本発明の抗体複合体を用いて所与の生物学的応答を修飾可能であり、薬剤部分は従来の化学治療物質に限定されるものとして解釈されるべきではない。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドでありうる。かかるタンパク質は、例えば、酵素活性毒素またはその活性断片、例えばアブリン、リシンA、シュードモナスエキソトキシンまたはジフテリア毒素;腫瘍壊死因子またはインターフェロン - などのタンパク質;あるいは、例えばリンホカイン、インターロイキン - 1 (「IL - 1」)、インターロイキン - 2 (「IL - 2」)、インターロイキン - 6 (「IL - 6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM - CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G - CSF」) または他の成長因子などの生物学的応答修飾因子を含みうる。

30

【0227】

かかる治療部分を抗体に複合させるための技術は周知であり、例えば、アーノン (Arnon) ら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、243-56頁 (レイスフェルド (Reisfeld) ら編、アラン・アール・リス社 (Alan R. Liss, Inc.) 1985年);ヘルストローム (Hellstrom) ら、「Antibodies For Drug Delivery」, in Controlled Drug Delivery、623-53頁 (第2版、ロビンソン (Robinson) ら編、マーセル・デッカー社 (Marcel Dekker, Inc.) 1987年);ソルペ (Thorpe)、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications、475-5

40

50

06頁(1985年);「Analysis, Results and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、303-16頁(アカデミック・プレス(Academic Press)1985年);ならびにソルペ(Thorpe)ら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62:119-58頁(1982年)を参照のこと。

【0228】

10

二重特異性分子

別の態様では、本発明は、本発明の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/もしくは抗-BMPR2抗体またはそれらの断片を含む二重特異性分子を特徴とする。かかる抗体またはその抗原結合部分が別の機能分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質(例えば別の抗体または受容体に対するリガンド)に誘導体化または連結され、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子が生成されうる。本発明の抗体が実際に2つ以上の他の機能分子に誘導体化または連結され、3つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異性分子が生成される可能性があり、かかる多重特異性分子は本明細書で用いられる「二重特異性分子」という用語に包含されるようにも意図されている。本発明の二重特異性分子を作製するため、本発明の抗体は、二重特異性分子が生成されるように、1つ以上の他の結合分子、例えば別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣体(binding mimetic)に(例えば化学共役、遺伝子融合、非共有結合またはその他により)機能的に連結されうる。

20

【0229】

したがって、本発明は、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2に対する少なくとも1つの第1の結合特異性、ならびに第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。本発明の特定の実施形態では、第2の標的エピトープはFc受容体、例えばヒトFcRI(CD64)またはヒトFc受容体(CD89)である。したがって、本発明は、FcRまたはFcRを発現するエフェクター細胞(例えば、単球、マクロファージまたは多形核球細胞(PMN))、ならびにBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2を発現する標的細胞の双方に結合可能な二重特異性分子を含む。これらの二重特異性分子は、エフェクター細胞に対するBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2発現細胞を標的にし、かつ、Fc受容体媒介性のエフェクター細胞活性、例えばBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2発現細胞の食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、サイトカイン放出あるいはスーパーオキシドアニオンの生成を引き起こす。

30

【0230】

40

二重特異性分子が多重特異性である場合の本発明の実施形態では、同分子は、抗-Fc結合特異性および抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2結合特異性に加え、第3の結合特異性をさらに含む。一実施形態では、第3の結合特異性は、抗促進因子(anti-enhancement factor)(EF)部分、例えば細胞毒性活性に関与する表面タンパク質に結合し、それにより標的細胞に対する免疫応答を高める分子である。「抗促進因子部分」は、所与の分子、例えば抗原または受容体に結合し、それによりFc受容体または標的細胞抗原における結合決定因子の効果の促進をもたらす抗体、機能抗体断片またはリガンドでありうる。「抗促進因子部分」はFc受容体または標的細胞抗原に結合する。あるいは、抗促進因子部分は、第1および第2の結合特異性の結合対象である実体と

50

は異なる実体に結合しうる。例えば、抗促進因子部分は、(例えば標的細胞に対する免疫応答の増大をもたらすCD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1または他の免疫細胞を介して)細胞毒性T細胞に結合しうる。

【0231】

一実施形態では、本発明の二重特異性分子は、結合特異性として、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb、または一本鎖Fvを含む、少なくとも1つの抗体またはその抗体断片を含む。ラドナー(Ladner)らに交付されたラドナー(Ladner)ら、米国特許第4,946,778号明細書(その全体は参照により明示的に援用される)に記載のように、抗体は、Fvまたは一本鎖コンストラクトなどの軽鎖または重鎖二量体またはその任意の最小断片でもありうる。

10

【0232】

別の実施形態では、Fc受容体に対する結合特異性はモノクローナル抗体により提供され、その結合はヒト免疫グロブリンG(IgG)により遮断されることはない。本明細書で用いられる「IgG受容体」という用語は、染色体1上に位置する8つの鎖遺伝子のいずれかを示す。これらの遺伝子は、3つのFc受容体クラス：FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)にグループ化された全部で12の膜貫通または可溶性受容体アイソフォームをコードする。好ましい一実施形態では、Fc受容体はヒト高親和性FcRIである。ヒトFcRIは72kDaの分子であり、単量体IgGに対して高い親和性を示す($10^8 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$)。

20

【0233】

特定の抗-Fcモノクローナル抗体の産生および特徴づけについては、ファンガー(Fanger)らにより、ファンガー(Fanger)らに交付されたPCT国際公開公報第88/00052号パンフレットおよび米国特許第4,954,617号明細書において記載されており、それらの教示内容は参照により本明細書中に十分に援用される。これらの抗体は、受容体のFc結合部位から離れた部位でFcRI、FcRIIまたはFcRIIIのエピトープに結合することから、それらの結合がIgGの生理的レベルにより実質的に遮断されることはない。本発明で有用な特異的な抗-FcRI抗体は、mAb22、mAb32、mAb44、mAb62およびmAb197である。mAb32を産生するハイブリドーマは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American type Culture Collection)、ATCCアクセッション番号HB9469から入手可能である。他の実施形態では、抗-Fc受容体抗体はモノクローナル抗体22のヒト化形態である(H22)。H22抗体の産生および特徴づけについては、グラジアーノ(Graziano)らJ. Immunol 155(10):4996-5002頁(1995年)およびテンペスト(Tempest)らに交付されたPCT国際公開公報第94/10332号パンフレットに記載されている。H22抗体産生細胞系は、HA022CL1の指定の下でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American type Culture Collection)に寄託されたものであり、アクセッション番号CRL11177を有する。

30

【0234】

さらに他の実施形態では、Fc受容体に対する結合特異性はヒトIgA受容体、例えばFc-受容体(FcRI(CD89))に結合する抗体により提供され、その結合は典型的にはヒト免疫グロブリンA(IgA)により遮断されることはない。「IgA受容体」という用語は、染色体19上に位置する1つの遺伝子の遺伝子産物(FcRI)を含むように意図されている。この遺伝子は、55~110kDaの数種の交互にスプライスされた膜貫通アイソフォームをコードすることが知られている。FcRI(CD89)は、単球/マクロファージ、好酸性および好中性顆粒球上に構成的に発現されるが、非エフェクター細胞集団上に発現されることはない。FcRIは、IgA1およびIgA2の双方に対して中程度の親和性(約 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)を有し、G-CSFまたはGM-CSFなどのサイトカインへの暴露時に増加する(モートン(Morton)ら、Critical Reviews in Immunology 16:423-440

40

50

頁(1996年))。A3、A59、A62およびA77として同定された4つのFcRIに特異的なモノクローナル抗体は、IgAリガンド結合ドメイン外部のFcRIに結合するものであり、記載がなされている(モンテイロ(Monteiro)ら、J. Immunol. 148:1764頁(1992年))。

【0235】

FcRIおよびFcRIは、(1)主に免疫エフェクター細胞、例えば単球、PMN、マクロファージおよび樹状細胞の上で発現され、(2)高レベルで発現され(例えば1細胞当たり5,000-100,000)、(3)細胞毒性活性のメディエーター(例えばADCC、食作用)であり、かつ(4)それらに対して標的とされる、自己抗原を含む抗原の抗原提示の促進を媒介することから、本発明の二重特異性分子において用いられる要因となる好ましい誘発受容体である。

10

【0236】

本発明の二重特異性分子は、構成要素の結合特異性、例えば抗-FcRおよび抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2の結合特異性を、当該技術分野で公知の方法によって複合することにより調製されうる。例えば、二重特異性分子の各結合特異性は別々にもたらされ、次いで互いに複合されうる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、種々のカップリング剤または架橋剤が共有結合において用いられうる。架橋剤の例として、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(OPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン(cyclohexane)-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)が挙げられる(例えば、カルポフスキー(Karpovsky)ら、J. Exp. Med. 160:1686頁(1984年);リウ(Liu)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:8648頁(1985年))。他の方法として、パウルス(Paulus)、Behring Ins. Mitt. No. 78:118-132頁(1985年);ブレナン(Brennan)ら、Science 229:81-83頁(1985年)およびグレニー(Glennie)ら、J. Immunol. 139:2367-2375頁(1987年)に記載の方法が含まれる。好ましい複合剤はSATAおよびスルホ-SMCCであり、いずれもピアス・ケミカル(Pierce Chemical Co.)(イリノイ州ロックフォード(Rockford))から入手可能である。

20

30

【0237】

結合特異性が抗体である場合、それらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して複合されうる。特に好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、複合に先立ち、奇数、典型的には1つのスルフヒドリル残基を有するように修飾される。

【0238】

あるいは、両方の結合特異性は同じベクター内にコードされ、かつ同じ宿主細胞内で発現され、構築されうる。この方法は、二重特異性分子がmAbxmAb、mAbxFab、FabxF(ab')₂またはリガンドxFab融合タンパク質である場合に特に有用である。本発明の二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体および結合決定因子を含む一本鎖分子、または2つの結合決定因子を含む一本鎖二重特異性分子でありうる。二重特異性分子は、少なくとも2つの一本鎖分子を含みうる。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば米国特許第5,260,203号明細書;米国特許第5,455,030号明細書;米国特許第4,881,175号明細書;米国特許第5,132,405号明細書;米国特許第5,091,513号明細書;米国特許第5,476,786号明細書;米国特許第5,013,653号明細書;米国特許第5,258,498号明細書;および米国特許第5,482,858号明細書に記載されている(これらの各々はその全体が参照により本明細書中に援用される)。

40

50

【0239】

二重特異性分子のその特異的な標的に対する結合は、例えば酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、F A C S 分析、バイオアッセイ（例えば成長阻害）またはウエスタンブロットアッセイによって確認されうる。これらの各アッセイでは、一般に、特別な目的のタンパク質 - 抗体複合体の存在が目的の複合体に対して特異的な標識試薬（例えば抗体）の使用により検出される。例えば、F c R - 抗体複合体は、例えば、抗体 - F c R 複合体を認識しかつそれに対して特異的に結合する酵素結合抗体または抗体断片を用いて検出されうる。あるいは、複合体は種々の他のイムノアッセイのいずれかを用いて検出されうる。例えば、抗体は放射活性物質で標識され、ラジオイムノアッセイ（R I A）で用いられうる（例えば、Weintraub B. (Weintraub B.), 「Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques」、米国内分泌学会（The Endocrine Society）、1986年3月（参照により本明細書中に援用される）を参照）。放射性同位体は、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターの使用などの手段あるいはオートラジオグラフィーにより検出されうる。

10

【0240】

抗体断片および抗体模倣体

本発明は、従来の抗体に限定されることなく、抗体断片および抗体模倣体の使用を通じて実施可能である。下記に詳述のように、多種多様な抗体断片および抗体模倣技術が現在では開発されており、当該技術分野で広く知られている。多数のこれら技術、例えばドメイン抗体、Nanobody、およびUniBodyでは従来の抗体構造の断片またはそれに対する他の修飾が用いられる一方、他の技術、例えば従来の抗体結合を模倣する一方、異なる機序から産生され、それを介して機能する結合構造を用いるAffibody、DARPin、Anticalin、Avimer、およびVersabodyも存在する。

20

【0241】

ドメイン抗体（dAb）は抗体の最小の機能結合単位であり、ヒト抗体の重鎖（VH）または軽鎖（VL）のいずれかの可変領域に対応するものである。ドメイン抗体は約13 kDaの分子量を有する。ドマニティス・リミテッド（Domantis Limited）は、完全ヒトVHおよびVL dAbにおける一連の大規模でかつ高度に機能的なライブラリ（各ライブラリ内に100億超の異なる配列）を開発しており、これらのライブラリを用いて治療標的に特異的なdAbを選択する。多数の従来の抗体に対し、ドメイン抗体は細菌、酵母、および哺乳類細胞系内で十分に発現される。ドメイン抗体およびその産生方法のさらなる詳細については、米国特許第6,291,158号明細書；米国特許第6,582,915号明細書；米国特許第6,593,081号明細書；米国特許第6,172,197号明細書；米国特許第6,696,245号；米国特許出願公開第2004/0110941号明細書；欧州特許出願第1433846号明細書および欧州特許第0368684号明細書および欧州特許第0616640号明細書；国際公開第05/035572号パンフレット、国際公開第04/101790号パンフレット、国際公開第04/081026号パンフレット、国際公開第04/058821号パンフレット、国際公開第04/003019号パンフレットおよび国際公開第03/002609号パンフレットの参照により得られうる（これら各々はその全体が参照により本明細書中に援用される）。

30

40

【0242】

Nanobodyは、天然の重鎖抗体の固有の構造および機能特性を有する抗体由来の治療タンパク質である。これらの重鎖抗体は、単一の可変ドメイン（VHH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を有する。重要なことには、クローン化され、単離されたVHHドメインは、元の重鎖抗体の完全な抗原結合能を内在する完全に安定的なポリペプチドである。Nanobodyは、ヒト抗体のVHドメインとの高い相同性を有

50

し、かつ活性の任意の低下を伴うことなくさらにヒト化されうる。重要なことには、N a n o b o d y は免疫原性の低い可能性があり、霊長動物試験でN a n o b o d y のリード化合物を用いて確認されている。

【0243】

N a n o b o d y では、従来の抗体の利点と小分子薬物の重要な特徴とが組み合わせられる。N a n o b o d y は、従来の抗体と同様、その標的および低い固有の毒性に対し、高い標的特異性、高親和性を示す。しかし、N a n o b o d y は、小分子薬物と同様、酵素を阻害し、受容体のクレフトに容易に接近可能である。さらに、N a n o b o d y は極めて安定的であり、注射以外の手段で投与可能であり（例えば国際公開第04/041867号パンフレットを参照（その全体が参照により本明細書中に援用される）、製造が容易である。N a n o b o d y の他の利点には、小さいサイズに起因するまれであるかまたは隠されたエピトープの認識、タンパク質標的の空洞または活性部位へのその固有の三次元構造に起因する高い親和性および選択性による結合性、薬物形式の柔軟性、半減期の調整ならびに薬物発見の容易性および速度が挙げられる。

10

【0244】

N a n o b o d y は、単一の遺伝子によりコードされ、ほぼすべての原核生物および真核生物宿主、例えば大腸菌（E . c o l i ）（例えば米国特許第6,765,087号明細書を参照（その全体が参照により本明細書中に援用される））、かび（例えばコウジカビ属（A s p e r g i l l u s ）またはトリコデルマ（T r i c h o d e r m a ））ならびに酵母（例えば、サッカロマイセス（S a c c h a r o m y c e s ）、クリベロマイセス（K l u y v e r o m y c e s ）、ハンゼヌラ（H a n s e n u l a ）またはピキア（P i c h i a ））（例えば米国特許第6,838,254号明細書を参照（その全体が参照により本明細書中に援用される））において効率的に産生される。産生プロセスは拡張可能であり、数キログラム量のN a n o b o d y が産生されている。N a n o b o d y は、従来の抗体と比べて優れた安定性を示すことから、貯蔵寿命が長く即使用可能な溶液として調合可能である。

20

【0245】

ナノクローン（N a n o c l o n e ）法（例えば国際公開第06/079372号パンフレットを参照（その全体が参照により本明細書中に援用される））は、B細胞の自動化されたハイスループットな選択に基づき所望の標的に対するN a n o b o d y を産生するための独自の方法であり、場合により本発明との関連で用いられうる。

30

【0246】

U n i B o d y は別の抗体断片技術であるが、この技術はI g G 4 抗体のヒンジ領域の除去に基づくものである。ヒンジ領域の欠失により、従来のI g G 4 抗体に対して本質的に半分のサイズでありかつI g G 4 抗体の二価結合領域ではなく一価結合領域を有する分子が生成される。I g G 4 抗体が不活性であることから免疫系と相互作用することがないことも周知であり、これは免疫応答が望ましくない場合の疾患の治療において有利な場合があり、この利点はU n i B o d y 上に受け継がれる。例えば、U n i B o d y は、その結合対象の細胞を殺滅することなく阻害または静めるように機能しうる。さらに、癌細胞に結合するU n i B o d y は、それらを刺激して増殖させることはない。さらに、U n i B o d y が従来のI g G 4 抗体の約半分のサイズであることから、それは大きい固形腫瘍全体により適切な分布を示すとともに有利な有効性を発揮する可能性がある。U n i B o d y は、全I g G 4 抗体と同様の速度で身体から除去され、その抗原に対して全抗体と同様の親和性で結合可能である。U n i B o d y のさらなる詳細は、P C T 国際公開公報第2007/059782号パンフレット（その全体が参照により本明細書中に援用される）の参照により得られうる。

40

【0247】

A f f i b o d y 分子は、スタフィロコッカ（s t a p h y l o c o c c a l ）プロテインAのI g G 結合ドメインのうちの1つに由来する、58 - アミノ酸残基のタンパク質ドメインに基づく親和性タンパク質の新しいクラスを表す。この3つのヘリックスバン

50

ドル (helix bundle) ドメインはコンビナトリアルファージミドライブラリの作成物における足場として用いられており、それから所望の分子を標的にする Affibody 変異体がファージディスプレイ技術を用いて選択されうる (ノード K. (Nord K.)、ガンネリユッソン E. (Gunneriusson E.)、リングダール J. (Ringdahl J.)、スタール S. (Stahl S.)、ウーレン M. (Uhlen M.)、ナイグレン P. A. (Nygren P. A.)、*「Binding proteins selected from combinatorial libraries of an -helical bacterial receptor domain」*、Nat Biotechnol 1997 年; 15: 772 - 7 頁、ロンマーク J. (Ronmark J.)、グロンlund H. (Gronlund H.)、ウーレン M. (Uhlen M.)、ナイグレン P. A. (Nygren P. A.)、*「Human immunoglobulin A (IgA) - specific ligands from combinatorial engineering of protein A」*、Eur J Biochem 2002 年; 269: 2647 - 55 頁)。Affibody 分子におけるその低い分子量 (6 kDa) とともに単純で強固な構造により、それが例えば検出試薬のような多種多様な用途に適するようになり (ロンマーク J. (Ronmark J.)、ハンソン M. (Hansson M.)、ナイグレン T. (Nygren T.)ら、*「Construction and characterization of affibody - Fc chimeras produced in Escherichia coli」*、J Immunol Methods 2002 年; 261: 199 - 211 頁)、かつ受容体相互作用が阻害される (サンドストーム K. (Sandstorm K.)、スー Z. (Xu Z.)、フォルスバーグ G. (Forsberg G.)、ナイグレン P. A. (Nygren P. A.)、*「Inhibition of the CD28 - CD80 co - stimulation signal by a CD28 - binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering」*、Protein Eng 2003 年; 16: 691 - 7 頁)。Affibody およびそれを産生する方法のさらなる詳細が、米国特許第 5831012 号明細書により得られうる (その全体が参照により本明細書中に援用される)。

【0248】

標識された Affibody は、多数のアイソフォームを判定するためのイメージング用途においても有用でありうる。

【0249】

DARPin (設計されたアンキリンリピートタンパク質) は、非抗体ポリペプチドの結合能を用いるように開発された抗体模倣 DRP (設計されたりリピートタンパク質) 技術の一例である。アンキリンまたはロイシンリッチリピートタンパク質などのリピートタンパク質は、偏在する結合分子であり、抗体と異なり細胞内および細胞外に生じる。それら固有のモジュール構造は、構造単位の反復 (リピート) を特徴とし、共に蓄積され、可変でかつモジュール式の標的に結合する表面を示す伸長されたりリピートドメインが形成される。このモジュール性に基づき、非常に多様化された結合特異性を有するポリペプチドのコンビナトリアルライブラリが生成されうる。この方法は、可変の表面残基およびそれらのリピートドメインへのランダムアセンブリを示す自家和合性リピートに共通の設計を含む。

【0250】

DARPin は、細菌発現系内で極めて高収量に産生可能であり、公知の最も安定なタンパク質に属する。ヒト受容体、サイトカイン、キナーゼ、ヒトプロテアーゼ、ウイルスおよび膜タンパク質を含む広範囲の標的タンパク質に対して極めて特異的な高親和性の DARPin が選択されている。1 桁のナノモル ~ ピコモルの範囲内の親和性を有する DARPin を得ることが可能である。

【0251】

DARPinは、ELISA、サンドイッチELISA、フローサイトメトリー分析（FACS）、免疫組織化学（IHC）、チップ用途、親和性精製またはウエスタンブロッティングを含む広範囲の用途で用いられている。DARPinは、例えば緑色蛍光タンパク質（GFP）に融合された細胞内マーカータンパク質として細胞内区画内で活性が高いことも判明した。DARPinは、pM範囲内のIC50でウイルスの侵入を阻害するためにさらに用いられた。DARPinは、タンパク質-タンパク質相互作用の遮断に望ましいだけでなく酵素の阻害にも望ましい。プロテアーゼ、キナーゼおよびトランスポーターの阻害に奏功しており、ほとんどの場合、アロステリック阻害様式である。腫瘍に対する極めて迅速で特異的な濃縮および極めて好ましい腫瘍対血液比により、インビボでの診断的または治療的アプローチに十分に適合するDARPinが作製される。

10

【0252】

DARPinおよび他のDRP技術に関するさらなる情報が、米国特許出願公開第2004/0132028号明細書および国際特許出願公開、国際公開第02/20565号パンフレットに見出されうる（それら双方はそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0253】

Anticalinはさらなる抗体模倣技術であるが、この場合、結合特異性は、ヒト組織内および体液中で自然にかつ豊富に発現される低分子量タンパク質のファミリーであるリボカリンから誘導される。リボカリンは、進化することで、化学的感受性があるかまたは不可溶性の化合物の生理的輸送および保存に関連したインビボでの機能の範囲を果たしている。リボカリンは、タンパク質の一端で4つのループを支持する高度に保存された α -バレルを含む強固な固有の構造を有する。これらのループは結合ポケットに対する入口（entrance）を形成し、分子のこの部分における高次構造上の差は各リボカリン間の結合特異性におけるばらつきを示している。

20

【0254】

保存された α -シートフレームワークにより支持される超可変ループの全体構造から免疫グロブリンが連想されるが、リボカリンはサイズの観点で抗体とはかなり異なり、単一の免疫グロブリンドメインよりもわずかに大きい160-180個のアミノ酸の単一のポリペプチド鎖からなる。

30

【0255】

リボカリンはクローン化され、Anticalinの作製のため、そのループには改変がなされる。構造的に多様なAnticalinのライブラリが生成されており、Anticalinの提示は、結合機能の選択およびスクリーニング、それに続く、原核系または真核系におけるさらなる分析のための可溶性タンパク質の発現および産生を可能にする。試験によると、仮想的に任意のヒト標的タンパク質に特異的なAnticalinの開発が可能で、その単離が可能であり、ナノモルのまたはより高い範囲での結合親和性が得られうることを示すことに奏功している。

【0256】

Anticalinは、二重標的化された（dual targeting）タンパク質、いわゆるDuocalinとしても形式化されうる。Duocalinは、標準の作製プロセスを用いて1つの容易に生成される単量体タンパク質内の2つの別々の治療標的に結合する一方、その2つの結合ドメインの構造的な方向性にかかわらず標的の特異性および親和性を保持する。

40

【0257】

単一の分子を通じての複数の標的の調節は、2つ以上の病原因子を含むことで知られる疾患において特に有利である。さらに、Duocalinなどの二価または多価の結合形式は、疾患における細胞表面分子の標的化において有意な可能性を有し、シグナル伝達経路に対してアゴニスト作用を媒介するか、または細胞表面受容体の結合およびクラスターリングを介して内在化効果の増大を誘発する。さらに、Duocalinの固有の高い安定

50

性は単量体 *Anticalin* に匹敵し、*Duocalin* に対して柔軟な製剤および送達の可能性をもたらす。

【0258】

Anticalin に関するさらなる情報が、米国特許第 7,250,297 号明細書および国際特許出願公開番号、国際公開第 99/16873 号パンフレットに見出されうる（それら双方はそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0259】

本発明との関連で有用な別の抗体模倣技術が *Avimer* である。*Avimer* は、インビトロでのエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイによりヒト細胞外受容体ドメインの大きいファミリーから進化したものであり、結合および阻害特性を備えた多重ドメインタンパク質を生成する。複数の独立した結合ドメインの連結により結合活性がもたらされることが示されており、結果として従来の単一のエピトープ結合タンパク質に対して親和性および特異性が改善される。他の有望な利点として、大腸菌 (*Escherichia coli*) 内での多重標的に特異的な分子の単純かつ効率的な産生、プロテアーゼに対する改善された熱安定性および耐性が挙げられる。ナノメートル以下の親和性を有する *Avimer* が種々の標的に対して得られている。

10

【0260】

Avimer に関するさらなる情報が、米国特許出願公開第 2006/0286603 号明細書、米国特許出願公開第 2006/0234299 号明細書、米国特許出願公開第 2006/0223114 号明細書、米国特許出願公開第 2006/0177831 号明細書、米国特許出願公開第 2006/0008844 号明細書、米国特許出願公開第 2005/0221384 号明細書、米国特許出願公開第 2005/0164301 号明細書、米国特許出願公開第 2005/0089932 号明細書、米国特許出願公開第 2005/0053973 号明細書、米国特許出願公開第 2005/0048512 号明細書、米国特許出願公開第 2004/0175756 号明細書に見出されうる（それらすべてはそれら全体が参照により本明細書中に援用される）。

20

【0261】

Versabody は、本発明との関連で利用可能な別の抗体模倣技術である。*Versabody* は、15% を超えるシステインを有する 3~5 kDa の小さいタンパク質であり、高いジスルフィド密度の足場を形成し、典型的なタンパク質が有する疎水性コアの代わりとなる。疎水性コアを含む多数の疎水性アミノ酸の少数のジスルフィドとの置換により、より小さくより親水性が高く（低下した凝集および非特異的結合）、プロテアーゼおよび熱に対してより耐性があり、かつ MHC 提示の大部分に寄与する残基が疎水性であることからより低い T 細胞エピトープの密度を有するタンパク質が生成される。これらの特性の 4 つすべてが免疫原性に作用することで周知であり、それらは共に免疫原性の大幅な低下の原因になると予想される。

30

【0262】

Versabody についての着想は、ヒル、ヘビ、クモ、サソリ、カタツムリ、およびアネモネにより生成される天然の注射可能な生物医薬品から得られるものであり、予想外に低い免疫原性を示すことが知られている。選択された天然タンパク質ファミリーから、サイズの設計およびスクリーニングにより、疎水性、タンパク質分解の抗原プロセッシング、およびエピトープ密度が注射可能な天然タンパク質における平均を大幅に下回るレベルまで最小化される。

40

【0263】

Versabody の構造を仮定すると、これらの抗体模倣体は多価、多重特異性、半減期機構の多様性、組織標的化モジュールおよび抗体 Fc 領域の非存在を含む多目的形式を提供する。さらに、*Versabody* は、高収量で大腸菌 (*E. coli*) 内で作製され、かつ、*Versabody* はその親水性および小サイズ故に可溶性が高く、高濃度に調合されうる。*Versabody* は、特に熱安定的であり（それは沸騰可能であり）、長い貯蔵寿命をもたらす。

50

【0264】

Versabodyに関するさらなる情報が、米国特許出願公開第2007/0191272号明細書に見出されうる（その全体が参照により本明細書中に援用される）。

【0265】

上記で提供された抗体断片および抗体模倣技術の詳細な説明は、本明細書との関連で用いられうるあらゆる技術の包括的リストであるように意図されていない。例えば、また限定を目的としない場合、他のポリペプチドに基づく技術、例えばクイ（Qui）ら、Nature Biotechnology、25（8）921-929頁（2007年）（その全体が参照により本明細書中に援用される）で概説された相補性決定領域の融合、ならびに核酸に基づく技術、例えば米国特許第5,789,157号明細書、米国特許第5,864,026号明細書、米国特許第5,712,375号明細書、米国特許第5,763,566号明細書、米国特許第6,013,443号明細書、米国特許第6,376,474号明細書、米国特許第6,613,526号明細書、米国特許第6,114,120号明細書、米国特許第6,261,774号明細書、および米国特許第6,387,620号明細書（これらのすべては参照により本明細書中に援用される）に記載のRNAアプタマー技術を含む種々のさらなる技術が本発明との関連で利用可能である。

10

【0266】

薬学的組成物

別の態様では、本発明は、組成物、例えば薬学的に許容される担体とともに調合された本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分のうちの1つまたは組み合わせを含む薬学的組成物を提供する。かかる組成物は、本発明の（例えば2種もしくは3種以上の異なる）抗体または免疫複合体または二重特異性分子のうちの1つまたはそれらの組み合わせを含む。例えば、本発明の薬学的組成物は、標的抗原上で異なるエピトープに結合するかまたは相補的活性を有する抗体（または免疫複合体または二重特異性抗体）の組み合わせを含む。

20

【0267】

本発明の薬学的組成物は、併用療法、すなわち他の作用物質と併用しても投与可能である。例えば、併用療法は、本発明の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体と、少なくとも1つの他の抗炎症物質または免疫抑制剤、骨疾患または癌に対して有効性を有する1つ以上の他の抗体、および/または1つ以上の化学療法様式との併用を含みうる。多種多様な併用療法的アプローチが、本発明の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体の用量の低減により治療副作用の低下が得られうるという利点とともに考えられることが理解されるであろう。

30

【0268】

他の実施形態内で、本明細書中に開示される治療抗体は、免疫抑制経路を抑制する1つ以上の抗体、例えば（本明細書中でMDX-010と称される抗体として例示される）抗-CTLA-4抗体と併用されうる。CTLA-4タンパク質は、ウイルスまたは細菌などの外来物質を認識する場合、免疫応答を開始して感染症と闘う特定のリンパ球上に見出される。CTLA-4タンパク質は、ウイルスまたは細菌と闘う免疫細胞の数を減少させることにより免疫応答の停止を助ける。しかし、免疫応答が骨および/または腫瘍細胞に対して開始される場合、免疫応答を停止するだけでなく利用可能な多数のリンパ球を保持することが有用でありうる。したがって、抗-CTLA-4抗体、例えばMDX-010を本発明の1つ以上の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体と併用することで、有利にもCTLA-4が遮断され、免疫活性が維持されうる。

40

【0269】

本明細書で用いられる「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合可能な、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤な

50

どを含む。典型的には、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば注射または注入による）に適する。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち抗体、免疫複合体または二重特異性分子は、化合物を酸の活性および化合物を不活性化しうる他の天然条件から保護するための材料でコートされうる。

【0270】

本発明の薬学的化合物は、1つ以上の薬学的に許容される塩を含む。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持する塩を示し、任意の望ましくない毒物学的効果を与えることがない（例えば、ベルゲ（Berge）ら、J. Pharm. Sci. 66: 1-19頁（1977年）を参照）。かかる塩の例として、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸や、脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸から誘導される塩が挙げられる。塩基付加塩には、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどや、非毒性有機アミン、例えばN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどから誘導される塩が挙げられる。

10

【0271】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される酸化防止剤も含有しうる。薬学的に許容される酸化防止剤の例として、（1）水溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（2）油溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど；および（3）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン4酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが挙げられる。

20

【0272】

本発明の薬学的組成物中に用いられうる適切な水性および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール（グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油ならびに注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが挙げられる。適切な液性が、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散の場合に必要なとされる粒径の維持ならびに界面活性剤の使用により維持されうる。

30

【0273】

これらの組成物は、防腐剤、浸潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントも含有しうる。微生物の出現の防止は、上記の滅菌法と、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの包含との双方により保証されうる。組成物中に等張剤、例えば糖、塩化ナトリウムなどを含めることも望ましい場合がある。さらに、注射可能な薬学的形態の吸収遅延がモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる作用物質の包含によりもたらされうる。

40

【0274】

薬学的に許容される担体は、注射可能な無菌溶液または分散系の即時調製のための、無菌水溶液または分散系および無菌粉末を含む。薬学的活性物質におけるかかる媒体および作用物質の使用については当該技術分野で公知である。任意の従来の媒体または作用物質が活性化合物と混合できない場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用が検討される。補助活性化合物も組成物中に組み込み可能である。

【0275】

治療組成物は、典型的には製造および保存の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、高い薬物濃度に適する溶液、マイクロエマルジョン、リボソームまたは他の規則的構造として調合されうる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそ

50

これらの適切な混合物を含有する溶媒または分散系でありうる。適切な液性が、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散の場合に必要な粒径の維持ならびに界面活性剤の使用により維持されうる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコールまたは塩化ナトリウムを含めることが好ましいと考えられる。注射可能な組成物の遅延された吸収は、組成物中に吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアレート塩 (monostearate salts) およびゼラチンを含めることによりもたらされうる。

【0276】

注射可能な無菌溶液は、必要に応じ、上掲の原料の1つもしくは組み合わせを有する適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み込み、その後滅菌および精密ろ過を施すことにより調製されうる。一般に、分散系は、塩基性分散系および上掲の原料由来の必要な他の原料を含有する無菌溶媒に活性化化合物を組み込むことにより調製される。注射可能な無菌溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分の粉末に加え任意の所望の追加原料をその予め無菌濾過された溶液から生成する、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【0277】

担体材料と組み合わせることで単一の剤形を生成可能な活性成分の量は、治療される対象および特定の投与方法に依存して変化すると考えられる。単一の剤形を生成するための担体材料と併用可能な活性成分の量は、一般に治療効果をもたらす組成物の量となる。一般に、この量は、薬学的に許容される担体との併用で、100%のうち、活性成分の約0.01%～約99%、典型的には活性成分の約0.1%～約70%、最も典型的には活性成分の約1%～約30%の範囲となる。

【0278】

投与計画を調節することで最適な所望の応答（例えば治療応答）がもたらされる。例えば、単回ボラスが投与されうるか、数回の分割用量が長期にわたり投与されうるかまたは同用量が治療状況の要件で示されるように比例的に漸減または増加されうる。投与の容易さおよび用量の均一性を意図し、非経口組成物を投与単位形態で調製することが特に有利である。本明細書で用いられる投与単位形態は、試験されるべき対象に対する単一の用量として適合する物理的に別々の単位であり、各単位は必要とされる薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された既定量の活性化化合物を有する。本発明の投与単位形態における仕様は、(a) 活性化化合物固有の特性および達成されるべき特定の治療効果と、(b) 個体における感受性を治療するためにかかる活性化化合物を配合する当該技術分野に内在する制限により決定づけられ、かつそれらに直接依存している。

【0279】

抗体の投与においては、用量は、宿主体重の約0.0001～100mg/kg、およびより一般的には0.01～25mg/kgの範囲である。例えば用量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重もしくは10mg/kg体重または1-10mg/kgの範囲内であってもよい。必要に応じ、より高用量、例えば15mg/kg体重、20mg/kg体重もしくは25mg/kg体重を用いてもよい。典型的な治療計画では、毎週1回、2週ごとに1回、3週ごとに1回、4週ごとに1回、1か月に1回、3か月ごとに1回または3～6か月ごとに1回の投与が必要とされる。本発明の抗体に対する特定の投与計画は、抗体の静脈内投与を介した1mg/kg体重または3mg/kg体重を含み、ここで抗体は(i) 6回投与を4週ごと、次いで3か月ごと；(ii) 3週ごと；(iii) 1回の3mg/kg体重、次いで3週ごとに1mg/kg体重といった投与計画のうちの1つを用いて投与される。

【0280】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する、2つもしくはそれより多数の本発明の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPRI A、抗-BMPRI B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPRI 2モノクローナル抗体が同時投与され、いずれの場合でも投与される各抗体の用量は指定範囲内に含まれる。多くの場合、抗体が通常投与される。

単回投与間の間隔は、例えば、週単位、月単位、3か月単位または年単位であってもよい。患者における抗体の標的抗原に対する血中濃度の測定により示されるように、間隔は不規則であってもよい。用量は、ある方法では約1~1000 μ g/ml、またある方法では約25~300 μ g/mlの血漿抗体濃度を得るように調節される。

【0281】

他の方法では、1つ以上の本発明の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2モノクローナル抗体は、例えば抗-CTLA-4および/または抗-PD-1などの異なる結合特異性を有する抗体と同時投与され、いずれの場合でも投与される各抗体の用量は指定範囲内に含まれる。

10

【0282】

あるいは、抗体は徐放製剤として投与可能であり、いずれの場合でも低頻度の投与が必要とされる。用量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変化する。一般に、ヒト抗体は最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体がそれに続く。投与の用量および頻度は、治療が予防的であるかまたは治療的であるかに依存して変化する。予防的適用においては、比較的低用量が長期にわたり比較的低頻度の間隔で投与される。一部の患者が、余生にわたって治療を受け続けている。治療的適用においては、疾患の進行が低下または終結されるまで、典型的には患者が疾患の徴候の部分的または完全な改善を示すまで、比較的小間隔で比較的高用量が必要とされる場合がある。その後、患者は予防計画通りに投与される。

20

【0283】

本発明の薬学的組成物中での活性成分の実際の用量レベルを、患者に毒性をもたらすことなく、特定の患者、組成物および投与様式について所望の治療応答を得るのに有効な活性成分の量を得るように変化させてもよい。選択される用量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、用いられる特定の化合物の投与経路、投与時間、排出速度、用いられる特定の組成物と併用される治療薬、他の薬物、化合物および/または材料の持続時間、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および過去の病歴、ならびに医術において周知の要素のようなものを含む種々の薬物動態学的因子に依存すると考えられる。

【0284】

本発明の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体の「治療有効用量」は、典型的には疾患徴候の重症度の低下、疾患徴候のない期間の頻度および持続時間の増大あるいは疾患の苦しみに起因する機能障害または身体障害の予防をもたらす。例えば、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2細胞または腫瘍を伴う骨疾患または癌の治療においては、「治療有効用量」は、典型的には細胞成長または腫瘍成長を、未治療の対象に対し、少なくとも約20%、より典型的には少なくとも約40%、さらにより典型的には少なくとも約60%およびさらにより典型的には少なくとも約80%阻害する。化合物の腫瘍成長に対する阻害能は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価可能である。あるいは、組成物のこの特性は、化合物の細胞成長に対する阻害能の試験により評価可能であり、かかる阻害は当業者に公知のアッセイによりインビトロで測定可能である。治療有効量の治療化合物により、腫瘍サイズが低減しうるかまたはさもなくば対象における徴候が改善しうる。当業者であれば、対象の大きさ、対象の徴候の重症度および選択された投与における特定の組成物または経路などの要素に基づき、かかる量を決定できるであろう。

30

40

【0285】

本発明の組成物は、種々の当該技術分野で公知の方法のうちの1つ以上を用い、1つ以上の投与経路を介して投与される。当業者に理解されるように、投与の経路および/または方法は所望の結果に応じて変化すると考えられる。本発明の抗体における好ましい投与経路は、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与経路、例え

50

ば注射もしくは注入によるものを含む。本明細書で用いられる「非経口投与」という語句は、経腸および局所投与以外の投与方法、通常は注射によるものを意味し、限定はされないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内への注射および注入を含む。

【0286】

あるいは、本発明の抗体は、非経口でない(non-parenteral)経路、例えば局所経路、表皮または粘膜の投与経路を介し、例えば、経鼻的、経口的、経腔的、経直腸的、舌下的または局所的に投与されうる。

【0287】

活性化化合物は、迅速な放出に対する化合物、例えばインプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤を保護することになる担体とともに調製されうる。生体分解性、生体適合性ポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸が用いられうる。かかる製剤を調製するための多数の方法が特許化されているかまたは一般に当業者に公知である。例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」(J. R. ロビンソン(J. R. Robinson)編、マーセル・デッカー社(Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク(New York)、1978年)を参照のこと。

【0288】

治療組成物は、当該技術分野で公知の医療器具を用いて投与可能である。例えば、好ましい実施形態では、本発明の治療組成物は、ニードルレス皮下注射器具、例えば米国特許第5,399,163号明細書；米国特許第5,383,851号明細書；米国特許第5,312,335号明細書；米国特許第5,064,413号明細書；米国特許第4,941,880号明細書；米国特許第4,790,824号明細書；または米国特許第4,596,556号明細書に開示された器具を用いて投与可能である。本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例として、薬物を制御された速度で投与するための埋め込み式マイクロ注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号明細書、皮膚を通して薬剤(medicants)を投与するための治療器具を開示する米国特許第4,486,194号明細書、薬物を正確な注入速度で送達するための薬物注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号明細書、連続的な薬物送達のための流量可変型の埋め込み式注入装置を開示する米国特許第4,447,224号明細書、マルチチャンバ式の区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号明細書、ならびに浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号明細書が挙げられる。これらの特許は参照により本明細書中に援用される。多数の他のかかるインプラント、送達システムおよびモジュールは当業者に公知である。

【0289】

特定の実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体を調合し、インビボで適切な分布を保証することが可能である。例えば、血液脳関門(BBB)は多数の親水性の高い化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBを通過することを保証するため(必要に応じて)、それらを例えばリボソームの形で調合してもよい。リボソームを製造するための方法としては、例えば米国特許第4,522,811号明細書；米国特許第5,374,548号明細書；および米国特許第5,399,331号明細書を参照のこと。リボソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送される1つ以上の部分を含むことから、標的化された薬物送達を促進しうる(例えば、ラナーデ(Ranade)、J. Clin. Pharmacol. 29:685頁(1989年)を参照)。典型的な標的化部分として、葉酸塩またはピオチン(例えば、ロウ(Low)らに交付された米国特許第5,416,016号明細書を参照)；マンノシド(ウメザワ(Umezawa)ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038頁(1988年))；抗体(ブロエマン(Blöeman)ら、FEBS Lett. 357:140頁(199

10

20

30

40

50

5年) ; オワイス (O w a i s) ら、 A n t i m i c r o b . A g e n t s C h e m o t h e r . 3 9 : 1 8 0 頁 (1 9 9 5 年) ; 界面活性剤のプロテインA受容体 (ブリスコエ (B r i s c o e) ら、 A m . J . P h y s i o l . 1 2 3 3 : 1 3 4 頁 (1 9 9 5 年)) ; シュライアー (S c h r e i e r) ら、 J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 9 0 9 0 頁 (1 9 9 4 年) ; ケイナネン (K e i n a n e n) およびラウッカネン (L a u k k a n e n) F E B S L e t t . 3 4 6 : 1 2 3 頁 (1 9 9 4 年) も参照 ; キリオン (K i l l i o n) およびフィドラー (F i d l e r) I m m u n o m e t h o d s 4 : 2 7 3 頁 (1 9 9 4 年) が挙げられる。

【 0 2 9 0 】

本発明の使用および方法

本発明の抗体、特にヒト抗体、抗体組成物および方法は、 B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 媒介性の障害の診断および治療を含む、多数のインビトロおよびインビボでの診断的および治療的有用性を有する。例えば、これらの分子を、インビトロまたは生体外で培地内の細胞にまたは例えばインビボでヒト対象に投与し、種々の障害を治療し、予防し、かつ診断してもよい。本明細書で用いられる「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むように意図されている。「非ヒト動物」という用語は、あらゆる脊椎動物、例えば哺乳類および非哺乳類、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類および爬虫類を含む。好ましい対象は、 B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 活性に媒介される障害を有するヒト患者を含む。方法は、 B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 の発現または機能に媒介される障害を有するヒト患者の治療に特に適する。 B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 に対する抗体が別の作用物質とともに投与される場合、その2つは順次投与または同時投与のいずれであってもよい。

【 0 2 9 1 】

B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 に対する本発明の抗体の特異的結合を仮定すると、本発明の抗体を用い、 B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 の細胞および組織による発現が特異的に検出可能であり、さらに同抗体を用い、免疫親和性精製により B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 が精製可能である。

【 0 2 9 2 】

上記のように、 B M P 2、 B M P 4、 B M P R 1 A、 B M P R 1 B、 A C T R 1、 および / または B M P R 2 は、炎症および異常な骨形成および骨化を含む種々の疾患に関連する。これらの疾患は、共に脊髄炎症、有意な疼痛、および機能障害によって特徴づけられる脊椎関節炎 (S p A) 疾患を含む。 S p A 疾患は、例えば、強直性脊椎炎、乾癬性脊椎関節炎、反応性脊椎関節炎、炎症性腸疾患を伴う脊椎関節炎、および未分化型脊椎関節炎を含む。特に、本発明の抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、 および / または抗 - B M P R 2 抗体は、典型的には通常は仙腸骨炎および付着部炎が原因の炎症性の背痛で特徴づけられる強直性脊椎炎 (A S)、他の脊椎関節症、および関連の炎症性リウマチ性疾患の治療において有効である可能性がある。したがって、本発明は、上記の疾患を治療する方法であって、本明細書中に開示されるモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む方法を包含する。

【 0 2 9 3 】

多数の A S 患者に対する治療の現行基準は T N F 遮断を含む。 T N F 遮断を用いる治療によると、おそらくは疾患病理に寄与する慢性炎症を低減することによる疾患の徴候の低減に有効であることが示されている。しかし、 T N F ブロッカーの長期使用後に負の結果が生じる。これらは、例えば、結核、アレルギー反応、および貧血などの血液障害の発生率の増加を含む。さらに、 T N F 遮断は鬱血性心不全を有する場合には禁忌で

ある。

【0294】

TNF 遮断治療に伴う困難を克服するために、本発明の抗体をASの治療のためにTNF 遮断と併用してもよい。1つ以上の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体とTNF 遮断の併用は、疾患の進行に対して治療または予防をもたらす2つの治療法の間の相乗効果が得られうる点で有利である。実際、TNF 遮断の量または頻度は、本発明の抗体と併用する場合に低減可能である。この併用療法により、長期のTNF 遮断における負の影響の一部が軽減される。一旦軟骨内の原基(anlagen)が誘発されると、炎症の抑止が異所性骨形成の阻害において無効であることが報告されている(カプラン(Kaplan)ら、J. of Bone and Joint Surgery 2007年89:347-357頁)。したがって、1つ以上の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体を例えばTNF 遮断などの苦痛緩和と併用することで、それがAS疾患の進行の治療または予防およびその徴候の改善において有効であることが実証される可能性がある。

10

【0295】

抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体を追加的に用い、進行性骨化性線維形成異常症(FOP)(カン(Kan)ら、Am. J. Path. 165(4):1107-15頁(2004年))、進行性骨異形成症(POH)、脊髄損傷、筋肉内血腫、整形手術をもたらす鈍的外傷、乾癬性関節炎、変形性関節症、強直性脊椎炎、血清反応陰性関節症、骨格骨化過剰症(hyperostosis)、耳硬化症、あぶみ骨強直症、骨肉腫、前立腺癌および外骨腫、アテローム硬化症、弁膜性心疾患、ならびに術後再癒合症(resynostosis)を含む異常な骨形成または骨化を伴う他の疾患および病状が治療される。

20

【0296】

時として異所性骨形成を伴う病状は、正常な骨における骨低下または骨溶解も含む。したがって、本発明は、限定はされないが、ビスホスホネート、PTH阻害剤、RANKLの直接および間接阻害剤、ならびに他の骨吸収因子、例えばMCSFの阻害剤を含む骨再吸収の阻害剤と併用される1つ以上の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体による、異所性骨形成を有する患者の治療を含む(国際公開第2005/068503号パンフレットを参照、その内容は参照により本明細書中に明示的に援用される)。

30

【0297】

BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2は、骨肉腫、前立腺癌、肺癌、メラノーマおよび他の造血癌、ならびに乳癌を含む種々のヒト癌内でも発現される。1つ以上の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体を単独で用いて、癌性腫瘍の成長または転移を阻害してもよい。あるいは、1つ以上の抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2抗体は、本明細書中に記載の他の免疫原性物質、標準の癌治療薬または他の抗体と併用可能である。

40

【0298】

成長または転移が本発明の抗体を用いて阻害されうる好ましい癌は、典型的には免疫療法に応答性がある癌を含む。治療にとって好ましい癌の非限定例として、乳癌(例えば乳腺細胞癌)、卵巣癌(例えば卵巣細胞癌)、脳腫瘍、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病を含む慢性または急性白血病、リンパ腫(例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫、T細胞リンパ腫)ならびに鼻咽頭癌が挙げられる。本発明の方法を用いて治療可能な他の癌の例として、メラノーマ(例えば転移性の悪性メラノーマ)、前立腺癌、大腸癌、肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内の悪性メラノーマ、子宮癌

50

、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、腎癌、睾丸癌、子宮癌、ファロピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、乳腺癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児固形腫瘍、膀胱癌、腎臓癌または尿管癌、乳房・骨盤 (breast pelvis) の癌、中枢神経系 (CNS) の腫瘍、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カボジ肉腫、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、例えば中皮腫などのアスベストにより誘発される癌を含む環境誘発性の癌、ならびに前記癌の組み合わせが挙げられる。

【0299】

さらに、様々な腫瘍細胞上での BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 の発現を仮定すると、本発明のヒト抗体、抗体組成物および方法を用い、発癌性疾患、例えば、乳癌 (例えば、乳腺細胞癌)、卵巣癌 (例えば卵巣細胞癌)、グリア芽腫、脳腫瘍、上咽頭癌、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、パーキットリンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL)、多発性骨髄腫、皮膚 T 細胞リンパ腫、結節性小切れ込み核細胞リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T 細胞白血病 / リンパ腫 (ATLL)、成人 T 細胞白血病 (T-ALL)、中心芽細胞性 / 中心細胞性 (cb / cc) 濾胞性リンパ腫癌、B 細胞系のびまん性大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症 (AILD) 様 T 細胞リンパ腫、HIV 関連の体腔に基づくリンパ腫 (HIV associated body cavity based lymphomas)、胎生期癌、鼻咽頭の未分化癌 (例えばシュミンケ (Schmincke's) 腫瘍)、キャッスルマン病、カボジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリンミア (Waldenström's macroglobulinemia) および他の B 細胞リンパ腫を含む、例えば BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 を発現する腫瘍細胞の存在により特徴づけられる疾患を有する対象が治療されうる。

【0300】

したがって、一実施形態では、本発明は、対象における腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、対象に治療有効量の抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体またはその抗原結合部分を投与する工程を含む方法を提供する。典型的には、抗体はヒト抗体である。さらにまたはその他として、抗体は、キメラまたはヒト化抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体でありうる。

【0301】

一実施形態では、本発明の抗体 (例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性および二重特異性分子および組成物) を用いて、BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 のレベル、あるいは BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 を膜表面上に有する細胞のレベルが検出可能であり、ここでのレベルは特定の疾患徴候に関連しうる。あるいは、抗体を用いて、BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 の、特定の疾患徴候の予防または改善に同じく関連し得り、それにより BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 は、疾患のメディエーターとして関与している機能が阻害または遮断可能である。これは、実験試料および対照試料と抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体とを、抗体と BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 との間の複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより行われうる。抗体と BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、および / または BMP R 2 との間に形成される任意の複合体が検出され、実験試料および対照試料において比較される。

10

20

30

40

50

【0302】

別の実施形態では、本発明の抗体（例えばヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性および二重特異性分子および組成物）は、インビトロで治療または診断用途に関連した結合活性について最初に試験されうる。例えば、本発明の組成物は、下記実施例に記載のフローサイトメトリーアッセイを用いて試験されうる。

【0303】

本発明の抗体（例えばヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性および二重特異性分子、免疫複合体および組成物）は、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2関連疾患の治療および診断においてさらなる有用性を有する。例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性または二重特異性分子および免疫複合体を用いて、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2を発現する細胞の成長を阻害しかつ/または同細胞を殺滅するか、BMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2を発現する細胞の食作用またはADCCをヒトエフェクター細胞の存在下で媒介するか、あるいはBMP2および/またはBMP4のBMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2に対する結合を遮断するという生物学的活性のうちの1つ以上をインビボまたはインビトロで誘発することができる。

10

【0304】

本発明の抗体組成物（例えばヒトモノクローナル抗体、ヒト化抗体、多重特異性および二重特異性分子および免疫複合体）をインビボおよびインビトロで投与する適切な経路は当該技術分野で周知であり、当業者により選択されうる。例えば、抗体組成物を注射（例えば静脈内または皮下）により投与してもよい。用いられる分子の適切な用量は、対象の年齢および体重ならびに抗体組成物の濃度および/または調合に依存すると考えられる。

20

【0305】

上記のように、本発明のヒト抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体を、1つもしくは他の複数の治療物質、例えば細胞毒性物質、放射性毒性物質（radio toxic agent）または免疫抑制剤と同時投与してもよい。抗体を、（免疫複合体としての）作用物質に連結するかまたは作用物質とは別々に投与してもよい。後者（別々の投与）の場合、作用物質の前、後またはそれと同時に抗体を投与するか、または他の公知の治療、例えば抗癌治療、例えば放射線と併せて同時投与してもよい。かかる治療物質は、特にドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチンブレオマイシン硫酸塩、カルムスチン、クロラムブシルおよびシクロホスファミドヒドロキシウレア（cyclophosphamide hydroxyurea）などの抗悪性腫瘍薬を含み、それら単独では患者に対して毒性または亜毒性のレベルでのみ有効である。シスプラチンは、4週ごとに1回、100mg/kg用量で静脈内投与され、アドリアマイシンは、21日ごとに1回、60-75mg用量で静脈内投与される。本発明のヒト抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/もしくは抗-BMPR2抗体またはそれらの抗原結合断片と化学療法剤の同時投与は、ヒト腫瘍細胞に細胞毒性効果をもたらす異なる機序を介して作用する2つの抗癌剤を提供する。かかる同時投与は、抗体に反応しなくなる薬剤に対する耐性または腫瘍細胞の抗原性における変化が生じることによる問題を解決しうる。

30

40

【0306】

標的特異的なエフェクター細胞、例えば本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）に連結したエフェクター細胞は、治療物質としても用いられうる。標的化のためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球または単球などのヒト白血球でありうる。他の細胞は、好酸球、ナチュラルキラー細胞および他のIgG-もしくはIgA-受容体担持細胞を含む。必要に応じ、エフェクター細胞を試験されるべき対象から得てもよい。標的特異的なエフェクター細胞を生理学的に許容できる溶液中の細胞の懸濁液として投与してもよい。投与される細胞の数は 10^8 - 10^9 程度でありうるが、

50

治療目的に応じて変化すると考えられる。一般に、量は、標的細胞、例えばBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2を発現する腫瘍細胞での局在化を得るため、および例えば食作用による細胞死をもたらすために十分な量であると考えられる。投与経路もまた変化しうる。

【0307】

標的特異的なエフェクター細胞による治療を標的化細胞を除去するための他の技術と併せて行ってもよい。例えば、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）および/またはこれらの組成物が備えられたエフェクター細胞を用いる抗腫瘍療法を化学療法と併用してもよい。さらに、併用免疫療法を用い、2つの異なる細胞毒性のあるエフェクター集団を指令し、腫瘍細胞を拒絶することが可能である。例えば、抗-FcR または抗-CD3に連結された抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2抗体は、IgG-またはIgA-受容体に特異的な結合剤と併用可能である。

10

【0308】

本発明の二重特異性および多重特異性分子を用い、エフェクター細胞上のFcRまたはFcRレベルの、例えば細胞表面上の受容体のキャッピングおよび除去による調節も可能である。抗-Fc受容体の混合物もこの目的で用いられうる。

【0309】

補体結合部位、例えば補体に結合するIgG1、IgG2、IgG3、またはIgM由来の部分をも有する本発明の組成物（例えばヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、多重特異性および二重特異性分子および免疫複合体）も補体の存在下で用いられうる。一実施形態では、本発明の結合剤および適切なエフェクター細胞による標的細胞を含む細胞の集団の生体外治療は、補体または補体を含有する血清の添加により補完されうる。本発明の結合剤でコートされた標的細胞の食作用は、補体タンパク質の結合により増進されうる。別の実施形態では、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）でコートされた標的細胞も補体により溶解されうる。さらに別の実施形態では、本発明の組成物は補体を活性化することがない。

20

【0310】

本発明の組成物（例えばヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、多重特異性および二重特異性分子および免疫複合体）はまた、補体とともに投与可能である。したがって、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性または二重特異性分子、および血清または補体を含有する組成物は、本発明の範囲内に含まれる。これらの組成物は、補体がヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子の近接位置に存在する点で有利である。あるいは、本発明のヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子と補体または血清とを別々に投与してもよい。

30

【0311】

本発明の抗体組成物（例えば、ヒト抗体、二重特異性または多重特異性分子または免疫複合体）および使用説明書を含むキットも本発明の範囲内に含まれる。キットは、1つ以上の追加試薬、例えば免疫抑制試薬、細胞毒性物質または放射性毒性物質あるいは1つ以上の追加の本発明のヒト抗体（例えば、第1のヒト抗体とは異なる、異なるBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2抗原内のエピトープに対して結合する相補活性を有するヒト抗体）をさらに含む。

40

【0312】

したがって、本発明の抗体組成物で治療される患者に、別の治療物質、例えばヒト抗体の治療効果を促進または増強する細胞毒性物質または放射性毒性物質を（本発明のヒト抗体の投与の前、投与と同時にまたは投与後に）さらに投与してもよい。

【0313】

他の実施形態では、対象をさらに、FcまたはFc受容体の発現または活性を調節する、例えば促進または阻害する作用物質で治療する、例えば対象をサイトカインで治療することが可能である。多重特異性分子による治療の間の投与に好ましいサイトカインは、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（

50

G M - C S F)、インターフェロン - (I F N -) および腫瘍壊死因子 (T N F) を含む。

【 0 3 1 4 】

本発明の組成物 (例えばヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性および二重特異性分子) を用い、 F c R、または B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 のうちの 1 つ以上を発現する細胞を、例えばかかる細胞を標識する目的で標的にすることも可能である。かかる使用においては、結合剤を検出可能な分子に連結してもよい。したがって、本発明は、F c 受容体、例えば F c R、および / または B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 のうちの 1 つ以上を発現する細胞を生体外またはインビトロで局在化するための方法を提供する。検出可能な標識は、例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素共同因子でありうる。

10

【 0 3 1 5 】

特定の実施形態では、本発明は、試料中の B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 抗原の存在を検出するか、または B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 抗原の量を測定するための方法であって、試料および対照試料と、抗体もしくはその一部と B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 との複合体の形成を可能にする条件下で、B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とを接触させる工程を含む方法を提供する。次いで、複合体の形成が検出され、ここで対照試料と比べた試料間での複合体形成の差は試料中での B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 抗原の存在を示す。

20

【 0 3 1 6 】

さらに別の実施形態では、本発明の免疫複合体を用い、化合物 (例えば治療物質、標識、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剤など) を、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 細胞表面受容体を有する細胞に対し、かかる化合物を抗体に連結することによって標的にすることが可能である。例えば、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 抗体は、米国特許第 6, 989, 452 号明細書、米国特許出願第 10 / 160, 972 号明細書、米国特許出願第 10 / 161, 234 号明細書、米国特許出願第 11 / 134, 826 号明細書、米国特許出願第 11 / 134, 685 号明細書、および米国仮特許出願第 60 / 720, 499 号明細書に記載の U P T、ならびに / あるいは米国特許第 6, 281, 354 号明細書および米国特許第 6, 548, 530 号明細書、米国特許公開第 20030050331 号明細書、米国特許公開第 20030064984 号明細書、米国特許公開第 20030073852 号明細書および米国特許公開第 20040087497 号明細書に記載されるかまたは国際公開第 03 / 022806 号パンフレットに公表された毒素化合物のいずれかに複合される (これらはそれら全体が参照により本明細書中に援用される)。したがって、本発明は、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 を発現する細胞を (例えば検出可能な標識、例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素共同因子を用いて) 生体外またはインビボで局在化するための方法も提供する。あるいは、免疫複合体を用いて、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 細胞表面受容体を有する細胞を、細胞毒素または放射性毒素を B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 に対して標的化することにより殺滅することが可能である。

30

40

【 0 3 1 7 】

本発明は以下の実施例によりさらに例示され、実施例はさらに限定するものとして解釈されるべきでない。本願を通して言及されるあらゆる図面およびあらゆる参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、参照により本明細書中に明示的に援用される。

50

【0318】

実施例

実施例 1

BMP 2、BMP 4、BMPR 1 A、BMPR 1 B、ACTR 1、およびBMPR 2 に対するヒトモノクローナル抗体の産生

本実施例は、ヒトBMP 2、BMP 4、BMPR 1 A、BMPR 1 B、ACTR 1、およびBMPR 2 に対して特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を産生するための方法を開示する。

【0319】

抗原

マウスを組換えヒトBMP 2、BMP 4、BMPR 1 A、BMPR 1 B、ACTR 1、および/またはBMPR 2 で免疫する。特に、マウスを市販の組換えヒトBMP 2 またはBMP 4 で免疫した。ヒト組換えBMP - 2 をR&Dシステムズ社(R&D Systems, Inc.) (カタログ番号355-BM/CF、ロット-MSA10605H) またはメドトロニック(Medtronic, Inc.) (ロット-M115006AAJ) から入手した。ヒト組換えBMP 4 をR&Dシステムズ社(R&D Systems, Inc.) (カタログ番号31-BP/CF、ロット-BEM186051およびBEM316071およびMSA10605H) から入手した。製造業者の使用説明書に従い、凍結乾燥された抗原を再構成し、-20 で保存した。

【0320】

トランスジェニックHuMAbマウス(登録商標)およびKMマウス(登録商標)

BMP 2、BMP 4、BMPR 1 A、BMPR 1 B、ACTR 1、およびBMPR 2 に対する完全ヒトモノクローナル抗体は、HuMAbトランスジェニックマウスまたはKMトランスジェニックマウスのHC o 7、HC o 12 およびHC o 17 株を用いて調製可能であり、これらはヒト抗体遺伝子を発現する。これらのマウス株では、内因性マウスカッパ軽鎖遺伝子はチェン(Chen)ら(1993年)EMBO J. 12: 811-820 頁に記載のようにホモ接合性に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子はPCT国際公開公報第01/09187号パンフレットの実施例1に記載のようにホモ接合的に破壊されている。さらに、このマウス株は、フィッシュワイルド(Fishwild)らNature Biotechnology 14: 845-851 頁(1996年)に記載のヒトカッパ軽鎖トランス遺伝子KC o 5 と、PCT国際公開公報第01/09187号パンフレットの実施例2に記載のヒト重鎖トランス遺伝子HC o 7、HC o 12 またはHC o 17 を保有する。

【0321】

BMP - 2 およびBMP - 4 に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、トランスジェニックHuMAbマウス(登録商標)のHC o 20:02 {M/K} (Balb) F1 およびHC o 27:04 {M/K} 株およびトランスジェニックトランスクロモゾームマウスのKM株を用いて調製し、ここでそれら各々はヒト抗体遺伝子を発現する。HC o 20:02 {M/K} (Balb) F1 およびHC o 27:04 {M/K} マウスを国際公開公報第2005/058815号パンフレット(その全体が参照により本明細書中に援用される)に記載のように作成した。KM株を国際公開公報第02/43478号パンフレット(その全体が参照により本明細書中に援用される)に記載のように作成した。

【0322】

HuMAbマウス(登録商標)およびKMマウス(登録商標)の免疫

ヒトBMP 2 およびBMP 4 に対する完全ヒトモノクローナル抗体を産生するため、HuMAbマウス(登録商標)およびKMマウス(登録商標)のマウスをヒト組換え体BMP 2 またはBMP 4 のいずれかで免疫した。HuMAbマウス(登録商標)における一般的免疫スキームは、ロンバーグ N. (Lonberg N.) ら(1994年)Nature 368(6474): 856-859 頁; フィッシュワイルド D. (Fishwild D.) ら(1996年)Nature Biotechnology 14:

845 - 851 頁および P C T 国際公開公報第 98 / 24884 号パンフレットに記載されている。マウスは抗原の 1 回目の注入時に 6 ~ 16 週齢であった。組換え B M P 2 または B M P 4 の精製調製物 (10 ~ 15 μ g) を用い、H u M a b マウス (登録商標) および K M マウス (登録商標) の各々を免疫した。

【 0323 】

トランスジェニックマウスを、最大で 12 回の免疫を 1 週間間隔で、腹腔内および皮下にまたは足蹠を介し、リビ (R i b i) アジュバント中で乳化された抗原で免疫した。さらに、B 細胞融合のために選択したマウスを、脾臓切除の 3 日前とさらに 1 日前、抗原で静脈内および腹腔内に免疫した。免疫応答を後眼窩の出血により監視した。血漿を E L I S A (下記) によってスクリーニングし、抗 - B M P 2 および B M P 4 ヒト免疫グロブリンの十分な力価を有したマウスを融合に用いた。マウスを、屠殺および脾臓の除去の 3 日前および 1 日前、抗原で静脈内に追加免疫した。4 通りの融合を行い、全部でマウス 33 匹を免疫した。

10

【 0324 】

抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および抗 - B M P R 2 抗体を産生する H u M a b マウス (登録商標) または K M マウス (登録商標) の選択

B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 に結合する抗体を産生する H u M a b マウス (商標) または K M マウス (商標) を選択するため、免疫されたマウス由来の血清を、フィッシュワイルド (F i s h w i l d) ら (1996 年)、上記に記載のように、マイクロタイタープレートに吸着された精製抗原を用い、E L I S A によりスクリーニングする。

20

【 0325 】

特に、マイクロタイタープレートを、50 μ l / ウェルの P B S 中の 1 ~ 2 μ g / m l の精製された組換え B M P 2 または B M P 4 でコートし、周囲温度で一晩インキュベートし、P B S / トウイン (0 . 05 %) で 4 回洗浄し、次いで 0 . 5 % ウシ血清アルブミン (B S A) を補充した 200 μ l / ウェルの P B S / トウイン (0 . 05 %) でブロッキングした。B M P 2 または B M P 4 での免疫マウス由来の血漿の希釈物を各ウェルに添加し、周囲温度で 1 ~ 2 時間インキュベートした。プレートを P B S / トウイン (0 . 05 %) で洗浄し、次いで西洋わさびペルオキシダーゼ (H R P) と複合したヤギ - 抗 - ヒト I g G F c に特異的なポリクローナル抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、プレートを A B T S 基質で発色させ (モス社 (M o s s , I n c .)、カタログ番号 A B T S - 1000)、分光光度計により O D 415 ~ 495 で分析した。

30

【 0326 】

融合においては最高力価の抗原特異的な抗体を発生するマウスが用いられうる。融合を下記のように行い、ハイブリドーマ上清における抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 の活性について E L I S A により試験する。マイクロタイタープレートに吸着した抗原に結合する抗体は、例えば親 C H O 細胞内ではなく C H O 細胞内の融合タンパク質として発現される。抗体は、フローサイトメトリーにより、組換えヒト抗原を発現する細胞系に結合するが、各抗原を発現しない対照細胞系に結合することのないものとして同定される。抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および抗 - B M P R 2 抗体の結合は、例えば抗原を発現する C H O 細胞を 20 μ g / m l の濃度での目的の抗体とともにインキュベートすることにより評価可能である。細胞を洗浄し、結合を抗 - ヒト I g G A b に複合された F I T C などの標識を用いて検出する。フローサイトメトリー分析を、ファクスキャン (F A C S c a n) フローサイトメトリー (カリフォルニア州サンノゼ (S a n J o s e) のベクトン・ディッキンソン (B e c t o n D i c k i n s o n)) を用いて行う。

40

【 0327 】

B M P 2、B M P 4、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および B M P R 2 に対

50

するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

BMP 2、BMP 4、BMP R 1 A、BMP R 1 B、ACTR 1、およびBMP R 2 に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、例えば下記のプロトコルを用いて生成する。特に、BMP 2で免疫した、HuMa bマウス（登録商標）またはKMマウス（登録商標）から単離したマウス脾細胞を、サイト・パルス（Cyto Pulse）の大型チャンバ式の細胞融合エレクトロポレーター（メリーランド州グレンバーニー（Glen Burnie）のサイト・パルス・サイエンシズ社（Cyto pulse Sciences, Inc.））を用いる電場に基づく電気融合を用いて融合した。次いで、生成されたハイブリドーマにおける抗原特異的な抗体の産生について抗体捕捉E l i s aアッセイを用いてスクリーニングした。免疫マウス由来の脾臓リンパ球の単一の細胞懸濁液を、Ag 8 . 6 5 3 非分泌性のマウス骨髄腫細胞（ATCC、CRL 1 5 8 0）と、サイト・パルス（Cyto Pulse）の大型チャンバ式の細胞融合エレクトロポレーター（メリーランド州グレンバーニー（Glen Burnie）のサイト・パルス・サイエンシズ社（Cyto pulse Sciences, Inc.））を用いる電場に基づく電気融合を用いて融合した。細胞を、平底マイクロタイタープレート内に約 1×10^4 細胞/ウェルでプレーティングした後、10 mMヘプス、0 . 0 5 5 mM 2 -メルカプトエタノールおよび $1 \times \text{HAT}$ （シグマ（Sigma）、CRL P - 7 1 8 5）を補充したDMEM（メディアテック（Mediatech）、CRL 1 0 0 1 3、高濃度のグルコース、L - グルタミンおよびビルビン酸ナトリウムを含む）内に10 %ウシ胎仔血清 3 8 8 D 1（ATCC、CRL TIB - 6 3）条件培地、3 ~ 5 %ハイブリドーマクローニング因子（バイオベリス社（Bioveris, Inc.））を含有する選択培地内で2週間インキュベートした。1 ~ 2週間後、細胞を、HATをHTと置換した培地内で培養した。次いで、各ウェルにおけるヒト抗 - BMP 2またはBMP 4モノクローナルIg G抗体について、ELISA（上記）によりスクリーニングした。大規模にハイブリドーマが増殖したら（10 ~ 14日）、通常10 ~ 14日の後、培地における抗体産生について監視した。抗体を分泌するハイブリドーマをより大きい培養容器内でさらに増幅し、抗原に特異的な抗体の産生について再びスクリーニングした。選択したコロニーを冷凍保存し、限界希釈により1回もしくは2回クローニングした。次いで、安定なサブクローンを冷凍保存し、インビトロで増幅し、さらなる特徴づけのために十分な量の抗体を産生させた。

【0328】

BMP 2で免疫したマウスから、ヒト抗 - BMP 2 / 4 抗体を産生する全部で495のハイブリドーマコロニーを生成させた。クローニングのために35のコロニーを選択し、次いでさらなる分析のために増幅した。35のコロニーの中に、6H4、11F2、12E3、1F6、10F6、10H6、16b7、7D6、8B3、33F7、および15F3ハイブリドーマ細胞系が存在した。

【0329】

実施例 2

ヒトモノクローナル抗体の構造的特徴づけ

本実施例は、BMP 2およびBMP 4に対して特異的に結合するヒトモノクローナル抗体の構造的特徴づけについて開示する。特に、抗 - BMP 2 / 4モノクローナル抗体6H4、11F2、12E3、1F6、10F6、10H6、16b7、7D6、8B3、33F7、および15F3の構造を、本実施例に開示している。

【0330】

実施例1の方法により得られたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードするcDNA配列の各々は、標準のPCR技術を用いて抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACTR 1、および/または抗 - BMP R 2ハイブリドーマから得られ、標準のDNA配列決定技術を用いて配列決定される。

【0331】

6H4、11F2および12E3モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコー

10

20

30

40

50

ドする c D N A 配列の各々は、標準の P C R 技術を用いて 6 H 4、1 1 F 2 および 1 2 E 3 ハイブリドーマから得られ、標準の D N A 配列決定技術を用いて配列決定された。

【 0 3 3 2 】

6 H 4 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の各々は、図 1 A ならびに配列番号 3 1 および 3 7 に示される。6 H 4 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の各々は、図 1 B ならびに配列番号 3 4 および 4 0 に示される。

【 0 3 3 3 】

公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列に対する 6 H 4 重鎖免疫グロブリン配列の比較により、6 H 4 重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 4 - 34$ (配列番号 5 1) 由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系 3 - 1 0 (配列番号 5 2) 由来の D セグメント、およびヒト生殖細胞系 J H 1 (配列番号 5 3) 由来の J_H セグメントが用いられていることが示された。生殖細胞系 $V_H 4 - 34$ 配列に対する 6 H 4 V_H 配列のアラインメントを図 4 に示す。CDR 領域決定のカバト (K a b a t) システムを用いての 6 H 4 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D 3 領域の描写 (各々、図 1 A および 4、ならびに配列番号 1 3、1 6 および 1 9 に示される) が得られた。

【 0 3 3 4 】

公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列に対する 6 H 4 軽鎖免疫グロブリン配列の比較により、6 H 4 軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K L 6$ (配列番号 5 4) 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 J K 2 (配列番号 5 5) 由来の J K セグメントが用いられていることが示された。生殖細胞系 $V_K L 6$ 配列に対する 6 H 4 V_K 配列のアラインメントを図 7 に示す。CDR 領域決定のカバト (K a b a t) システムを用いての 6 H 4 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D 3 領域の描写 (各々、図 1 B および 7、ならびに配列番号 2 2、2 5、および 2 8 に示される) が得られた。

【 0 3 3 5 】

1 1 F 2 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の各々は、図 2 A ならびに配列番号 3 2 および 3 8 に示される。1 1 F 2 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の各々は、図 2 B ならびに配列番号 3 5 および 4 1 に示される。

【 0 3 3 6 】

公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列に対する 1 1 F 2 重鎖免疫グロブリン配列の比較により、6 H 4 重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 4 - 59$ (配列番号 4 3) 由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系 2 - 2 (配列番号 4 5) 由来の D セグメント、およびヒト生殖細胞系 J H 5 b (配列番号 4 6) 由来の J_H セグメントが用いられていることが示された。生殖細胞系 $V_H 4 - 59$ 配列に対する 1 1 F 2 V_H 配列のアラインメントを図 5 に示す。CDR 領域決定のカバト (K a b a t) システムを用いての 1 1 F 2 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D 3 領域の描写 (各々、図 2 A および 5、ならびに配列番号 1 4、1 7 および 2 0 に示される) が得られた。

【 0 3 3 7 】

公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列に対する 1 1 F 2 軽鎖免疫グロブリン配列の比較により、1 1 F 2 軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K A 27$ (配列番号 4 8) 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 J K 4 (配列番号 5 0) 由来の J K セグメントが用いられていることが示された。生殖細胞系 $V_K A 27$ 配列に対する 1 1 F 2 V_K 配列のアラインメントを図 8 に示す。CDR 領域決定のカバト (K a b a t) システムを用いての 1 1 F 2 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D 3 領域の描写 (各々、図 2 B および 8、ならびに配列番号 2 3、2 6、および 2 9 に示される) が得られた。

【 0 3 3 8 】

1 2 E 3 の重鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の各々は、図 3 A ならびに配列番号 3 3 および 3 9 に示される。1 2 E 3 の軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の各々は、図 3 B ならびに配列番号 3 6 および 4 2 に示される。

【 0 3 3 9 】

10

20

30

40

50

公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列に対する 1 2 E 3 重鎖免疫グロブリン配列の比較により、1 2 E 3 重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ (配列番号 44) 由来の V_H セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_H 6 b$ (配列番号 47) 由来の J_H セグメントが用いられていることが示された。生殖細胞系 $V_H 4 - 33$ 配列に対する 1 2 E 3 V_H 配列のアラインメントを図 6 に示す。CDR 領域決定のカバト (Kabat) システムを用いての 1 2 E 3 V_H 配列のさらなる分析により、重鎖 CDR 1、CDR 2 および CD 3 領域の描写 (各々、図 3 A および 6、ならびに配列番号 15、18 および 21 に示される) が得られた。

【0340】

公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列に対する 1 2 E 3 軽鎖免疫グロブリン配列の比較により、1 2 E 3 軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K L 15$ (配列番号 49) 由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系 $J_K 4$ (配列番号 50) 由来の J_K セグメントが用いられていることが示された。生殖細胞系 $V_K L 15$ 配列に対する 1 2 E 3 V_K 配列のアラインメントを図 9 に示す。CDR 領域決定のカバト (Kabat) システムを用いての 1 2 E 3 V_L 配列のさらなる分析により、軽鎖 CDR 1、CDR 2 および CD 3 領域の描写 (各々、図 3 B および 9、ならびに配列番号 24、27、および 30 に示される) が得られた。

【0341】

10 F 6、10 H 6 および 16 b 7 モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードする cDNA 配列の各々は、標準の PCR 技術を用いて 10 F 6、10 H 6 および 16 b 7 ハイブリドーマから得られ、標準の DNA 配列決定技術を用いて配列決定された。10 F 6 および 10 H 6 モノクローナル抗体の重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ (配列番号 44)、 $D_H 6 - 13$ 、および $J_H J_H 4 b$ 遺伝子 (配列番号 88) が用いられている。10 F 6 および 10 H 6 モノクローナル抗体の軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K L 15$ および $J_K J_K 4$ 遺伝子が用いられている。16 B 7 モノクローナル抗体の重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 3 - 33$ 、 $D_H 6 - 13$ 、および $J_H J_H 2$ (配列番号 89) 遺伝子が用いられている。16 B 7 モノクローナル抗体の軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K L 15$ および $J_K J_K 4$ 遺伝子が用いられている。

【0342】

1 F 6 モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードする cDNA 配列は、標準の PCR 技術を用いて 1 F 6 ハイブリドーマから得られ、標準の DNA 配列決定技術を用いて配列決定された。1 F 6 モノクローナル抗体の重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 4 - 59$ 、 $D_H 2 - 2$ 、および $J_H J_H 5 b$ 遺伝子が用いられている。1 F 6 モノクローナル抗体の軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K A 27$ および $J_K J_K 4$ 遺伝子が用いられている。

【0343】

7 D 6、8 B 3、33 F 7、および 15 F 3 モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードする cDNA 配列の各々は、標準の PCR 技術を用いて 7 D 6、8 B 3、33 F 7、および 15 F 3 ハイブリドーマから得られ、標準の DNA 配列決定技術を用いて配列決定された。これらのモノクローナル抗体の重鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_H 1 - 69$ (配列番号 91) および $J_H J_H 3 b$ 遺伝子 (配列番号 90) が用いられている。これらのモノクローナル抗体の軽鎖では、ヒト生殖細胞系 $V_K A 27$ および $J_K J_K 2$ 遺伝子が用いられている。

【0344】

実施例 3

抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACT R 1、および抗 - BMP R 2 モノクローナル抗体の結合特異性の特徴づけ

本実施例は、抗原結合の特異性について試験するための、抗 - BMP 2、抗 - BMP 4、抗 - BMP R 1 A、抗 - BMP R 1 B、抗 - ACT R 1、および / または抗 - BMP R 2 抗体を、ELISA およびウエスタンブロットアッセイにより、免疫精製された抗原に対する結合に関して比較するか、または免疫組織化学を用いて組織内の BMP 2 / 4 に対

10

20

30

40

50

する結合に関して比較するための方法を開示する。

【0345】

組換えHis-タグ化抗原および組換えmyc-タグ化抗原をプレート上に一晚コートし、次いで実施例1に開示された方法によって産生されたヒトモノクローナル抗体に対する結合について試験する。標準ELISA法を実施する。抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACTR1、および/または抗-BMPR2ヒトモノクローナル抗体を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、1:2の段階希釈で減量して力価判定する。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)と複合したヤギ-抗-ヒトIgG(Fcまたはカップ鎖に特異的な)ポリクローナル抗体を二次抗体として用いる。

【0346】

組換えB7H4-Igを、プロテインAを用いるクロマトグラフィーにより、B7H4-Igコンストラクトを形質移入した293T細胞の上清から精製する。ELISAプレートをヒト抗体でコートした後、精製タンパク質を添加し、次いでウサギ抗-B7H4抗血清で検出する。C-9タグを有する組換えペンタ(Penta)-B7H4タンパク質を、2A7親和性カラムを用いるクロマトグラフィーにより、ペンタ-B7H4-C9コンストラクトを形質移入した293T細胞の上清から精製する。ELISAプレートを抗-マウスFc、次いでモノクローナル抗-C9($0.6\mu\text{g}/\text{ml}$)、次いで指定の力価判定したペンタ-B7H4、次いで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でのヒトモノクローナル抗体でコートする。抗-マウスFc、次いでM-抗-C9($0.6\mu\text{g}/\text{ml}$)、次いで力価判定したペンタ-BMP2、ペンタ-BMP4、ペンタ-BMPR1A、ペンタ-BMPR1B、ペンタ-ACTR1、および/またはペンタ-BMPR2、次いで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でのヒトモノクローナル抗体でコートする。

【0347】

抗-BMP2/4抗体の還元および非還元条件下でのBMP2に対する結合についてウエスタンブロットアッセイにより特徴づけた。組換えヒトBMP2タンパク質(メドトロニック(Medtronic)) $0.5\mu\text{g}$ を還元剤の存在下または非存在下で試料緩衝液(Cell Signaling、カタログ番号SB7722)に直接希釈した。試料を3分間、 100° に加熱してタンパク質を変性した後、電気泳動およびウエスタンブロットを行った。膜結合タンパク質を試験抗体 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ でプローブした後、アルカリホスファターゼと複合したFab2ヤギ抗-ヒトIgG(ジャクソン・イムノリサーチ研究所(Jackson ImmunoResearch Labs)、カタログ番号109-056-09)で検出し、BCIP/NBT(ピラス(Pierce)、カタログ番号34042)で染色した。結果によると、試験したすべてのモノクローナル抗体がBMP2ホモ二量体に対応する約 36kDa で還元されていないバンドを認識することが示される。さらに、モノクローナル抗体の一部(例えば8B3)が還元条件下でBMP2を認識した。BMP単量体に対応する約 $17\sim 18\text{kDa}$ の2つのバンドが現れた。

【0348】

免疫組織化学においては、 $2,000\mu\text{m}$ のマウス組織コアを用いる(イムジェネックス(IMGENEX)ヒスト-アレイ(Histo-Array);カリフォルニア州サンディエゴ(San Diego)のイムジェネックス社(Imagenex Corp.))。30分乾燥後、切片をアセトンで固定し(室温で10分間)、5分間風乾する。スライドをPBSですすぎ、次いでPBS中の10%正常ヤギ血清とともに20分間ブレインキュベート、次いで10%正常ヤギ血清を有するPBS中の $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のFITC化(fitcylated)抗体とともに室温で30分間インキュベートする。次いで、スライドをPBSで3回洗浄し、マウス抗-FITC($10\mu\text{g}/\text{ml}$ ダコ(DAKO))とともに室温で30分間インキュベートする。スライドをPBSで再び洗浄し、ヤギ抗-マウスHRP複合体(ダコ(DAKO))とともに室温で30分間インキュベートする。スライドをPBSでさらに3回洗浄する。ジアミノベンジジン(シグマ(Sigma))を基質として用いる結果、茶色染色が得られる。蒸留水で洗浄後、スライドをヘマトキシリンで1分間対比染色する。次いで、スライドを流れる蒸留水で10秒間洗浄し、グリ

10

20

30

40

50

セルゲル (g l y c e r g e l) (ダコ (D A K O)) に載せる。

【 0 3 4 9 】

抗 - B M P 2 / 4 モノクローナル抗体のサブセットにより認識されたエピトープをビオチンに複合した受容体ペプチドを用いて測定し、ストレプトアビジンチップ (S A チップ (S A c h i p) 、ピアコア (B I A c o r e)) により捕捉し、ピアコア (B I A c o r e) で分析した。抗体をチップに対して 4 0 u g / m l で通流した。8 B 3 および 7 D 6 抗体が、B M P 2 タイプ 2 受容体に結合する B M P 2 エピトープ (I S M L Y L D E N E K V V L K) (配列番号 9 2) に結合した。1 2 E 3 、 1 1 F 2 および 1 6 B 7 抗体が、ヘパリンに結合する B M P 2 エピトープ (Q A K H K Q R K R L K S S C K R H) (配列番号 9 3) に結合した。さらに、抗 - B M P 2 / 4 ヒトモノクローナル抗体 3 3 F 7 (配列番号 6 3 および 7 1) が B M P 2 / 4 とヘパリンの間の相互作用を遮断した。このことは B M P 2 / 4 の機能を遮断する。

10

【 0 3 5 0 】

実施例 4

抗 - B M P 2 、抗 - B M P 4 、抗 - B M P R 1 A 、抗 - B M P R 1 B 、抗 - A C T R 1 、および / または抗 - B M P R 2 抗体の、軟骨細胞系の表面上に発現される各抗原に対する結合の特徴づけ

本実施例は、抗 - B M P 2 、抗 - B M P 4 、抗 - B M P R 1 A 、抗 - B M P R 1 B 、抗 - A C T R 1 、および / または抗 - B M P R 2 抗体の、C H O - 抗原トランスフェクタントならびに B M P 2 、B M P 4 、B M P R 1 A 、B M P R 1 B 、A C T R 1 、および / または B M P R 2 を細胞表面上に発現する軟骨細胞に対する結合について試験するためのフローサイトメトリー法を開示する。

20

【 0 3 5 1 】

B M P 2 、B M P 4 、B M P R 1 A 、B M P R 1 B 、A C T R 1 、および / または B M P R 2 を形質移入した C H O 細胞系ならびに軟骨細胞系 A T D C 5 (リケン・バイオソース (R I K E N B i o s o u r c e) 、R C B 0 5 6 5) または線維芽細胞系 M C 3 T 3 (A T C C アクセション番号 C R L - 2 5 9 5 、C R L - 2 5 9 6 、C R L - 2 5 9 4 および C R L - 2 5 9 3) における抗体結合について試験する。細胞を洗浄し、結合を F I T C で標識された抗 - ヒト I g G A b を用いて検出する。ファクスキャン (F A C S c a n) フローサイトメトリー (カリフォルニア州サンノゼ (S a n J o s e) のベクトン・ディッキンソン (B e c t o n D i c k i n s o n)) を用い、フローサイトメトリー分析を行う。

30

【 0 3 5 2 】

実施例 5

抗 - B M P 2 、抗 - B M P 4 、抗 - B M P R 1 A 、抗 - B M P R 1 B 、抗 - A C T R 1 、および / または抗 - B M P R 2 モノクローナル抗体の結合親和性の分析

本実施例は、モノクローナル抗体における B M P 2 、B M P 4 、B M P R 1 A 、B M P R 1 B 、A C T R 1 、および / または B M P R 2 に対する特異的な結合親和性について試験するための方法を開示する。

40

【 0 3 5 3 】

一方法では、H E K 細胞に完全長 B M P 2 、B M P 4 、B M P R 1 A 、B M P R 1 B 、A C T R 1 、および / または B M P R 2 を、標準技術を用いて形質移入し、それを 1 0 % ウシ胎仔血清 (F B S) を含有する R P M I 培地内で成長させる。細胞をトリプシン処理し、トリスベースの結合緩衝液 (2 4 m M トリス p H 7 . 2 、1 3 7 m M N a C l 、2 . 7 m M K C l 、2 m M グルコース、1 m M C a C l ₂ 、1 m M M g C l ₂ 、0 . 1 % B S A) で 1 回洗浄し、結合緩衝液中で 2×10^6 細胞 / m l に調節する。ミリポア (M i l l i p o r e) プレート (M A F B N O B) を水中、1 % 脱脂粉乳でコートし、4 で一晩保存する。プレートを結合緩衝液 0 . 2 m l で 3 回洗浄する。緩衝液 5 0 μ l のみを最大結合ウェルに添加する (全結合) 。緩衝液 2 5 μ l のみを対照ウェルに添加する (非特異的結合) 。様々な濃度の ^{1 2 5}I - 抗体を 2 5 μ l の容量の全ウェル

50

に添加する。100倍超での様々な濃度の未標識抗体を25 μ lの容量で対照ウェルに添加し、結合緩衝液中のCHO細胞(2 \times 10⁶細胞/ml)を形質移入したBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACTR1、および/またはBMPR2の25 μ lを全ウェルに添加する。プレートを、4、振とう器上、200RPMで2時間インキュベートする。インキュベーション後、ミリポア(Millipore)プレートを、低温の洗浄用緩衝液(24mMトリス pH7.2、500mM NaCl、2.7mM KCl、2mMグルコース、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% BSA)0.2mlで3回洗浄する。フィルタを取り出し、ガンマカウンターで計数する。平衡結合の評価を、プリズム(Prism)ソフトウェア(カリフォルニア州サンディエゴ(San Diego))を有する単一部位結合パラメータを用いて行う。データをシグモイド用量応答(プリズム(PRISM)(商標))を用いる非線形回帰により分析し、EC50の計算結果を出し、それを用いて抗体におけるEC50および95%CIをランク付けする。

【0354】

別の方法では、抗-BMP2/4モノクローナル抗体の親和性および結合動態についてピアコア(Biacore)分析(スウェーデン、ウップサラ(Uppsala))のピアコアAB(Biacore, AB))により特徴づけた。標準のアミンカップリング化学反応およびピアコア(Biacore)により提供されるキットを用い、抗-BMP-2/4抗体を、第一級アミンを介してCM5チップ(カルボキシメチルデキストランでコートされたチップ)に共有結合された抗ヒトFc抗体を有するチップ上に捕捉した。結合を、HBS-E緩衝液(pH7.4)中にBMP2またはBMP4を10nMの濃度、25 μ l/分の流速で流すことにより測定した。抗原-抗体結合動態を2分間追跡し、解離動態を8分間追跡した。ピアエバリュエーション(BIAevaluation)ソフトウェア(ピアコアAB(Biacore, AB))を用い、結合および解離曲線を1:1ラングミュア(Langmuir)結合モデルに適合させた。決定されたK_d、k_{on}およびk_{off}値を表1に示す。

【0355】

(表1)抗BMP-2および4mAbの結合親和性

BMP-2				BMP-4			
mAb	K _d (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	mAb	K _d (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
1F6	0.02	4.65 \times 10 ⁶	8.49 \times 10 ⁻⁵	1F6	0.0003	4.97 \times 10 ⁶	1.27 \times 10 ⁻⁶
11F2	0.01	2.83 \times 10 ⁶	3.09 \times 10 ⁻⁵	11F2	0.0007	4.53 \times 10 ⁴	3.04 \times 10 ⁻⁸
16B7	0.08	3.70 \times 10 ⁶	2.82 \times 10 ⁻⁴	16B7	0.02	2.86 \times 10 ⁶	6.12 \times 10 ⁻⁵
12E3	0.02	3.39 \times 10 ⁶	8.26 \times 10 ⁻⁵	12E3	0.28	1.75 \times 10 ⁶	4.82 \times 10 ⁻⁴
10F6	0.19	2.04 \times 10 ⁶	3.85 \times 10 ⁻⁴	10F6	0.75	2.61 \times 10 ⁶	1.97 \times 10 ⁻³
6H4	0.10	1.42 \times 10 ⁷	1.98 \times 10 ⁻⁴	6H4	0.30	2.00 \times 10 ⁶	4.97 \times 10 ⁻⁴
7D6	0.28	4.00 \times 10 ⁶	1.14 \times 10 ⁻³	7D6	0.42	2.84 \times 10 ⁶	1.20 \times 10 ⁻³
8B3	0.19	3.02 \times 10 ⁶	5.82 \times 10 ⁻⁴	8B3	0.18	4.69 \times 10 ⁶	8.27 \times 10 ⁻⁴
15F3	0.03	7.96 \times 10 ⁶	2.70 \times 10 ⁻⁴	15F3	0.18	3.14 \times 10 ⁶	5.60 \times 10 ⁻⁴
33F7	0.12	5.71 \times 10 ⁶	6.54 \times 10 ⁻⁴	33F7	0.38	3.65 \times 10 ⁶	1.40 \times 10 ⁻³

【0356】

実施例6

一群のBMPとの抗-BMP2/4モノクローナル抗体の交差反応性

抗-BMP2/4モノクローナル抗体のBMPファミリーとの交差反応性を、そのBMP-3、5、6、7および8bならびにGDF-5および7との結合親和性をピアコア(Biacore)分析によって測定することにより特徴づけた。標準のアミンカップリング化学反応およびピアコア(Biacore)により提供されるキットを用い、BMPお

よび G D F を C M 5 チップ（カルボキシメチルデキストランでコートされたチップ）に第一級アミンを介して共有結合させた。結合を、抗体を H B S - E P 緩衝液（p H 7 . 4）中に 2 0 u g / m l の濃度、2 0 μ l / 分の流速で流すことにより測定した。抗原 - 抗体結合動態を 4 分間追跡し、解離動態を 6 分間追跡した。ピアエバリュエーション（B I A e v a l u a t i o n）ソフトウェア（ピアコア A B（B i a c o r e , A B））を用い、結合および解離曲線を 1 : 1 ラングミュア（L a n g m u i r）結合モデルに適合させた。決定された K_d 値を表 2 に示す。

【 0 3 5 7 】

（表 2）一群のファミリーメンバーに対する抗 B M P - 2 および 4 ヒトモノクローナル抗体の交差反応性

	BMP2	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	BMP8b	BMP3	GDF5	GDF7
1F6	0.7	1.0	124	85800	71.7	なし	なし	17.7	8.8
11F2	0.6	0.4	26.3	77.0	20.0	なし	104	16.3	3.5
16B7	0.5	0.5	18.1	30.0	8.9	なし	なし	80.0	2.8
12E3	1.4	2.2	132	なし	106	なし	なし	なし	なし
10F6	17.5	76	20.1	103	18.8	195	なし	なし	なし
6H4	3.7	104	5.9	40.3	1.1	159	246	0.8	1.1
7D6	4.6	7.7	なし	なし	なし	なし	なし	493	1810
8B3	4.7	11.2	なし	なし	155	なし	なし	90.8	57.5
15F3	4.6	12.0	289	なし	79900	なし	なし	64.8	57.7
33F7	4.3	271	なし	なし	579.0	なし	なし	なし	なし

【 0 3 5 8 】

実施例 7

B M P 受容体タイプ I および I I の遮断

抗 - B M P 2 / 4 モノクローナル抗体の、タイプ I およびタイプ I I B M P 受容体（ミネソタ州ミネアポリス（M i n n e a p o l i s）の R & D システムズ（R & D s y s t e m s））に対する B M P 4 の結合を遮断する能力をピアコア（B i a c o r e）を用いて測定した。

【 0 3 5 9 】

タイプ - I およびタイプ - I I B M P 受容体の双方を、C M 5 チップ（カルボキシメチルデキストランでコートされたチップ）に、標準のアミンカップリング化学反応およびピアコア（B i a c o r e）により提供されるキットを用い、第一級アミンを介して共有結合させた。抗体 - 抗原複合体の混合物を固定化された受容体に通流させた。抗体濃度を、タイプ I I に対しては 4 0 0 n M から、タイプ I に対しては 2 0 0 n M から 2 倍段階希釈した。B M P 4 濃度は 3 ~ 1 0 n M の間であった。抗体および B M P - 4 を、注射前の少なくとも 1 時間、プレインキュベートした。抗体 - 抗原混合物を 5 μ l / 分の流速で 3 分間注射した。重複エピトープを有する抗体は完全に競合することになる（抗体濃度の増加に伴い応答が低下する）一方、異なるエピトープを有する抗体は抗原に同時に結合することになる（抗体濃度の増加に伴い応答が増大する）。この分析によると、1 F 6、1 1 F 2、1 6 B 7、1 2 E 3、1 0 F 6、6 H 4、7 D 6、8 B 3、1 5 F 3、および 3 3 F 7 の全部が、タイプ I I 受容体に対する B M P の結合を強力な遮断から弱い遮断の範囲で遮断可能であることが示された（図 1 0 a）。さらに、モノクローナル抗体の一部がタイプ I の結合も遮断可能であった一方、それ以外はタイプ I I 受容体の結合に限って遮断した（図 1 0 b）。

【 0 3 6 0 】

モノクローナル抗体はヘパリンに対する B M P 2 の結合を遮断する

抗 - B M P 2 / 4 モノクローナル抗体におけるヘパリン（シグマ（S i g m a））に対する B M P - 2 の結合を遮断する能力をアルファスクリーン（A l p h a S c r e e n）

アッセイ（パートホールド（B e r t h o l d）技術）を用いて測定した。5 n Mの濃度でのビオチン化ヘパリン（シグマ（S i g m a））をストレプトアビジンでコートされたドナービーズ（25 u g / m l）により捕捉し、抗体（5 n M）をプロテインAでコートされたアクセプタービーズを用いて捕捉した。B M P / 2を20 n Mからの2倍段階希釈で力価判定した。抗体がB M P - 2に対するヘパリンの結合を遮断する場合、ヘパリン、B M P 2およびヒトモノクローナル抗体の複合体が形成されることは全くなく、かつシグナルが観察されることは全くない。抗体がB M P 2に対するヘパリンの結合を遮断することがない場合、三重複合体が形成され、かつB M P 2濃度の増加に伴いシグナルが増大することになる。このアッセイでは、33 F 7モノクローナル抗体のみがB M P 2に対するヘパリンの結合を遮断した。33 F 7はヘパリンおよびB M P 2の双方に結合し、さらにヘパリンとB M P 2の間の相互作用を遮断する。

【0361】

実施例8：抗体の安定性

抗 - B M P 2 / 4モノクローナル抗体の熱安定性

抗 - B M P 2 / 4モノクローナル抗体の熱安定性を抗体の融解温度の熱量分析により測定した。融解温度（T_m）の熱量測定を、オートサンプラー（米国マサチューセッツ州ノースアンプトン（N o r t h a m p t o n）のマイクロカルLLC（M i c r o c a l L L C））を併用したV P - C a p i l l a r y D S C示差走査マイクロカロリメータプラットフォーム（d i f f e r e n t i a l s c a n n i n g m i c r o c a l o r i m e t e r p l a t f o r m）上で行った。試料細胞容量は0.144 mLであった。抗体についての変性データを、0.25 mg / m lの濃度、1 / 分の速度、30 ~ 95 °Cでの試料の加熱により得た。抗体試料はpH 7.4でのリン酸緩衝生理食塩水（P B S）中に存在した。同じ緩衝液を参照細胞において用い、比較によりモル熱容量を得た。観察されたサーモグラムをベースライン補正し、正規化データを、ソフトウェア、オリジン（O r i g i n）v 7.0を用い、非二状態モデルに基づいて分析した。表3に示されるように、11 F 2は最も安定な抗 - B M P 2 / 4抗体である。それはその主なピークにおいて最高のT_m値を示す。

【0362】

（表3）抗 - B M P 2 / 4モノクローナル抗体についての示差走査熱量測定データ

	T _m (高)	T _m (低)	T _m (低)
11F2	81	71	
6H4	80	71	
15F3	80	72	
12E3	79	74	
1F6	78	71	85
8B3	75	83	
7D6	74	84	
10F6	73	68	
16B7	72	82	
33F7	72	82	

【0363】

抗 - B M P 2 / 4モノクローナル抗体の化学的安定性

抗 - B M P 2 / 4モノクローナル抗体の安定性を、蛍光分光法によりその化学的変性の中点を測定することにより比較した。化学的変性の蛍光測定を、マイクロマックス（M i c r o m a x）プレートリーダー（ニュージャージー州エジソン（E d i s o n）のスペックス（S P E X））を備えたスペックスフルオロログ（S P E X F l u o r o l o g）3.22上で行った。P B S緩衝液中、16の異なる濃度の塩酸グアニジニウム（g u a n i d i n i u m h y d r o c h l o r i d e）中で20時間平衡化しておいた抗体

試料に対し、測定を行った。測定を黒色、低容量、非結合表面の384-ウェルプレート（マサチューセッツ州アクトン（Action）のコーニング（Corning））内で行い、測定には12 μ Lのウェル容量内に1 μ Mの抗体が必要であった。蛍光を280 nmで励起し、放射スペクトルを300～400 nmで測定した。走査速度は1秒/1 nmであり、スリットを5 nmのバンドパスに設定した。PBSを用いて緩衝液ブランクとし、自動的にデータから差し引いた。データを、グラフパッドプリズム（GraphPad Prism）ソフトウェアを用いて二状態変性モデルに適合させた。表4に示されるように、15F3は最も安定な抗-BMP2/4モノクローナル抗体である。それは最高のアンフォールディング（unfolding）中点を有した。

【0364】

（表4）蛍光分光法により測定された抗BMP-2および4モノクローナル抗体の化学的変性

	アンフォールディング中点(M)
15F3	2.70
10F6	2.66
6H4	2.61
8B3	2.53
1F6	2.47
7D6	2.41
16B7	2.38
12E3	二相

【0365】

実施例9

抗-BMP2/4抗体はBMP細胞のシグナル伝達を遮断する

BMP2/4モノクローナル抗体による細胞のシグナル伝達に対する効果を、C2C12細胞内でのアルカリホスファターゼの発現を観察することによって測定した。BMP2およびBMP4の生物活性に対するモノクローナル抗体の中和能を測定するため、C2C12細胞を、10%ウシ胎仔血清および1 \times ペン/ストレップを含有するDMEM培地内、平底96ウェルプレート内に1ウェル当たり8,000個の細胞の密度でプレーティングし、CO₂下、37°で一晩インキュベートした。翌朝、培地を、モノクローナル抗体を含有する100 μ Lの新しい培地と交換した後、組換えヒトBMP2タンパク質（メドトロニック（Medtronic））またはBMP4タンパク質（R&D、カタログ番号314-BP/CF）を1.6 μ g/mlの濃度で含有する100 μ Lの培地と交換した。プレートをCO₂下、37°で2日間インキュベートした。

【0366】

2日目、細胞透過処理（permeabilization）の方法を用い、細胞のアルカリホスファターゼ活性についてアッセイした。ここでは、培地をウェルから取り出し、細胞を氷冷したアセトン/エタノール溶液（50:50 v/v）100 μ Lで固定した。アセトン/エタノール溶液を直ちに除去し、p-リン酸ニトロフェニル液体基質（シグマ（Sigma）、カタログ番号N7653）100 μ Lと交換した。プレートを室温で、暗下で3分間保持し、反応を、50 μ Lの3N NaOHの各ウェルへの添加により停止した。基質切断の結果、細胞内のアルカリホスファターゼの量に比例する呈色反応が生じる。プレートを、405 nmの波長で、スペクトラMA（SpectraMA） \times 340（モレキュラー・デバイシズ（Molecular Devices））上で読み取った。これらの条件下でのモノクローナル抗体におけるND₅₀は1～5 μ g/mlであった。

【0367】

図11に示されるように、BMP2（図11a）およびBMP4（図11b）によるア

ルカリホスファターゼの発現をBMP2/4モノクローナル抗体により阻害した。したがって、本明細書中に開示される抗体はBMPタンパク質を中和しうる。

【0368】

実施例10

抗-BMP2/4抗体はインビボでBMP2誘発性の異所性骨化を遮断する

本実施例は、抗-BMP2/4モノクローナル抗体がBMP2誘発性の異所性骨形成を遮断することを示す。BMP2は、コラーゲンゲルにより吸収され、かつマウスの後肢に皮下移植される場合、異所性骨形成を誘導する。BMP2は移植部位に軟骨細胞前駆体および血管細胞を動員し、骨形成を開始させる。3週間かけて、コラーゲンゲルは成熟骨と置き換えられた状態になる(ナカムラ Y. (Nakamura Y.)ら J Bone Miner Res. 2003年10月; 18(10): 1854-62頁)。抗-BMP2/4抗体がインビボで異所性骨形成を遮断しうることを示すため、マウスに、BMP2が注入されたコラーゲンゲルを移植した直後、抗-BMP2/4抗体または対照の無関連のIgG(BDファーマーミンゲン(BD Pharmingen)、カタログ番号A6618M)で処置した。

【0369】

吸収可能なコラーゲンスポンジ(ヘリストット(Helistat)(登録商標)ボーン・グラフト(Bone Graft)、インテグラ・ライフ・サイエンス(Integra Life Sciences)カタログ番号1690-ZZ)に96ug/mlのBMP2(メドトロニック(Medtronic)、インフューズ・ボーン・グラフト(Infuse Bone graft))を注入し、各々、0.23グラムの最終重量を有する移植片に切断した。BMP2を注入したコラーゲンスポンジを成体雄C57BL/6マウス36匹の左側および右側後肢に皮下移植した。移植手術においては、標準のプロトコルに従い、マウスをケタミン/キシラジンで麻酔した。右側後肢においては、電気クリッパーを用いて半腱様の筋肉を覆う皮膚の毛をそり、クロルヘキサジンスクラブ(scrub)およびアルコールを用いて準備した。マウスを側臥位に置いた。メスまたはハサミを用い、長骨に沿った皮膚内に0.5cmの切開部を設けた。鈍的切開により皮下移植ポケット(pocket)を用意した。無菌技術を用い、各移植試料(約25ugのBMP2を注入したコラーゲンスポンジ)をポケット内に入れた。左側後肢上への移植について、同じ手順を繰り返した。ステンレス鋼製創傷クリップを用いて創縫合を行った。

【0370】

手術直後、動物を6つの処置群に分け(表5)、1.25mg/mlの濃度の適切な抗体を300ulの単回ボーラス注射で各マウスの腹腔に送達した。群1を無関係の対照IgGで処置した。群2~6をBMP2/4を中和するモノクローナル抗体で処置した(表5)。

【0371】

21日後、移植片および隣接組織を切除し、10%中性緩衝ホルマリン中に入れた。切除した移植片にデンシトメトリー走査を施した(ピキシ(Pixi)、ウィスコンシン州マディソン(Madison)のGELナー(GELunar))。各移植片における骨ミネラル領域(BMA)を表にした。図12に示されるように、全部で5つのモノクローナル抗体が移植片におけるBMP2誘発性の骨形成の阻止において有効であった。

【0372】

(表5)

群	移植 (左側および右側)	mAb	濃度 (単回 IP 用量)	N
1	皮下	対照 IgG	15 mg/Kg	6
2	皮下	12 E3	15 mg/Kg	6
3	皮下	1F6	15 mg/Kg	6
4	皮下	11F2	15 mg/Kg	6
5	皮下	10F6	15 mg/Kg	6
6	皮下	6H4	15 mg/Kg	6

10

【0373】

実施例 11

抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 モノクローナル抗体の内在化

本実施例は、Hum-Zap 内在化アッセイを用いて、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 / 4 ヒトモノクローナル抗体が、B M P R 1 A、B M P R 1 B、A C T R 1、および / または B M P R 2 を発現する C H O 細胞に内在化する能力を試験するための方法を示す。Hum-Zap アッセイでは、毒素サポリンに複合されたヒト I g G に対する親和性を有する二次抗体の結合を通じての一次ヒト抗体の内在化について試験する。

20

【0374】

抗原発現細胞を、100 μ l のウェル内、 1.25×10^4 細胞 / ウェルで一晩播種する。抗原特異的な各ヒトモノクローナル抗体を 10 pM の濃度でウェルに添加する。抗原のいずれかに対して非特異的なアイソタイプ対照抗体を負の対照として用いる。Hum-Zap (カリフォルニア州サンディエゴ (San Diego) のアドバンスド・ターゲティング・システムズ (Advanced Targeting Systems)、IT-22-25) を 11 nM の濃度で添加し、プレートを 72 時間インキュベートしておく。次いで、プレートに ^3H -チミジンの 1.0 μ Ci のパルスで 24 時間かけ、回収し、トップカウント・シンチレーションカウンター (Top Count Scintillation Counter) (コネチカット州メリデン (Meriden) のパックカード・インスツルメンツ (Packard Instruments)) で読み取る。

30

【0375】

抗原を発現する C H O 細胞内のサポリン複合体の内在化活性を、実施例 1 に記載のように産生されたヒトモノクローナル抗体を用い、約 500 pM ~ 1 pM の範囲全体での用量応答で測定する。C H O 親細胞系および Hu I g G - S A P を、バックグラウンド毒性または非特異的な内在化の尺度としての負の対照として用いる。

【0376】

実施例 12

軟骨細胞系に対する、毒素に複合された抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 抗体による細胞殺滅の評価

40

本実施例は、細胞増殖アッセイにおいて、毒素に複合された抗 - B M P 2、抗 - B M P 4、抗 - B M P R 1 A、抗 - B M P R 1 B、抗 - A C T R 1、および / または抗 - B M P R 2 モノクローナル抗体が、抗原を発現する軟骨細胞系を殺滅させる能力について試験するための方法を開示する。

【0377】

実施例 1 の方法により調製した H u M A b 抗体は、リンカー、例えばペプチジル、ヒドラゾンまたはジスルフィドリンカーを介して毒素に複合されうる。抗原を発現する軟骨細胞または骨芽細胞系、例えば A T D C 5 または M C 3 T 3 細胞を、100 μ l ウェル内、

50

約 $1 \sim 3 \times 10^4$ 細胞 / ウェルで 3 時間播種する。抗体 - 毒素複合体を 30 nM の開始濃度でウェルに添加し、 $1 : 3$ の段階希釈で減量して力価判定する。抗原に非特異的なアイソタイプ対照抗体を負の対照として用いる。プレートを 69 時間インキュベートしておく。次いで、プレートに ^3H - チミジンの $1.0 \mu\text{Ci}$ のパルスで 24 時間かけ、回収し、トップカウント・シンチレーションカウンター (Top Count Scintillation Counter) (コネチカット州メリデン (Meriden) のパッカー・インスツルメンツ (Packard Instruments)) で読み取る。細胞死を、抗原を発現する軟骨細胞内での ^3H - チミジンの取り込みにおける抗体 - 毒素濃度依存性の低下により示す。

【0378】

10

実施例 13

抗 - BMP2、抗 - BMP4、抗 - BMPR1A、抗 - BMPR1B、抗 - ACTR1、および / または抗 - BMPR2 抗体の ADCC 活性の評価

本実施例は、蛍光細胞毒性アッセイにおいて、抗 - BMP2、抗 - BMP4、抗 - BMPR1A、抗 - BMPR1B、抗 - ACTR1、および / または抗 - BMPR2 モノクローナル抗体が、抗体依存性細胞毒性 (ADCC) により、エフェクター細胞の存在下で抗原 + 細胞系を殺滅する能力について試験するための方法を開示する。

【0379】

ヒトエフェクター細胞を以下のように全血から調製する。ヒト末梢血単核球を、標準のフィコール - パック (Ficoll - paque) 分離により、ヘパリン化全血から精製する。細胞を 10% FBS および 200 U/ml のヒト IL-2 を含有する RPMI 1640 培地内に再懸濁し、 37°C で一晩インキュベートした。翌日、細胞を回収し、培地内で 4 回洗浄し、 2×10^7 細胞 / ml で再懸濁する。標的抗原 + 細胞を、 1×10^6 の標的細胞 / ml 当たり BATA2.5 μl の BATA 試薬 (マサチューセッツ州ウェルズリー (Wellesley) のパーキン・エルマー (Perkin Elmer)) とともに 37°C で 20 分間インキュベートする。標的細胞を 4 回洗浄し、スピンドウンし、最終容量を 1×10^5 細胞 / ml にする。

20

【0380】

抗原 + 細胞系におけるヒトモノクローナル抗体に対する抗体特異的な ADCC について、以下のデルフィア (Delphia) 蛍光放射分析を用いて試験する。各標的細胞系 (標識された標的細胞 $100 \mu\text{l}$) をエフェクター細胞 $50 \mu\text{l}$ および抗体 $50 \mu\text{l}$ とともにインキュベートする。実験を通して $1 : 50$ の標的対エフェクター比を用いる。すべての試験において、ヒト IgG1 アイソタイプ対照を負の対照として用いる。 2000 rpm のパルス回転および 37°C で 1 時間のインキュベーション後、上清を収集し、再び高速回転し、上清 $20 \mu\text{l}$ を平底プレートに移し、そこに Eu 溶液 (マサチューセッツ州ウェルズリー (Wellesley) のパーキン・エルマー (Perkin Elmer)) $180 \mu\text{l}$ を添加し、ルビースター (Ruby Star) リーダー (BMGLabtech) で読み取る。溶解率 (%) を、 $(\text{試料放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})$ (式中、自然放出は標的細胞のみを含有するウェルからの蛍光であり、かつ最大放出は標的細胞を含有し、 2% トリトン (Triton) - X で処理されているウェルからの蛍光である) に従って計算する。

30

40

【0381】

実施例 14

裸 (Naked) 抗体と細胞毒素と複合された抗 - BMP2、抗 - BMP4、抗 - BMPR1A、抗 - BMPR1B、抗 - ACTR1、および / または抗 - BMPR2 抗体を用いる、インビボでの腫瘍異種移植片モデルの処置

本実施例は、癌腫瘍細胞が移植されたマウスを毒素と複合された抗体でインビボ処置し、腫瘍成長に対する抗体のインビボでの効果を試験するための方法を開示する。

【0382】

標準の検査法を用い、インビトロで癌細胞を増やす。6 ~ 8 週齢の雄 Ncr 胸腺欠損又

50

ードマウス（ニューヨーク州ハドソン（Hudson）のタコニック（Taconic））に、マウス1匹当たりPBS/マトリゲル（1：1）0.2ml中、 7.5×10^6 個の細胞を、右脇腹に皮下移植する。移植後週2回、マウスを秤量し、電子キャリパーを用い、腫瘍を三次元測定する。腫瘍容量を高さ×幅×長さで計算する。平均110～270mm³の腫瘍を有するマウスを処置群にランダム化する。0日目、マウスに対し、PBS、ビヒクル、毒素と複合されたアイソタイプ対照抗体、または毒素と複合された抗-BMP2、抗-BMP4、抗-BMPR1A、抗-BMPR1B、抗-ACR1、および/または抗-BMPR2HuMAbを腹腔内投与する。本発明の抗体に複合可能な毒素化合物の例が、PCT出願国際公開公報第2005/112919号パンフレットに記載されている。抗原特異的なヒトモノクローナル抗体を受けるマウスを3種の異なる毒素化合物で試験する。マウスにおける腫瘍成長を投与後60日間監視する。腫瘍が腫瘍エンドポイント（2000mm³）に達する時、マウスを安楽死させる。毒素に複合された適切な抗原特異的な抗体が腫瘍エンドポイント容量（2000mm³）に達するまでの平均時間を延長し、腫瘍成長の進行を遅延させる。したがって、かかる抗体-毒素複合体での処置が、腫瘍成長に対し、インビボでの直接的阻害効果を有する。

【0383】

実施例15

脱フコシル化ヒトモノクローナル抗体の産生

本実施例では、フコシル残基が欠如したヒトモノクローナル抗体を産生するための方法を開示する。フコシル残基の量が減少した抗体が抗体のADCC能力を増大させることが示されている。フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8（ニュージャージー州プリンストン（Princeton）のバイオワ社（Biowa, Inc.））が欠如したCHO細胞系Ms704-PFに、抗原特異的HuMAbの重鎖および軽鎖を発現するベクターをエレクトロポレートする。薬剤耐性クローンを、6mMのL-グルタミンおよび500μg/mlのG418（カリフォルニア州カールスバッド（Carlsbad）のインビトロジェン（Invitrogen））を有するEx-Cell 325-PF CHO培地（カンザス州レネкса（Lenexa）のJRHバイオサイエンス（JRH Biosciences））内での成長により選択する。クローンにおけるIgGの発現を標準のELISAアッセイによりスクリーニングする。2つの別々のクローンB8A6およびB8C11が産生され、それは1.0～3.8ピコグラム/細胞/日の範囲の産生速度を有する。

【0384】

実施例16

脱フコシル化抗体のADCC活性の評価

本実施例は、蛍光細胞毒性アッセイにおいて、脱フコシル化モノクローナル抗体および脱フコシル化されていないモノクローナル抗体が、抗体依存性細胞毒性（ADCC）により、エフェクター細胞の存在下でBMP2、BMP4、BMPR1A、BMPR1B、ACR1、および/またはBMPR2⁺細胞を殺滅する能力の試験について開示する。

【0385】

ヒト抗原に特異的なモノクローナル抗体を上記のように脱フコシル化する。ヒトエフェクター細胞を以下のように全血から調製する。ヒト末梢血単核球を、標準のフィコル-パック分離によりヘパリン化全血から精製する。細胞を10%FBS（培地）および200U/mlのヒトIL-2を含有するRPMI 1640培地内に再懸濁し、37℃で一晩インキュベートする。翌日、細胞を回収し、培地内で1回洗浄し、 2×10^7 個の細胞/mlで再懸濁する。標的抗原⁺細胞を、2.5mMのプロベネシドを補充した培地（アッセイ培地）内で、 1×10^6 個の標的細胞/ml当たりBATDA 2.5μlのBATDA試薬（マサチューセッツ州ウェルズリー（Wellesley）のパーキン・エルマー（Perkin Elmer））とともに37℃で20分間インキュベートする。アッセイ培地内で、標的細胞を、20mMヘプスおよび2.5mMのプロベネシドを有するPBSで4回洗浄し、スピンドウンし、最終容量を 1×10^5 細胞/mlにする。

【0386】

一貫して1:100の標的対エフェクター比を用いる。ヒトIgG1アイソタイプ対照を負の対照として用いる。2100rpmのパルスの回転および37℃で1時間のインキュベーション後、上清を回収し、再び高速回転し、上清20μlを平底プレートに移し、そこにEu溶液(マサチューセッツ州ウェルズリー(Wellesley)のパーキン・エルマー(Perkin Elmer))180μlを添加し、フュージョン・アルファTRF(Fusion Alpha TRF)プレートリーダー(パーキン・エルマー(Perkin Elmer))で読み取る。溶解率(%)を、(試料放出 - 自然放出 * 100) / (最大放出 - 自然放出)(式中、自然放出は標的細胞のみを含有するウェルからの蛍光であり、かつ最大放出は標的細胞を含有し、3%ライゾール(Lyso1)で処理されているウェルからの蛍光である)に従って計算する。抗原 + 発現細胞系は、HuMAb抗原に特異的な抗体による抗体媒介性の細胞毒性および抗原特異抗体の脱フコシル化形態に関連した特異的な溶解の百分率が増大することを示すことになる。したがって、脱フコシル化HuMAb抗体が抗原発現細胞に特異的な細胞毒性を増大させる。

10

【0387】

本発明は、本明細書中に記載の特定の実施形態により範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書中に記載の改良に加えて本発明の様々な変更が、上記および添付の図面から当業者に明らかになるであろう。かかる変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれるように意図されている。

20

【0388】

特許、特許出願、出版物、製品説明、およびプロトコルが本願を通して言及されているが、それらの開示はあらゆる目的でそれら全体が参照により本明細書中に援用される。

【0389】

骨形態形成タンパク質配列の簡単な説明

配列番号1は、GenBankアクセッション番号NM_001200下で開示されたヒト骨形態形成タンパク質2(BMP2)をコードするcDNAのヌクレオチド配列である。

配列番号2は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列によりコードされるヒト骨形態形成タンパク質2(BMP2)のアミノ酸配列である。

配列番号3は、GenBankアクセッション番号NM_130851下で開示されたヒト骨形態形成タンパク質4(BMP4)をコードするcDNAのヌクレオチド配列である。

30

配列番号4は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列によりコードされるヒト骨形態形成タンパク質4(BMP4)のアミノ酸配列である。

配列番号5は、GenBankアクセッション番号NM_004329下で開示されたヒト骨形態形成タンパク質受容体1A(BMPRI A)をコードするcDNAのヌクレオチド配列である。

配列番号6は、配列番号5に示されるヌクレオチド配列によりコードされるヒト骨形態形成タンパク質受容体1A(BMPRI A)のアミノ酸配列である。

配列番号7は、GenBankアクセッション番号NM_001203下で開示されたヒト骨形態形成タンパク質受容体1B(BMPRI B)をコードするcDNAのヌクレオチド配列である。

40

配列番号8は、配列番号7に示されるヌクレオチド配列によりコードされるヒト骨形態形成タンパク質受容体1B(BMPRI B)のアミノ酸配列である。

配列番号9は、GenBankアクセッション番号BC033867下で開示されたヒトアクチビンA受容体タイプI(ACTR1)をコードするcDNAのヌクレオチド配列である。

配列番号10は、配列番号9に示されるヌクレオチド配列によりコードされるヒトアクチビンA受容体タイプI(ACTR1)のアミノ酸配列である。

配列番号11は、GenBankアクセッション番号NM_001204下で開示され

50

たヒト骨形態形成タンパク質受容体 2 (B M P R 2) をコードする c D N A のヌクレオチド配列である。

配列番号 1 2 は、配列番号 1 1 に示されるヌクレオチド配列によりコードされるヒト骨形態形成タンパク質受容体 2 (B M P R 2) のアミノ酸配列である。

【 0 3 9 0 】

配列表の要約

配列番号	配列	配列番号	配列
1	BMP2 n.t.	48	V _K A27 生殖細胞系 a.a.
2	BMP2 a.a.	49	V _K L15 生殖細胞系 a.a.
3	BMP4 n.t.	50	J _K JK4 生殖細胞系 a.a.
4	BMP4 a.a.	51	V _H 4-34 生殖細胞系 a.a.

配列番号	配列	配列番号	配列
5	BMPR1A n.t.	52	D _H 3-10 生殖細胞系 a.a.
6	BMPR1A a.a.	53	J _H JH1 生殖細胞系 a.a.
7	BMPR1B n.t.	54	V _K L6 生殖細胞系 a.a.
8	BMPR1B a.a.	55	J _K JK2 生殖細胞系 a.a.
9	ACTR1 n.t.	56	V _H a.a. 10F6
10	ACTR1 a.a.	57	V _H a.a. 10H6
11	BMPR2 n.t.	58	V _H a.a. 16B7
12	BMPR2 a.a.	59	V _H a.a. 1F6
13	V _H CDR1 a.a. 6H4	60	V _H a.a. 7D6
14	V _H CDR1 a.a. 11F2	61	V _H a.a. 8B3
15	V _H CDR1 a.a. 12E3	62	V _H a.a. 15F3
16	V _H CDR2 a.a. 6H4	63	V _H a.a. 33F7
17	V _H CDR2 a.a. 11F2	64	V _K a.a. 10F6
18	V _H CDR2 a.a. 12E3	65	V _K a.a. 10H6
19	V _H CDR3 a.a. 6H4	66	V _K a.a. 16B7
20	V _H CDR3 a.a. 11F2	67	V _K a.a. 1F6
21	V _H CDR3 a.a. 12E3	68	V _K a.a. 7D6
22	V _K CDR1 a.a. 6H4	69	V _K a.a. 8B3
23	V _K CDR1 a.a. 11F2	70	V _K a.a. 15F3
24	V _K CDR1 a.a. 12E3	71	V _K a.a. 33F7
25	V _K CDR2 a.a. 6H4	72	V _H n.t. 10F6
26	V _K CDR2 a.a. 11F2	73	V _H n.t. 10H6
27	V _K CDR2 a.a. 12E3	74	V _H n.t. 16B7
28	V _K CDR3 a.a. 6H4	75	V _K n.t. 1F6
29	V _K CDR3 a.a. 11F2	76	V _H n.t. 7D6
30	V _K CDR3 a.a. 12E3	77	V _H n.t. 8B3
31	V _H a.a. 6H4	78	V _H n.t. 15F3
32	V _H a.a. 11F2	79	V _H n.t. 33F7
33	V _H a.a. 12E3	80	V _K n.t. 10F6
34	V _K a.a. 6H4	81	V _K n.t. 10H6
35	V _K a.a. 11F2	82	V _K n.t. 16B7

10

20

30

40

配列番号	配列	配列番号	配列
36	V _K a.a. 12E3	83	V _K n.t. 1F6
37	V _H n.t. 6H4	84	V _K n.t. 7D6
38	V _H n.t. 11F2	85	V _K n.t. 8B3
39	V _H n.t. 12E3	86	V _K n.t. 15F3
40	V _K n.t. 6H4	87	V _K n.t. 33F7
41	V _K n.t. 11F2	88	J _H JH4b 生殖細胞系 a.a.
42	V _K n.t. 12E3	89	J _H JH2 生殖細胞系 a.a.
43	V _H 4-59 生殖細胞系 a.a.	90	J _H JH3b 生殖細胞系 a.a.
44	V _H 3-33 生殖細胞系 a.a.	91	V _H 1-69 生殖細胞系 a.a.
45	D _H 2-2 生殖細胞系 a.a.	92	BMP2 エピトープ
46	J _H JH5b 生殖細胞系 a.a.	93	BMP2 エピトープ
47	J _H JH6b 生殖細胞系 a.a.		

10

20

【図 1 a】

```

      Q V H L Q Q W G A G L L K P S E T L
1  CAG GTG CAC CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

      CDR1
      S L T C A V Y G G S P S G Y Y W S W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

      CDR2
      I R Q P P G K G L E W I G E I N H S
109 ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

      CDR2
      G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

      CDR3
      A V Y Y C A R E Y Y Y G S E S E Y F
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TAT TAT TAT GGT TCG GAG AGT GAA TAC TTC

      CDR3
      Q H W G Q G T L V T V S S
325 CAG CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

【図 1 b】

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      Q Q K F G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACC GSC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GSC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      R I S N W P H T F G Q G T K L E I K
271 CST AGC AAC TGG CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

【図 2 a】

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
1  CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

      CDR1
      S L T C T V S G D S I R S Y Y W S W
55 TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GAC TCC ATC AGG AGT TAC TAC TGG AGC TGG

      CDR2
      I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y R
109 ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGA TAT ATC TAT TAC AGA

      CDR2
      G S T H Y N P S L K S R V T I S V D
163 GGG AGC ACC CAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T S K N Q F S L K M S S V T A A D T
217 ACG TCC AAG AAT CAG TTC TCC CTG AAG ATG AGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG

      CDR3
      A V Y Y C A R I C S S I S C W G W F
271 GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG ATT TGT AGT AGT ATC AGC TGT TGG GGC TGG TTC

      CDR3
      D P W G Q G T L V T V S S
325 GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

【図 2 b】

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

      CDR2
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GSC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      CDR3
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C O
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      Q Y C S S P L T F G G G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

【図 3 a】

```

      Q V Q L V E S G G E V V Q P G R S L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG CTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
      R L S E C A A S G F T F S S Y G M H M
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
      V R Q A P G K G L E W V A V T W D D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

                                CDR2
      G R E K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGA AAG AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTT ACC ATC TCC AGA

      D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
      T A V Y Y C A R E P A G V W G M D V
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG CCG GCG GGG GTT TGG GGT ATG GAC GTC

      W G Q G T T V T V S S
325 TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

【図 3 b】

```

      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GGC TGG TAT

                                CDR2
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

                                CDR2
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

                                CDR3
      Y N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

【図 5】

```

4-59 生細胞系      Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
11F2 VH      - - - - -

                                CDR1
4-59 生細胞系      S L T C T V S G G S I S S Y Y W S W
11F2 VH      - - - - - D - - R - - - - -

                                CDR2
4-59 生細胞系      I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S
11F2 VH      - - - - - R

      G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
4-59 生細胞系      - - - H - - - - -
11F2 VH

      T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
4-59 生細胞系      - - - - - M - - - - -
11F2 VH

      A V Y Y C A R                                W F
4-59 生細胞系      - - - - - I C S S I S C W G - -
JH5b 生細胞系

      D P W G Q G T L V T V S S
JH5b 生細胞系      - - - - -
11F2 VH

```

【図 4】

```

4-34 生細胞系      Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S
6H4 VH      - - H - - - - -

                                CDR1
4-34 生細胞系      L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R
6H4 VH      - - - - -

                                CDR2
4-34 生細胞系      Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T
6H4 VH      - - - - -

      N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N
4-34 生細胞系      - - - - -
6H4 VH

      Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C
4-34 生細胞系      - - - - -
6H4 VH

                                CDR3
4-34 生細胞系      A R
JH1 生細胞系      E Y F Q H W G Q G
6H4 VH      - - E Y Y Y G S E S - - - - -

JH1 生細胞系      T L V T V S S
6H4 VH      - - - - -

```

【図 6】

```

Q V Q L V E S C Q C V V Q P C R S L R L S C A A S G E T E S S Y C M H W -
- - - - - V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F E I S R -
- - - - - D N S K N T I L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R - - - - -
- - - - - W G Q G T I V T V S S - - - - -
- - - - -

```

3-33 生細胞系
12E3 VH3-33 生細胞系
12E3 VH3-33 生細胞系
JH6b 生細胞系
12E3 VHJH6b 生細胞系
12E3 VH

【図 7】

L6 生殖細胞系 6H4 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
L6 生殖細胞系 6H4 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L I Y D A S N R A T G I P A R F
L6 生殖細胞系 6H4 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N
L6 生殖細胞系 JK2 生殖細胞系 6H4 VK	W P T F G Q C E X L E I K

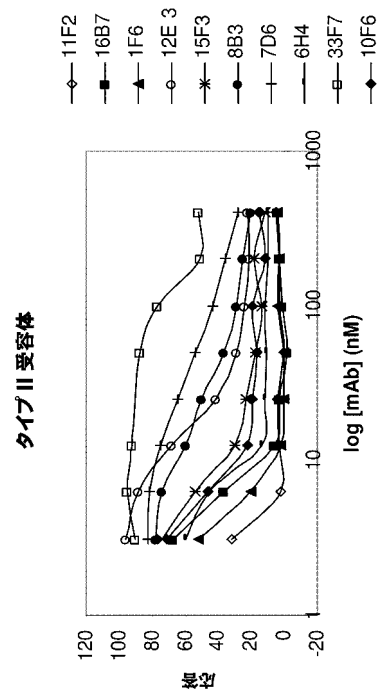
【図 9】

L15 生殖細胞系 12B3 VK	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
L15 生殖細胞系 12B3 VK	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
L15 生殖細胞系 12B3 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
L15 生殖細胞系 JK4 生殖細胞系 12B3 VK	Y P L T F G G G T K V E I K

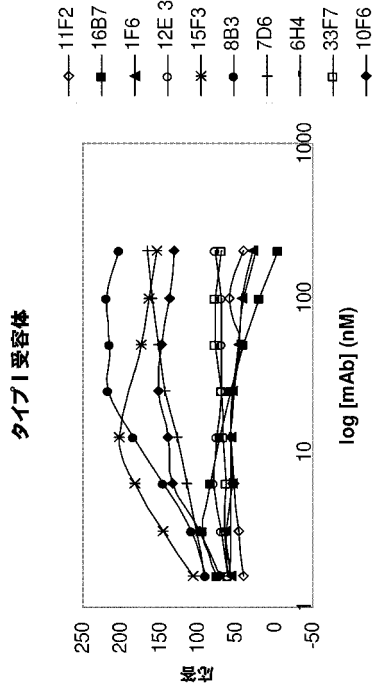
【図 8】

A27 生殖細胞系 11F2 VK	E I V L T Q S P C T L S L S P C E R
A27 生殖細胞系 11F2 VK	A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
A27 生殖細胞系 11F2 VK	Y Q Q K P G Q A F R L L I Y G A S S
A27 生殖細胞系 11F2 VK	R A T G I P D R F S G S G S G T D F
A27 生殖細胞系 11F2 VK	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
A27 生殖細胞系 JK4 生殖細胞系 11F2 VK	Q Y G S S P I T F G G G T K V R I K

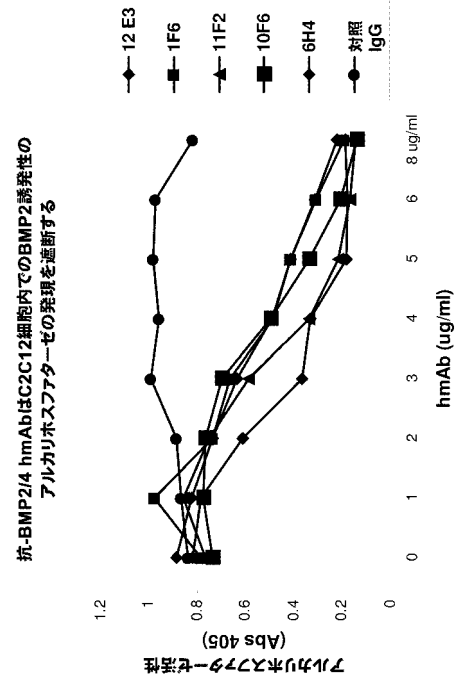
【図 10 a】



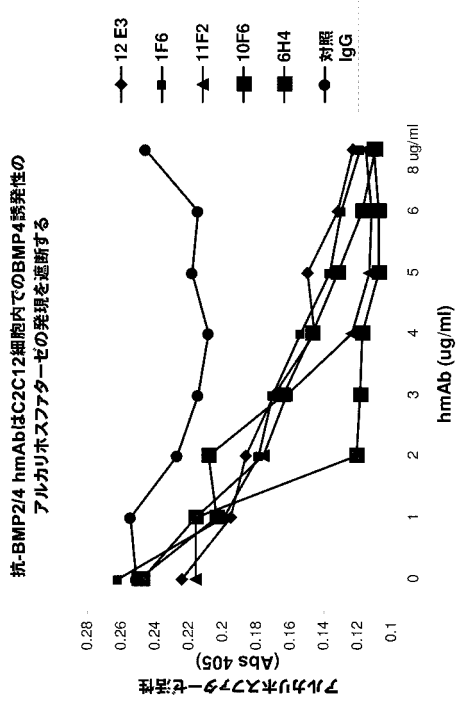
【図 10b】



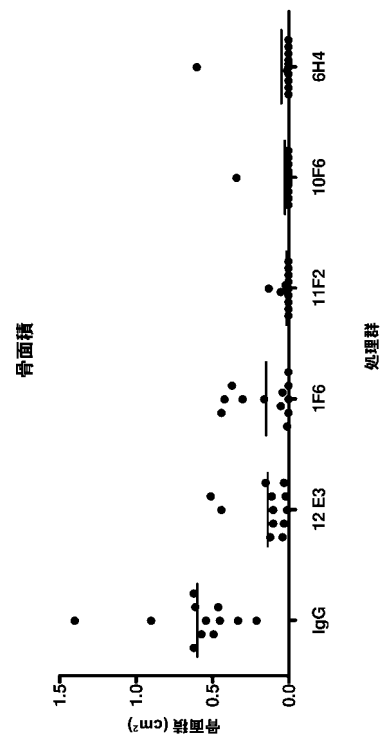
【図 11a】



【図 11b】



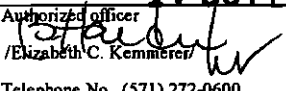
【図 12】



【配列表】

2010502220000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/19652
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 16/00(2006.01),16/18(2006.01),16/22(2006.01),16/26(2006.01),16/46(2006.01);C12N 15/13(2006.01),15/63(2006.01),15/10(2006.01),15/16(2006.01),15/22(2006.01),15/24(2006.01),15/26(2006.01),15/28(2006.01),1/15(2006.01),1/19(2006.01),1/21(2006.01) USPC: Please See Continuation Sheet 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) U.S. : 530/387.1,387.1,387.9,388.1,388.15,388.23,388.24,388.85,389.2,391.3;536/23.53;435/69.1,70.21,326,328,331,335,336,325,252. 3254.11,320.1 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 practicable, search terms used) EAST, DIALOG		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/0226876 A1 (GRAUS et al), 13 October 2005 (13.10.2005), page 29.	19-29
A	WO 2005/086713 A2 (KIRIN BREWERY CO., LTD.) 22 September 2005 (22.09.2005), page 4.	1-18, 27-29
A	YOSHIKAWA, H. et al, Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Human Osteosarcoma, Cancer, 1994, Vol. 73, pages 85-91, see entire document.	1-29
A	MASUHARA, K. et al, Use of Monoclonal Antibody to Detect Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4), Bone, 1995, Vol. 16, pages 91-96, see entire document.	1-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 03 September 2008 (03.09.2008)		Date of mailing of the international search report 17 OCT 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  /Elizabeth C. Kemmner/ Telephone No. (571) 272-0600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.**
PCT/US07/19652**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:**

530/387.1, 387.1, 387.9, 388.1, 388.15, 388.23, 388.24, 388.85, 389.2, 391.3; 536/23.53; 435/69.1, 70.21, 326, 328, 331, 335, 336, 325, 252.3, 254.11, 320.1530, 387.1, 387.1, 387.9, 388.1, 388.15, 388.23, 388.24, 388.85, 389.2, 391.3; 536/23.53; 435/69.1, 70.21, 326, 328, 331, 335, 336, 325, 252.3, 254.11, 320.1

Continuation of USPC:

530/387.1, 387.1, 387.9, 388.1, 388.15, 388.23, 388.24, 388.85, 389.2, 391.3; 536/23.53; 435/69.1, 70.21, 326, 328, 331, 335, 336, 325, 252.3, 254.1, 320.1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 9/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(71)出願人 509256861

ツインーママン デボラ エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オークランド アスピンウォール ロード 6 2 6 2

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

- (72)発明者 ツィンマーマン デボラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オークランド アスピンウォール ロード 6 2 6 2
- (72)発明者 セルビー マーク
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ゲールウッド サークル 1 3 6
- (72)発明者 スリーニヴァーサン モハン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ホセ アーリントン レーン 1 0 4 4
- (72)発明者 ベル アラスデア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー ハイスクール ウェイ 9 0 0 アパ
ートメント 2 1 3 5
- (72)発明者 シン スジャータ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サラトガ マロリー コート 1 9 9 4 2
- (72)発明者 セオリス リチャード ジュニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ クルーズ ナショナル ストリート 4 0 7
- (72)発明者 ルブラン ハイディ エヌ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー チャーチ ストリート 6 4 9
- (72)発明者 エモリー カイラ ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー エル カミーノ リアル 1 0 0 ウ
ェスト アpartment 3 8
- (72)発明者 スプラウル ティモシー ウィリアム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リヴァーモア アルデン レーン 6 7 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 DA02 EA04 GA14
4B064 AG27 CA20 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA92X AB01 AB02 AC14 BA02 BA08
BB08 BB11 BB12 BB15 BB25 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 AA35 BB36
4H045 AA11 DA76 EA20 FA74

【要約の続き】

Q V H L Q Q W G A G L L K P S E T L
1 CAG GTG CAC CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

CDR1

S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

CDR2

I R Q P P G K G L E W I G E I N H S
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

CDR2

G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

CDR3

A V Y Y C A R E Y Y Y G S E S E Y F
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TAT TAT TAT GGT TCG GAG AGT GAA TAC TTC

CDR3

Q H W G Q G T L V T V S S
325 CAG CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA