

(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2010-539932

(P2010-539932A)

(43) 公表日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 B 0 2 4	
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	D	4 B 0 6 3	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G O 1 N	33/53	N		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A		
			C 1 2 Q	1/02			
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)							
(21) 出願番号	特願2010-526956 (P2010-526956)		(71) 出願人	595148888			
(86) (22) 出願日	平成20年9月26日 (2008. 9. 26)			ストライカー コーポレーション			
(85) 翻訳文提出日	平成22年5月11日 (2010. 5. 11)			STRYKER CORPORATION			
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/011154			アメリカ合衆国ミシガン州49002, カ			
(87) 国際公開番号	W02009/045321			ラマズー, エアヴェー・ブルヴァード			
(87) 国際公開日	平成21年4月9日 (2009. 4. 9)			2 8 2 5			
(31) 優先権主張番号	60/995, 833		(74) 代理人	100078282			
(32) 優先日	平成19年9月28日 (2007. 9. 28)			弁理士 山本 秀策			
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人	100062409			
				弁理士 安村 高明			
			(74) 代理人	100113413			
				弁理士 森下 夏樹			
最終頁に続く							

(54) 【発明の名称】 骨形成タンパク質に対する中和抗体を検出するための方法

(57) 【要約】

本発明は、骨形成タンパク質 (BMP) に対する中和抗体を検出する方法に関する。より特定のには、本発明は抗 BMP 中和抗体の存在を検出するための、特異性が高く、強力で、迅速かつ正確な、細胞に基づくアッセイに関する。一実施形態において、上記の方法は、(a) サンプルを BMP に接触させるステップと；(b) BMP への露出によって発現が調節され得る少なくとも1つの内因性遺伝子を含む BMP 応答性細胞とともに、ステップ(a)からのサンプルをインキュベートするステップと；(c) 細胞から mRNA を単離するステップと；(d) 逆転写反応によって mRNA に対応する cDNA を調製するステップと；(e) 定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (QPCR) によって、ステップ(d)の cDNA から遺伝子を増幅するステップと；(f) 細胞中のステップ(e)に

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の骨形成タンパク質（BMP）に対する中和抗体の検出のための方法であって、

- （a）前記サンプルをBMPに接触させるステップと；
- （b）前記BMPへの露出によって発現が調節され得る少なくとも1つの内因性遺伝子を含むBMP応答性細胞とともに、ステップ（a）からの前記サンプルをインキュベートするステップと；
- （c）前記細胞からmRNAを単離するステップと；
- （d）逆転写反応によって前記mRNAに対応するcDNAを調製するステップと；
- （e）定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（QPCR）によって、ステップ（d）の前記cDNAから前記遺伝子を増幅するステップと；
- （f）前記細胞中のステップ（e）において増幅された前記遺伝子の量を決定するステップと；
- （g）BMPのみに接触させた対照細胞における、ステップ（e）に従って増幅された前記遺伝子の量を決定するステップと；
- （h）ステップ（f）で決定された前記量がステップ（g）で決定された前記量より少ないかまたは多いときに、前記サンプル中の中和抗体の存在を検出するステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

20

- （i）定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（QPCR）によって、ステップ（d）の前記cDNAからハウスキーピング遺伝子を増幅するステップと；
 - （j）前記細胞中のステップ（i）において増幅された前記ハウスキーピング遺伝子の量を決定するステップと；
 - （k）ステップ（j）で決定された前記ハウスキーピング遺伝子の前記量によって、ステップ（f）で決定された前記遺伝子の前記量を正規化するステップと
- をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記BMPは、OP - 1（BMP - 7）、OP - 2、OP - 3、BMP - 2、BMP - 3、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、BMP - 8、BMP - 9、BMP - 10、BMP - 11、BMP - 12、BMP - 13、BMP - 15、BMP - 16、BMP - 17、BMP - 18、DPP、Vg1、Vgr、60Aタンパク質、GDF - 1、GDF - 2、GDF - 3、GDF - 5、GDF - 6、GDF - 7、GDF - 8、GDF - 9、GDF - 10、GDF - 11、GDF - 12、CDMP - 1、CDMP - 2、CDMP - 3、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、NEURAL、およびその断片からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記BMPはOP - 1（BMP - 7）である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルは血清である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記血清はヒト血清である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記BMP応答性細胞は、A549、SAOS - 2、ROSおよびCSC12からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記BMP応答性細胞はA549細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子は初期遺伝子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 10】

50

前記初期遺伝子は、I d - 1、I d - 2、I d - 3、I d - 4、M s x 2、D l x 2、D l x 3、D l x 5、N o g g i n、S m a d 6、S m a d 7 および R u n x 2 からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記初期遺伝子は I d - 1 である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記遺伝子は後期遺伝子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記後期遺伝子は、H E Y 1、D I O 2、A D A M T S 9、H A S 3、F G F R 3、M F I 2、C H I 3 L 1、N O G、B A M B I、G R E M 1、G R E M 2 および S O S T からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記サンプルは、ステップ (a) において少なくとも 3 0 分間 B M P と接触させられる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

ステップ (b) からの前記サンプルは B M P 応答性細胞とともに約 3 時間インキュベートされる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記抗体は O P 1 (B M P - 7) に対して特異的である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 1 7】

前記サンプルは、ステップ (a) ~ (h) を行なう前に少なくとも 1 つのプレスクリーニングアッセイに供される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記プレスクリーニングアッセイは、骨形成タンパク質 (B M P) に対する中和抗体を検出できる任意のアッセイである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記プレスクリーニングアッセイは、イムノアッセイおよび細胞に基づくアッセイからなる群より選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記イムノアッセイは酵素免疫測定法 (E L I S A) である、請求項 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

前記細胞に基づくアッセイは、レポーター遺伝子の活性化を伴う、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記レポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ルシフェラーゼ遺伝子は、B M P への露出によって調節され得る遺伝子のプロモーターにつながる、請求項 2 2 に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

前記遺伝子は初期または後期遺伝子である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記遺伝子は、I d - 1、I d - 2、I d - 3、I d - 4、M s x 2、D l x 2、D l x 3、D l x 5、N o g g i n、S m a d 6、S m a d 7、R u n x 2、フィブロモジュリン、H e y 1 および S F R P - 2 からなる群より選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記細胞に基づくアッセイは、アルカリホスファターゼの活性のモニタリングを伴う、請求項 1 9 に記載の方法。

50

【請求項 27】

前記アルカリホスファターゼ活性はラット骨肉腫（ROS）細胞においてモニタされる、請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨形成タンパク質（bone morphogenetic protein：BMP）に対する中和抗体を検出する方法に関する。より特定的には、本発明は抗 BMP 中和抗体の存在を検出するための、特異性が高く、強力で、迅速かつ正確な、細胞に基づくアッセイに関する。

10

【背景技術】

【0002】

骨形成（osteogenic）および軟骨形成タンパク質は、前駆細胞の増殖ならびに機能性の骨、軟骨、腱および/または靱帯組織への分化を誘導できる。本明細書においてはこれらのタンパク質を「骨形成タンパク質（osteogenic proteins）」、「形態形成（morphogenic）タンパク質」、「形態形成（morphogenetic）タンパク質」、または「モルフォゲン」と呼び、これらのタンパク質は、軟骨内性骨形成を誘導する能力によって同定される骨形成タンパク質（“BMP”）ファミリーのメンバーを含む。当該技術分野において、骨形成（osteogenic）タンパク質は一般的に、成長因子の TGF- β スーパーファミリーのサブグループとして分類される。非特許文献 1。骨形成（osteogenic）タンパク質は、哺乳動物の骨形成タンパク質 1（osteogenic protein-1：OP-1、BMP-7 としても公知）およびその *Drosophila* 相同体の 60A、骨形成タンパク質 2（OP-2、BMP-8 としても公知）、骨形成タンパク質 3（OP-3）、BMP-2（BMP-2A または CBMP-2A としても公知）およびその *Drosophila* 相同体の DPP、BMP-3、BMP-4（BMP-2B または CBMP-2B としても公知）、BMP-5、BMP-6 およびそのネズミ相同体の Vgr-1、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、GDF-3（Vgr2 としても公知）、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、BMP-13、BMP-14、BMP-15、GDF-5（CDMP-1 または MP52 としても公知）、GDF-6（CDMP-2 としても公知）、GDF-7（CDMP-3 としても公知）、Xenopus 相同体の Vg1 ならびに NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、および NEURAL を含む。

20

30

【0003】

骨形成（osteogenic）タンパク質は典型的に、共通の構造的特徴を有する分泌ペプチドを含む。前駆体の「プロ形（pro-form）」からプロセシングされた成熟形の骨形成（osteogenic）タンパク質は、ジスルフィド結合されたホモまたはヘテロ二量体であり、その各々のサブユニットがカルボキシル末端活性ドメインを有する。このドメインは約 97～106 アミノ酸残基を有し、システイン残基の保存されたパターンを含む。たとえば、非特許文献 2；非特許文献 3 などを参照。

40

【0004】

骨形成（osteogenic）タンパク質は多数の生物学的プロセスを制御でき、その中には発達中の骨格系および成熟した骨格系の両方における新たな骨および軟骨の形成の誘導が含まれる。たとえば、骨形成（osteogenic）タンパク質は、哺乳動物に投与されると前駆細胞の増殖および分化を刺激できる。その結果として、骨形成タンパク質は、真の置換骨が別様に発生しないような条件において、軟骨内性骨形成を含む骨形成を誘導することができる。骨形成（osteogenic）タンパク質は、大きな分節骨欠損、脊椎固定、および骨折における新たな骨の形成も誘導できる。

【0005】

特定の抗体の検出は、医学的診断の非常に一般的な形である。たとえば、疾患の診断の

50

ための生化学的アッセイにおいては、あらゆる特定の抗原に対して向けられた抗体のタイターを血液から推定できる。臨床免疫学においては、疾患の原因の決定において患者の抗体プロファイルを特徴付けるために、異なるクラスの免疫グロブリンのレベルが有用な場合がある。

【0006】

治療剤で処置された患者における潜在的免疫原性の発達をモニタするために、中和抗体などの抗体の検出を用いることもできる。たとえば現在、たとえば酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)、受容体結合アッセイ、放射性免疫沈降、バイオセンサーに基づくアッセイ、免疫蛍光、ウエスタンブロット、免疫拡散および免疫電気泳動などを含む、複合抗原-抗体の検出に基づくいくつかの免疫診断法を用いて、修正後外側脊椎固定および長骨癒合不全の処置のために OP-1 (BMP-7) で処置された患者において、中和抗体が検出されている。さまざまな細胞に基づく系を用いて中和抗体を検出することもできる。こうした細胞に基づくアッセイにおいて、中和抗体は、標的細胞中で治療剤が生物学的プロセスを調節する能力を阻害する。これらのアッセイは、たとえばルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子の活性化などを伴ってもよい。代替的には、たとえばアルカリホスファターゼ活性などの生物学的機能の読取りを伴う、細胞に基づく系を用いて中和抗体を検出できる。しかし、これらの現行の検出法は、アッセイの感度のレベル、特異性のレベル、および所要時間が長いことを含むいくつかの欠点を有する。

10

20

【0007】

したがって、現在利用可能な方法に関連する問題点を克服するような、抗 BMP 中和抗体の存在を検出するための改善された方法がなお必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Hogan, Genes & Development (1996) 10: 1580-1594

【非特許文献2】Massague, Annu. Rev. Cell Biol. (1990) 6: 597

【非特許文献3】Sampathk, J. Biol. Chem. (1990) 265: 13198

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、抗 BMP 中和抗体の存在を検出するための、特異性が高く、強力で、迅速かつ正確なアッセイを提供することによって、上述の問題を解決する。したがっていくつかの実施形態において、本発明は、サンプル中の骨形成タンパク質 (BMP) に対する中和抗体の検出のための方法を提供し、この方法は (a) 前記サンプルを BMP に接触させるステップと; (b) 前記 BMP への露出によって発現が調節され得る少なくとも1つの内因性遺伝子を含む BMP 応答性細胞とともに、ステップ (a) からの前記サンプルをインキュベートするステップと; (c) 前記細胞から mRNA を単離するステップと; (d) 逆転写反応によって前記 mRNA に対応する cDNA を調製するステップと; (e) 定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative real-time polymerase chain reaction: QPCR) によって、ステップ (d) の前記 cDNA から前記遺伝子を増幅するステップと; (f) 前記細胞中のステップ (e) において増幅された前記遺伝子の量を決定するステップと; (g) BMP のみに接触させた対照細胞における、ステップ (e) に従って増幅された前記遺伝子の量を決定するステップと; (h) ステップ (f) で決定された量がステップ (g) で決定された量よりも少ないかまたは多いときに、前記サンプル中の中和抗体の存在を検出するステップとを含む。いくつかの実施形態において、ステップ (f) で決定された量はステップ (g)

40

50

）で決定された量よりも多い。他の実施形態において、ステップ（f）で決定された量はステップ（g）で決定された量よりも少ない。

【0010】

いくつかの実施形態において、本発明は、サンプル中の骨形成タンパク質（BMP）に対する中和抗体の検出のための方法を提供し、この方法は、（i）定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（QPCR）によって、ステップ（d）の前記cDNAからハウスキーピング遺伝子を増幅するステップと；（j）前記細胞中の、ステップ（i）で増幅された前記ハウスキーピング遺伝子の量を決定するステップと；（k）ステップ（j）で決定された前記ハウスキーピング遺伝子の量によって、ステップ（f）で決定された前記遺伝子の量を正規化するステップとをさらに含む。

10

【0011】

いくつかの実施形態において、骨形成タンパク質は、OP-1（BMP-7）、OP-2、OP-3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-15、BMP-16、BMP-17、BMP-18、DPP、Vg1、Vgr、60Aタンパク質、GDF-1、GDF-2、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、CDMP-1、CDMP-2、CDMP-3、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、NEURAL、およびその断片を含むがこれらに限定されない。他の実施形態において、骨形成タンパク質はOP-1（BMP-7）である。

20

【0012】

いくつかの実施形態において、サンプルは血清である。他の実施形態において、サンプルはヒト血清である。

【0013】

いくつかの実施形態において、BMP応答性細胞は、A549、SAOS-2、ROSおよびCSC12を含むがこれらに限定されない。他の実施形態において、BMP応答性細胞はA549細胞である。いくつかの実施形態において、BMP応答性細胞は、骨髄、脂肪または筋肉のいずれかに由来する一次間質細胞を含むがこれに限定されない。

【0014】

いくつかの実施形態において、BMPへの露出によって発現が調節され得る内因性遺伝子は、表1（下記参照）に示される遺伝子から選択される遺伝子を含むがこれに限定されない。いくつかの実施形態において、BMPへの露出によって発現が調節され得る内因性遺伝子は、初期遺伝子である。いくつかの実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後1分から最高48時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、初期遺伝子は、Id-1、Id-2、Id-3、Id-4、Msx2、Dlx2、Dlx3、Dlx5、Noggin、Smad6、Smad7およびRunx2を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、初期遺伝子はId-1である。

30

【0015】

いくつかの実施形態において、BMPへの露出によって発現が調節され得る内因性遺伝子は、後期遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、BMPへの露出後48時間より後にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、HEY1、DIO2、ADAMTS9、HAS3、FGFR3、MFI2、CHI3L1、NOG、BAMBI、GREM1、GREM2およびSOSTを含むがこれらに限定されない。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、遺伝子の発現は、BMPへの露出によってアップレギュレートされる。他の実施形態において、遺伝子の発現は、BMPへの露出によってダウンレギュレートされる。

【0017】

50

いくつかの実施形態において、サンプルはステップ (a) において B M P と少なくとも 3 0 分間接触させられる。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、ステップ (b) からのサンプルは B M P 応答性細胞とともに約 3 時間インキュベートされる。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、抗体は O P - 1 (B M P - 7) に対して特異的である。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、サンプルは、この方法のステップ (a) ~ (h) を行なう前に少なくとも 1 つのプレスクリーニングアッセイ (p r e s c r e e n i n g a s s a y) に供される。いくつかの実施形態において、プレスクリーニングアッセイとは、骨形成タンパク質 (B M P) に対する中和抗体を検出できる任意のアッセイである。いくつかの実施形態において、プレスクリーニングアッセイは、イムノアッセイおよび細胞に基づくアッセイからなる群より選択される。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態において、イムノアッセイは酵素免疫測定法 (E L I S A) である。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、細胞に基づくアッセイは、レポーター遺伝子の活性化を伴う。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である。いくつかの実施形態において、ルシフェラーゼ遺伝子は、B M P への露出によって調節され得る遺伝子のプロモーターにつながる。いくつかの実施形態において、遺伝子は初期または後期遺伝子である。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I d - 1、I d - 2、I d - 3、I d - 4、M s x 2、D l x 2、D l x 3、D l x 5、N o g g i n、S m a d 6、S m a d 7、R u n x 2、フィブロモジュリン、H e y 1 および S F R P - 2 を含むがこれらに限定されない。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態において、細胞に基づくアッセイは、アルカリホスファターゼの活性のモニタリングを伴う。いくつかの実施形態において、アルカリホスファターゼ活性はラット骨肉腫 (r a t o s t e o s a r c o m a : R O S) 細胞においてモニタされる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 4 】

【 図 1 】 より高いアッセイ感度が得られた B M P - 7 の有効濃度は 1 5 n g / m L であることを示す図である。2 つの異なる濃度 (1 5 n g / m L および 2 5 n g / m L) の B M P - 7 (各々 3 つ行なった) を、だんだん増加する濃度の抗 B M P - 7 モノクローナル抗体 (1 2 G 3) とともにインキュベートした。I d - 1 遺伝子に対する相対量 (r e l a t i v e q u a n t i t y : R Q) の値を決定し、1 5 n g / m L の濃度の B M P - 7 は、より高いアッセイ感度が得られた有効濃度であることが決定された。

【 図 2 】 血清サンプルの最小必要希釈度 (m i n i m u m r e q u i r e d d i l u t i o n : M R D) は 1 : 4 0 であることを示す図である。正常ヒト血清 (N o r m a l h u m a n s e r u m : N H S) サンプルを 1 : 1 0、1 : 2 0、1 : 4 0 および 1 : 8 0 に希釈し、I d - 1 遺伝子に対する相対量 (R Q) の値を決定した。M R D とは、血清を含有しない対照サンプル (N o N H S) と類似のバックグラウンド R Q 値を示すような血清サンプルの最小希釈度である。

【 図 3 】 インキュベーションの期間および F B S の濃度のアッセイ最適化を示す図である。細胞をだんだん増加する濃度の B M P - 7 とともに 1 9 時間または 3 時間インキュベートして、標的 / ハウスキーピング (I d - 1 / G A P D H) 遺伝子発現の比率に対する影響を決定した。応答曲線に基づいて、最適化期間として 3 時間のインキュベーション期間を選択した。

10

20

30

40

50

【図4】OP-1(BMP-7)はハウスキーピングGAPDH発現率に影響しないことを示す図である。80個の異なるサンプルのGAPDH発現率(非スパイク/OP-1スパイク)を調べて、比較的均一であることが示された。

【図5】40ng/ml(BMP-7 40)および400ng/ml(BMP-7 400)のBMP-7で7日間処理した後の、FGFR3、DIO2、HEY1、ADAMTS9、HAS3、およびMFI2のmRNA発現の倍数変化を示す図である。ODMは対照細胞(すなわちBMP非処理)からのmRNAを示す。

【図6】40ng/ml(BMP-7 40)および400ng/ml(BMP-7 400)のBMP-7で7日間処理した後の、Noggin、BAMBI、GREM1、GREM2、およびSOSTのmRNA発現の倍数変化を示す図である。ODMは対照細胞(すなわちBMP非処理)からのmRNAを示す。

【図7】40ng/ml(BMP-7 40)および400ng/ml(BMP-7 400)のBMP-7で7日間処理した後の、CHI3L1のmRNA発現の倍数変化を示す図である。ODMは対照細胞(BMP非処理)からのmRNAを示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本明細書に記載される発明を完全に理解するために、以下に詳細な説明を示す。

【0026】

別様に定義されない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の通常の当業者が一般的に理解しているものと同じ意味を有する。本発明の実施またはテストにおいて、本明細書に記載されるものと類似または同等の方法および材料が用いられてもよいが、好適な方法および材料を以下に記載する。材料、方法および実施例は単なる例示的なものであり、限定的なものとは意図されない。本明細書で言及されるすべての出版物、特許およびその他の文書はその全体にわたって引用により援用される。

【0027】

この明細書全体を通じて、「含む(comprise)」という言葉または「含む(contains)」もしくは「含んでいる(comprising)」などの変形は、述べられる完全体または完全体の群を含むことを意味するが、あらゆるその他の完全体または完全体の群を排除することは意味しないことが理解されるであろう。

【0028】

本発明をさらに定義するために、本明細書において以下の用語および定義を提供する。

【0029】

本明細書において、「骨形成タンパク質(bone morphogenetic protein: BMP)」、「骨形成タンパク質(bone morphogenic protein: BMP)」、「形態形成(morphogenic)タンパク質」、または「形態形成(morphogenetic)タンパク質」という用語は互いに交換可能に用いられ、DNAおよびアミノ酸配列の相同性に基づいてタンパク質のTGF- β スーパーファミリーのBMPファミリーに属するタンパク質(BMPファミリー)を示す。本発明に従うと、あるタンパク質が、BMPタンパク質ファミリーを特徴付ける保存されたC末端システインリッチドメイン内で少なくとも1つの公知のBMPファミリーメンバーと少なくとも50%のアミノ酸配列同一性を有するとき、そのタンパク質はBMPファミリーに属する。好ましくは、そのタンパク質は保存されたC末端システインリッチドメイン内で少なくとも1つの公知のBMPファミリーメンバーと少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有する。BMPファミリーのメンバーは、全体で50%未満のDNAまたはアミノ酸配列同一性を有していてもよい。BMPは、局所環境の指示に依存して、前駆細胞を誘導して増殖および/または分化経路を開始することによって、軟骨、骨、腱、靱帯、腎臓、肝臓、筋肉、神経または他のタイプの組織形成をもたらすことができてもよく、よってBMPは異なる環境において異なる振舞いをしていてもよい。たとえば、BMPは1つの処置部位において骨組織を誘導し、異なる処置部位において神経組織を誘導してもよ

い。

【0030】

本発明の実行において有用な骨形成タンパク質は、活性形のOP-1、OP-2、OP-3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-15、BMP-16、BMP-17、BMP-18、DPP、Vg1、Vgr-1、60Aタンパク質、GDF-1、GDF-2、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-9、GDF-10、GDF-11、GDF-12、CDMP-1、CDMP-2、CDMP-3、UNIVIN、NODAL、SCREW、ADMPまたはNEURAL、およびそれらのアミノ酸配列変異体を含む。

10

【0031】

「アミノ酸配列相同性」という用語は、アミノ酸配列の同一性および類似性の両方を含むことが理解される。相同配列は同一および/または類似のアミノ酸残基を共有し、ここで類似の残基とは、整列した参照配列中の対応するアミノ酸残基の保存的置換または「許容される点突然変異」である。よって、参照配列と70%のアミノ酸相同性を有する候補ポリペプチド配列においては、整列した残基のうちいずれか70%が参照配列中の対応残基と同一であるか、またはその保存的置換である。特定の特に好ましい形態形成ポリペプチドは、ヒトOP-1および関連タンパク質の保存された7システインドメインを定義するC末端102~106アミノ酸と少なくとも60%、好ましくは70%のアミノ酸配列同一性を有する。

20

【0032】

アミノ酸配列相同性は、当該技術分野において周知の方法によって決定することができる。たとえば、7システインドメインの配列に対する候補アミノ酸配列のパーセント相同性を決定するためには、まず2つの配列を整列させる。整列は、たとえばNeedlemanら、J. Mol. Biol., 48, pp. 443 (1970)に記載される動的プログラミングアルゴリズム、およびDNASTAR, Inc.によって生産される商業的ソフトウェアパッケージであるAlign Programなどによって行なうことができる。両方の出典による教示は本明細書において引用により援用される。関連タンパク質のファミリーの多配列アラインメントとの比較によって、初期アラインメントを精密化できる。アラインメントを行なって精密化してから、パーセント相同性スコアを算出する。2つの配列の整列したアミノ酸残基同士の類似性を順に比較する。類似性の要素は、類似のサイズ、形および電荷を含む。アミノ酸類似性を決定する特に好ましい方法の1つは、本明細書において引用により援用されるDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, pp. 345-352 (1978 & Supp.)に記載されるPAM250マトリックスである。類似性スコアは最初に、整列対に関するアミノ酸類似性スコアの合計として算出される。パーセント相同性および同一性の目的のために、挿入および欠失は無視される。したがって、この計算にはギャップペナルティは用いられない。この生スコアを、次いで候補配列および7システインドメインのスコアの相乗平均で割ることによって正規化する。相乗平均とはこれらのスコアの積の平方根である。この正規化された生スコアがパーセント相同性である。

30

40

【0033】

「保存的置換」という用語は、対応する参照残基と物理的または機能的に類似の残基を示す。すなわち、保存的置換とその参照残基とは、類似のサイズ、形、電荷、共有結合もしくは水素結合の形成能力を含む化学的性質、またはその類似物を有する。好ましい保存的置換は、上記のDayhoff et al.において許容される点突然変異に対して定義された基準を満たすものである。保存的置換の例は、次のグループ内での置換である：(a) バリン、グリシン；(b) グリシン、アラニン；(c) バリン、イソロイシン、ロイシン；(d) アスパラギン酸、グルタミン酸；(e) アスパラギン、グルタミン；(f) セリン、スレオニン；(g) リジン、アルギニン、メチオニン；および(h) フェニルアラニン、チロシン。「保存的変異体」または「保存的変形」という用語は、所与の親

50

アミノ酸配列中のアミノ酸残基の代わりに置換アミノ酸残基を使用することも含み、ここで親配列に対して特異的な抗体は、結果的に得られる置換ポリペプチド配列に対しても特異的であり、すなわち「交差反応」または「免疫反応」する。

【0034】

「骨形成タンパク質 (osteogenic protein: OP)」という用語は、前駆細胞を誘導して軟骨および/または骨を形成できる形態形成 (morphogenic) タンパク質を示す。骨は膜内骨または軟骨内性骨であってもよい。ほとんどの骨形成 (osteogenic) タンパク質は BMP タンパク質ファミリーのメンバーであり、したがって BMP でもある。本明細書の別の場所に記載されるとおり、このクラスのタンパク質はヒト骨形成タンパク質 (hOP-1) を代表とする。本発明とともに用いるために好適な骨形成 (osteogenic) タンパク質は、Reddi および Sampath (Sampathら、Proc. Natl. Acad. Sci., 84, pp. 7109-13, 本明細書において引用により援用される) によって記載される当該技術分野に認識されるバイオアッセイを用いたルーチン実験によって同定できる。

10

【0035】

「形態形成 (morphogenic) 活性」、「形態形成 (morphogenetic) 活性」、「誘導 (inducing) 活性」および「組織誘導 (tissue inductive) 活性」という用語は、骨形成タンパク質が標的細胞を刺激して、任意に細胞分化をもたらし得る1つまたはそれ以上の細胞分裂 (増殖) を起こす能力を代替的に示す。こうした標的細胞は、本明細書において一般的に前駆細胞と呼ばれる。細胞増殖は典型的に細胞周期制御の変化を特徴とし、DNA 合成速度または細胞生育速度の測定を含むいくつかの手段によって検出されてもよい。細胞分化の初期段階は典型的に、前駆細胞のものに対する遺伝子発現パターンの変化を特徴とし、これは特定の細胞運命または細胞型への関与を示していてもよい。細胞分化の後期段階は、遺伝子発現パターン、細胞生理および形態の変化を特徴としてもよい。遺伝子発現、細胞生理または形態のあらゆる再現性のある変化を用いて、BMP によって誘導される細胞分化の開始および程度を評価してもよい。

20

【0036】

「抗体」という用語は、完全な抗体、たとえば2本の重鎖および2本の軽鎖を含む抗体など、または完全な抗体の抗原結合断片を示し、供給源、起源の種、生産方法および特徴に関わらず、抗原結合部位を含むあらゆるポリペプチドを包含する。限定的でない例として、「抗体」という用語は、ヒト、オランウータン、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジおよびニワトリ抗体を含む。この用語は、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多特異性、非特異性、ヒト化、1本鎖、キメラ、合成、組換え型、混成、変異型、およびCDR 移植抗体を含むがこれらに限定されない。「抗体」という用語は、さまざまなプロテアーゼによる分解によって生成される抗体断片、化学的切断および/または化学的解離によって生成される抗体断片、および組換えによって生成される抗体断片も含むがこれらに限定されない。これらの断片の中には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb、および抗原結合機能を保持するその他の抗体断片がある。抗体またはその断片は、公知の抗体アイソタイプおよびその高次構造のいずれかであってもよく、たとえばIgA、IgG、IgD、IgE、IgM 単量体、IgA 二量体、IgA 三量体、またはIgM 五量体などであってもよい。

30

40

【0037】

「中和抗体」という用語は、その抗体が特異的である分子に結合してその少なくとも1つの生物活性を妨げることができるようなあらゆる抗体またはその断片を示す。中和抗体は、その抗体が特異的である分子の1つまたはそれ以上の活性を、その分子のその他の活性を阻害することなく阻害 (すなわち除去または低減) してもよい。

【0038】

「調節する (modulate)」または「調節している (modulating)」という用語は、別の化合物または分子の少なくとも1つの活性、たとえば遺伝子転写のレ

50

ベルまたは遺伝子発現のレベルなどをアップレギュレートまたはダウンレギュレートする能力を示す。

【 0 0 3 9 】

「 B M P 応答性細胞」という用語は、 B M P 受容体を発現して B M P に誘導されるタンパク質シグナリングの形質導入を可能にすることによって、 B M P と細胞受容体との相互作用に応答して遺伝子発現制御要素の調節をもたらすようなあらゆる細胞を示す。

【 0 0 4 0 】

「対象 (s u b j e c t) 」という用語は動物を示す。いくつかの実施形態において、動物は、ヒト、ウシおよびげっ歯動物を含むがこれらに限定されない哺乳動物である。他の実施形態において、哺乳動物はヒトである。

10

【 0 0 4 1 】

骨形成タンパク質ファミリー

B M P ファミリーは、その代表的な骨形成 (b o n e m o r p h o g e n e t i c / o s t e o g e n i c) タンパク質ファミリーのメンバーの名を取って名付けられており、 T G F - β タンパク質スーパーファミリーに属する。主に配列相同性に基づいて単離された、報告される「 B M P 」 (B M P - 1 から B M P - 1 8) のうち、 B M P - 1 を除くすべてがなおも形態形成タンパク質の B M P ファミリーのメンバーとして分類されている (O z k a y n a k ら、 E M B O J . , 9 , p p . 2 0 8 5 - 9 3 (1 9 9 0)) 。

【 0 0 4 2 】

B M P ファミリーは、形態形成タンパク質であるその他の構造的に関連するメンバーを含んでおり、その中にはショウジョウバエデカペンタプレジック遺伝子複合物 (d r o s o p h i l a d e c a p e n t a p l e g i c g e n e c o m p l e x : D P P) 産物、 X e n o p u s l a e v i s の V g 1 産物およびそのネズミ相同体 V g r - 1 (例、本明細書において引用により援用される M a s s a g u e , A n n u . R e v . C e l l B i o l . , 6 , p p . 5 9 7 - 6 4 1 (1 9 9 0) を参照) が含まれる。

20

【 0 0 4 3 】

B M P - 3、 B M P - 5、 B M P - 6、および O P - 1 (B M P - 7) の C 末端ドメインは B M P - 2 と約 6 0 % 同一であり、 B M P - 6 および O P - 1 の C 末端ドメインは 8 7 % 同一である。 B M P - 6 はおそらくネズミ V g r - 1 のヒト相同体である (L y o n s ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 8 6 , p p . 4 5 5 4 - 5 9 (1 9 8 9)) ; この 2 つのタンパク質はアミノ酸配列レベルで全体的に 9 2 % 同一である (本明細書において引用により援用される米国特許第 5 , 4 5 9 , 0 4 7 号) 。 B M P - 6 は X e n o p u s V g - 1 産物と 5 8 % 同一である。

30

【 0 0 4 4 】

天然に存在する骨形成タンパク質は、 C 末端領域 (ドメイン) にかなりのアミノ酸配列相同性を有する。典型的に、天然に存在する骨形成 (o s t e o g e n i c) タンパク質は前駆体として翻訳され、それは典型的に約 3 0 残基未満の N 末端シグナルペプチド配列を有し、その後続く「プロ」ドメインが切断されて、約 9 7 ~ 1 0 6 アミノ酸の成熟 C 末端ドメインが得られる。シグナルペプチドは、 V o n H e i j n e N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 1 4 , p p . 4 6 8 3 - 4 6 9 1 (1 9 8 6) の方法を用いて所与の配列において予測可能な切断部位において、翻訳の際に迅速に切断される。プロドメインは典型的に、完全にプロセシングされた成熟 C 末端ドメインの約 3 倍の大きさである。

40

【 0 0 4 5 】

B M P タンパク質ファミリーメンバーの別の特徴は、二量化するという明らかな能力である。いくつかの骨由来骨形成タンパク質 (O P) および B M P は、活性形においてホモおよびヘテロ二量体であることが見出されている。 O P および B M P がヘテロ二量体を形成する能力は、骨形成タンパク質に付加的な、または変更された形態形成誘導能力を与えてもよい。ヘテロ二量体は、 O P および B M P 受容体分子に対してホモ二量体とは質的または量的に異なる結合親和性を示すかもしれない。結合親和性が変わること、異なるシ

50

グナリング経路に介在する受容体の異なる活性化がもたらされてもよく、その結果最終的には異なる生物活性または結果がもたらされてもよい。結合親和性の変更が組織または細胞型に特異的な態様で現れることによって、特定の前駆細胞型のみを誘導して増殖および/または分化を起こしてもよい。

【0046】

好ましい実施形態において、一对の骨形成 (osteogenic) または形態形成 (morphogenic) ポリペプチドのアミノ酸配列は、その各々が参照骨形成タンパク質のアミノ酸配列との決定された関係を有する配列を含む。本明細書において、好ましい骨形成または形態形成ポリペプチドは、活性ヒトOP-1、SEQ ID NO: 1中に存在する配列との決定された関係を有する。しかし、本明細書に開示される天然に存在する配列または生合成配列のあらゆる1つまたはそれ以上が同様に参照配列として用いられてもよい。好ましい骨形成または形態形成ポリペプチドは、ヒトOP-1の少なくともC末端6システインドメイン、すなわちSEQ ID NO: 1の残基335~431との決定された関係を有する。好ましくは、骨形成または形態形成ポリペプチドは、ヒトOP-1の少なくともC末端7システインドメイン、すなわちSEQ ID NO: 1の残基330~431との決定された関係を有する。すなわち、骨形成活性を有する二量体タンパク質中の好ましいポリペプチドの各々は、参照配列に対応する配列またはそれと機能的に同等の配列を含む。

10

【0047】

機能的に同等の配列は、参照配列内に配置されたシステイン残基の機能的に同等の配置を含み、それはこれらのシステインの線形的配置を変えても二量体骨形成タンパク質の折り畳まれた構造におけるそれらの関係を物質的に損なわないようなアミノ酸挿入または欠失を含み、そこにはこれらのシステインが形態形成活性のために必要であり得るこうした鎖内または鎖間ジスルフィド結合を形成する能力が含まれる。機能的に同等の配列は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が、たとえばヒトOP-1のC末端7システインドメイン (本明細書においては保存された7システイン骨格とも呼ばれる) などの参照配列の対応する残基と異なっているような配列をさらに含むが、ただしこの相違はその配列の生物活性に影響しないものとする。したがって、参照配列中の対応するアミノ酸の保存的置換が好ましい。参照配列中の対応する残基に対する保存的置換であるアミノ酸残基とは、対応する参照残基と物理的または機能的に類似の残基、たとえば類似のサイズ、形、電荷、共有結合もしくは水素結合の形成能力を含む化学的性質、またはその類似物を有する残基などである。特に好ましい保存的置換は、その教示が本明細書において引用により援用される上記のDayhoff et al.において許容される点突然変異に対して定義された基準を満たすものである。

20

30

【0048】

骨形成タンパク質OP-1は説明されている (たとえば、本明細書において引用により援用されるOppermannら、米国特許第5,354,557号などを参照)。成熟した未変性形の天然由来骨形成 (osteogenic) タンパク質はグリコシル化された二量体であって、典型的にはSDS-PAGEによって決定される約30~36kDaの見かけの分子量を有する。還元されると、30kDaのタンパク質は約16kDaおよび18kDaの見かけの分子量を有する2つのグリコシル化ペプチドサブユニットを生じる。還元された状態では、このタンパク質は検出可能な骨形成活性を有さない。非グリコシル化タンパク質も骨形成活性を有し、これは約27kDaの見かけの分子量を有する。還元されると、この27kDaのタンパク質は約14kDaから16kDaの分子量を有する2つの非グリコシル化ポリペプチドを生じ、これは哺乳動物における軟骨内性骨形成を誘導できる。骨形成 (osteogenic) タンパク質は、異なるグリコシル化パターン、異なるN末端を有する形、および未変性タンパク質の活性切断型または変異型を含んでもよい。上述のとおり、特に有用な配列は、DPP (Drosophila由来)、Vg1 (Xenopus由来)、Vgr-1 (マウス由来)、OP-1およびOP-2タンパク質 (本明細書において引用により援用される米国特許第5,011,691号およ

40

50

びOppermann et al.を参照))、ならびにBMP - 2、BMP - 3、BMP - 4 (本明細書において引用により援用される国際公開88/00205号、米国特許第5,013,649号および国際公開91/18098号を参照)、BMP - 5およびBMP - 6 (本明細書において引用により援用される国際公開90/11366号、国際出願PCT/US90/01630号を参照)、BMP - 8およびBMP - 9と呼ばれるタンパク質のC末端の96または102アミノ酸配列を含む配列を含む。

【0049】

本発明の好ましい骨形成(osteogenic)タンパク質または形態形成(morphogenic)タンパク質は、OP - 1 (BMP - 7)、OP - 2、OP - 3、COP - 1、COP - 3、COP - 4、COP - 5、COP - 7、COP - 16、BMP - 2、BMP - 3、BMP - 3b、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、BMP - 9、BMP - 10、BMP - 11、BMP - 12、BMP - 13、BMP - 14、BMP - 15、BMP - 16、BMP - 17、BMP - 18、GDF - 1、GDF - 2、GDF - 3、GDF - 5、GDF - 6、GDF - 7、GDF - 8、GDF - 9、GDF - 10、GDF - 11、GDF - 12、MP121、CDMP - 1、CDMP - 2、CDMP - 3、ドルサルリン1、DPP、Vg - 1、Vgr - 1、60Aタンパク質、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、NEURAL、その種相同体を含むアミノ酸配列変異体および相同体ならびにその断片を含むがこれらに限定されない少なくとも1つのポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、このタンパク質は、OP - 1 (BMP - 7)、OP - 2、OP - 3、BMP - 2、BMP - 3、BMP - 3b、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、BMP - 9、BMP - 10、BMP - 11、BMP - 14、BMP - 15、BMP - 16、BMP - 17、BMP - 18、その種相同体を含むアミノ酸配列変異体および相同体ならびにその断片を含むがこれらに限定されない少なくとも1つのポリペプチドを含む。他の実施形態において、このタンパク質は、GDF - 1、GDF - 2、GDF - 3、GDF - 5、GDF - 6、GDF - 7、CDMP - 1、CDMP - 2、CDMP - 3、その種相同体を含むアミノ酸配列変異体および相同体ならびにその断片を含むがこれらに限定されない少なくとも1つのポリペプチドを含む。このタンパク質は、以下から選択される少なくとも1つのポリペプチドを含む：好ましくは、OP - 1 (BMP - 7)、BMP - 2、BMP - 4、BMP - 5、BMP - 6、GDF - 5、GDF - 6、GDF - 7、CDMP - 1、CDMP - 2またはCDMP - 3；より好ましくは、OP - 1 (BMP - 7)、BMP - 5、BMP - 6、GDF - 5、GDF - 6、GDF - 7、CDMP - 1、CDMP - 2またはCDMP - 3；さらにより好ましくは、OP - 1 (BMP - 7)、BMP - 5またはBMP - 6；最も好ましくはOP - 1 (BMP - 7)。

【0050】

これらの配列ならびにその化学的および物理的性質を開示する出版物は、以下を含む：

【0051】

【化 1】

OP-1 および OP-2 (米国特許第 5,011,691 号;
 米国特許第 5,266,683 号; Ozkaynak et al., EMBO J., 9,
 pp. 2085-2093 (1990); OP-3 (WO94/10203 (PCT
 US93/10520)); BMP-2, BMP-3, BMP-4, (WO88/00205; Wozney
 et al. Science, 242, pp. 1528-1534 (1988)); BMP-5 および
 BMP-6, (Celeste et al., PNAS, 87, 9843-9847 (1991));
 Vgr-1 (Lyons et al., PNAS, 86, pp. 4554-4558 (1989));
 DPP (Padgett et al. Nature, 325, pp. 81-84 (1987)); Vg-
 1 (Weeks, Cell, 51, pp. 861-867 (1987)); BMP-9
 (WO95/33830 (PCT/US95/07084); BMP-10 (WO94/26893
 (PCT/US94/05290); BMP-11 (WO94/26892 (PCT/US94/05288);
 BMP-12 (WO95/16035 (PCT/US94/14030); BMP-13 (WO95/16035
 (PCT/US94/14030); GDF-1 (WO92/00382 (PCT/US91/04096)
 および Lee et al. PNAS, 88, pp. 4250-4254 (1991); GDF-8
 (WO94/21681 (PCT/US94/03019); GDF-9 (WO94/15966
 (PCT/US94/00685); GDF-10 (WO95/10539 (PCT/US94/11440);
 GDF-11 (WO96/01845 (PCT/US95/08543); BMP-15 (WO96/36710
 (PCT/US96/06540); MP-121 (WO96/01316 (PCT/EP95/02552);
 GDF-5 (CDMP-1, MP52) (WO94/15949 (PCT/US94/00657) および
 WO96/14335 (PCT/US94/12814) および WO93/16099
 (PCT/EP93/00350)); GDF-6 (CDMP-2, BMP13) (WO95/01801
 (PCT/US94/07762) および WO96/14335 および WO95/10635
 (PCT/US94/14030)); GDF-7 (CDMP-3, BMP12) (WO95/10802
 (PCT/US94/07799) および WO95/10635 (PCT/US94/14030)); BMP-
 17 および BMP-18 (米国特許第 6,027,917 号) .

10

20

30

上記の出版物は本明細書において引用により援用される。

【 0 0 5 2 】

別の実施形態において、有用なタンパク質は生物的に活性な生合成構成物を含み、そこには新規の生合成骨形成タンパク質および 2 つまたはそれ以上の公知の骨形成タンパク質からの配列を用いて設計されたキメラタンパク質が含まれる。

40

【 0 0 5 3 】

本発明の好ましい実施形態の 1 つにおいて、骨形成タンパク質はジスルフィド結合されて二量体種を生じる一対のサブユニットを含み、そのサブユニットの少なくとも 1 つは BMP タンパク質ファミリーに属する組換えペプチドを含む。本発明の別の好ましい実施形態において、骨形成タンパク質は非共有の相互作用によって形成された二量体種を生じる一対のサブユニットを含み、そのサブユニットの少なくとも 1 つは BMP タンパク質ファミリーに属する組換えペプチドを含む。非共有の相互作用は、ファンデルワールス、水素結合、疎水性相互作用および静電相互作用を含む。二量体種はホモ二量体またはヘテロ二量体であってもよく、細胞増殖および / または組織形成を誘導できる。他の好ましい実施形態において、骨形成タンパク質は単量体である。

50

【0054】

特定の好ましい実施形態において、本明細書において有用な骨形成タンパク質は、前述の天然に存在するタンパク質から選択された参照骨形成タンパク質と少なくとも70%のアミノ酸配列相同性または「類似性」を有し、好ましくは75%、80%、85%、90%、95%、または98%の相同性または類似性を有する配列を含むアミノ酸配列を有するものを含む。好ましくは参照タンパク質はヒトOP-1であり、その参照配列は骨形成活性を有する形のヒトOP-1に存在するC末端7システインドメイン、すなわちSEQ ID NO: 1の残基330~431である。特定の実施形態において、参照骨形成ポリペプチドと機能的に同等であることが推測されるポリペプチドは、Alignプログラム(DNAstar、Inc.)などのコンピュータプログラムによって便利に実施される上記のNeedlemanらの方法を用いて、参照骨形成ポリペプチドと整列される。上記に示したとおり、候補と参照配列とのアミノ酸配列相同性または同一性のレベルとして従来から表わされる定義済みの関係を算出する目的のために、候補配列中の内部ギャップおよびアミノ酸挿入は無視される。

10

【0055】

本明細書において、「アミノ酸配列相同性」とはアミノ酸配列の同一性および類似性の両方を含むと理解される。相同配列は同一および/または類似のアミノ酸残基を有し、ここで類似の残基とは整列した参照配列中の対応するアミノ酸残基の保存的置換または「許容される点突然変異」である。よって、参照配列と70%のアミノ酸相同性を有する候補ポリペプチド配列においては、整列した残基のうちいずれか70%が参照配列中の対応残基と同一であるか、またはその保存的置換である。現在好ましい実施形態において、参照配列はOP-1である。したがって、本明細書において有用な骨形成タンパク質は、好ましい参照配列の対立遺伝子および系統的対応物ならびにその他の変異体を含み、それは天然に存在するかまたは生合成により生成されたものであり(例、「ムテイン」または「突然変異タンパク質」を含む)、さらにタンパク質の一般的な形態形成ファミリーの新規のメンバーを含み、そこには上記に示して識別したものが含まれる。特定の特に好ましい骨形成ポリペプチドは、ヒトOP-1の好ましい参照配列と少なくとも60%のアミノ酸同一性を有し、さらにより好ましくは参照配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%のアミノ酸同一性を有する。

20

【0056】

別の実施形態において、有用なタンパク質は、本明細書において定義したとおり、保存された7システインドメインを有し、かつC末端活性ドメインにおいて少なくとも70%のアミノ酸配列相同性(類似性)を有するタンパク質を含む。

30

【0057】

さらに別の好ましい実施形態において、有用な活性タンパク質は、低い、中程度または高い厳密性のハイブリダイゼーション条件下で、参照骨形成配列をコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズする核酸にコードされる配列を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド鎖を有し、その参照骨形成配列は、たとえばOP-1、OP-2、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、60A、GDF-3、GDF-5、GDF-6、GDF-7、およびその類似物の保存された7システインドメインを決定するC末端配列などである。本明細書において用いられる高い厳密性のハイブリダイゼーション条件とは、40%のホルムアミド、5X SSPE、5Xデンハート液、および0.1%のSDS中で37 にて一晩おき、0.1X SSPE、0.1%のSDS中で50 にて洗浄するという公知の技術に従ったハイブリダイゼーションとして定義される。標準的な厳密な条件は、商業的に入手可能な標準的な分子クローニングのテキストにおいてよく特徴付けられている。たとえば、その開示を本明細書において引用により援用するMolecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版、Sambrook編, FritschおよびManiatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover編, 1985); Oligonu

40

50

c l e o t i d e S y n t h e s i s (M . J . G a i t 編 , 1 9 8 4) : N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n (B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編 . 1 9 8 4) ; および B . P e r b a l , A P r a c t i c a l G u i d e T o M o l e c u l a r C l o n i n g (1 9 8 4) など を 参 照 さ れ たい。

【 0 0 5 8 】

上記に示したとおり、本発明において有用なタンパク質は一般的に、上記のポリペプチドの折畳まれた対を含む二量体タンパク質である。こうした骨形成タンパク質は還元されたときには不活性であるが、酸化ホモ二量体のとき、および本発明の他のタンパク質と組合せて酸化されてヘテロ二量体を生成するときは活性である。よって、形態形成活性を有するタンパク質中の骨形成ポリペプチドの折畳まれた対のメンバーは、上記において言及した特定のポリペプチドのいずれかから独立して選択されてもよい。いくつかの実施形態において、骨形成タンパク質は単量体である。

10

【 0 0 5 9 】

本発明の材料および方法において有用な骨形成タンパク質は、上に記載したポリペプチド鎖のいずれかを含むタンパク質を含み、それは天然に存在する供給源から単離されても、組換えDNAまたはその他の合成技術によって生成されてもよく、そこにはこれらのタンパク質の対立遺伝子および系統的対応物変異体、ならびにそのムテイン、その断片およびさまざまな切断型および融合構成物が含まれる。欠失または付加変異体も活性であると考えられ、そこには保存されたC末端の6または7システインドメインを変更し得る変異体が含まれるが、ただしその変更は折畳まれた構造におけるこれらのシステインの関係を機能的に阻害しないものとする。したがって、こうした活性形は本明細書に開示される特定の記載された構成物と同等のものと考えられる。このタンパク質は、さまざまなグリコシル化パターン、さまざまなN末端、アミノ酸配列相同性の領域を有する関連タンパク質のファミリー、および天然または生合成タンパク質の活性切断型または変異型を有する形を含んでもよく、それは宿主細胞における組換えDNAの発現によって生成されてもよい。

20

【 0 0 6 0 】

本明細書において予期される骨形成タンパク質は、原核または真核宿主細胞中で完全型もしくは切断型のcDNAまたは合成DNAから発現されて、精製、切断、再折畳みおよび二量化されることによって形態形成活性を有する組成物を形成してもよい。現在好ましい宿主細胞は、E. coliを含む原核生物または酵母を含む真核生物、または哺乳動物細胞、たとえばCHO、COSもしくはBSC細胞などを限定的でなく含む。当該技術分野の通常の当業者は、その他の宿主細胞が有効に用いられ得ることを認めるであろう。本発明の実施において有用な骨形成タンパク質の詳細な説明は、その作成、使用および骨形成活性のテストの方法を含めて、多数の出版物に開示されており、そこにはその開示が本明細書において引用により援用される米国特許第5,266,683号および第5,011,691号、ならびにその開示が本明細書において引用により援用される本明細書中で引用される出版物のいずれかが含まれる。

30

【 0 0 6 1 】

よって、熟練した遺伝子工学者は、本開示および当該技術分野において入手可能な知識に鑑みて、cDNAまたはさまざまな異なる生物種のゲノムライブラリーから適切なアミノ酸配列をコードする遺伝子を単離するか、またはオリゴヌクレオチドからDNAを構築でき、次いで原核生物および真核生物の両方を含むさまざまなタイプの宿主細胞中でその遺伝子を発現させて、哺乳動物中の骨および軟骨形成を刺激できる大量の活性タンパク質を生成できる。加えて、熟練作業者はインピボで本発明のタンパク質を発現する核酸分子も調製できる。

40

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態において、骨形成タンパク質は、OP-1、OP-2、OP-3、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-15、BMP

50

- 16、BMP - 17、BMP - 18、DPP、Vg1、Vgr、60Aタンパク質、GDF - 1、GDF - 2、GDF - 3、GDF - 5、GDF - 6、GDF - 7、GDF - 8、GDF - 9、GDF - 10、GDF - 11、GDF - 12、CDMP - 1、CDMP - 2、CDMP - 3、NODAL、UNIVIN、SCREW、ADMP、NEURAL、およびそのアミノ酸配列変異体を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、骨形成タンパク質は、ヒトOP - 1の保存された7システインドメインを含むC末端102 ~ 106アミノ酸と少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、前記骨形成タンパク質は骨および/または軟骨の欠損の修復を誘導できる。

【0063】

好ましい実施形態において、骨形成タンパク質はOP - 1、BMP - 5、BMP - 6、GDF - 5、GDF - 6およびGDF - 7、CDMP - 1、CDMP - 2またはCDMP - 3である。より好ましい実施形態において、骨形成タンパク質はOP - 1、BMP - 5またはBMP - 6である。最も好ましい実施形態において、骨形成タンパク質はOP - 1である。

10

【0064】

BMPに対する中和抗体を検出するためのアッセイ

本発明は、サンプル中の骨形成タンパク質(BMP)に対する中和抗体を検出する方法を提供する。中和抗体の可能性のあるものを含有するサンプルを、前記BMPへの露出によって発現が調節され得る少なくとも1つの内因性遺伝子を含むBMP応答性細胞とともにインキュベートする前に、まずBMPと接触させる。BMP応答性細胞からmRNAを単離した後に、逆転写反応を用いて前記mRNAに対応するcDNAを調製することによって、前記内因性遺伝子の発現を決定する。次いで、このcDNAを定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(QPCR)によって増幅する。増幅された内因性遺伝子の量を決定して、BMPのみに接触させた対照細胞から増幅された同じ内因性初期遺伝子の量と比較する。増幅された内因性遺伝子の量が、BMPのみに接触させた対照細胞から増幅された同じ内因性遺伝子の量よりも少ないかまたは多いときに、サンプル中の中和抗体の存在が検出される。いくつかの実施形態において、増幅された遺伝子の量は対照細胞から増幅された同じ内因性遺伝子の量よりも多い。他の実施形態において、増幅された遺伝子の量は対照細胞から増幅された同じ内因性遺伝子の量よりも少ない。

20

【0065】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(QPCR)によって、サンプル処理した細胞のcDNAからハウスキーピング遺伝子を増幅するステップと、増幅された前記ハウスキーピング遺伝子の量を決定するステップとをさらに含む。次いで、ハウスキーピング遺伝子の決定された量を用いて、内因性初期遺伝子の決定された量を正規化する。遺伝子発現を内因性遺伝子のものに対して正規化することによって、アッセイ内およびアッセイ間のばらつきを制御できる。

30

【0066】

いくつかの実施形態においては、アッセイが適切に機能していることを確認するために、正および負の対照サンプルによって誘導される応答を決定する。典型的に、負の対照はBMPに露出されていない対象からの血清サンプルである。いくつかの場合には、負の対照サンプルは未処置の対象からのプール血清サンプルであってもよい。負の対照サンプルは、BMPのみにによって誘導される生物応答を測定する。いくつかの実施形態においては、一体化した負の対照として働く、サンプル添加前のBMPおよび細胞から生物活性を読取る。

40

【0067】

いくつかの実施形態において、対照は、BMPで処理された対象からの血清サンプルを含む。他の実施形態において、対照は、BMPで処理された対象からの血清サンプルを含み、さらに陽性中和抗体を含む。いくつかの実施形態において、血清サンプルはプールされる。他の実施形態において、血清はヒト血清である。

【0068】

50

付加的な対照は、ある範囲のＢＭＰ濃度を含有する標準溶液を含んでもよい。これらの標準をテストサンプルの不在下で細胞とともに個々にインキュベートすることによって、変化するＢＭＰ濃度において誘導される生物応答のプロファイルを生成する。

【００６９】

テストサンプルによって誘導される応答を標準によって誘導される応答と比較することによって、テストサンプル中に含まれる中和活性の定量化が可能になる。たとえば、テストサンプルに用いられたＢＭＰ濃度の５０％を含有する標準に等しい応答を誘導したテストサンプルは、ＢＭＰ活性の５０％を中和したことになる。これらの比較を用いて、各テストサンプルに対して中和活性の単位を決定してもよい。

【００７０】

いくつかの実施形態において、中和抗体の可能性のあるものを含有するサンプルをまずＢＭＰと接触させる。アッセイに用いられるＢＭＰの量は、細胞中の生物応答を誘導するために十分な量である。しかし、細胞中の最大の生物応答を誘導するために十分な量を超えない量のＢＭＰが用いられるときに、中和抗体の検出は最も感度が高い。この量を超えるＢＭＰは、アッセイ読出しを検出可能なほど変えることなくサンプル内の中和抗体に結合する可能性がある。

【００７１】

ＢＭＰの量は、アッセイのパラメータ、たとえば使用される細胞の量、アッセイ容器のサイズ、およびＢＭＰに対する細胞の感受性などによって変動する。ＢＭＰの量を滴定することによって、過剰なＢＭＰによってアッセイを飽和させることなく細胞中の生物応答を誘導するために十分な最適濃度（または「有効濃度」）を決定できる。

【００７２】

いくつかの実施形態において、アッセイに用いられるＢＭＰの濃度は以下のとおりであってもよい：少なくとも１ｐｇ／ｍＬ、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも１ｎｇ／ｍＬ、少なくとも１０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも１５ｎｇ／ｍＬ、少なくとも２０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも２５ｎｇ／ｍＬ、少なくとも３０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも４０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも５０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも６０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも７０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも８０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも９０ｎｇ／ｍＬ、少なくとも１００ｎｇ／ｍＬ、少なくとも２００ｎｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｎｇ／ｍＬ、少なくとも１μｇ／ｍＬ、少なくとも１００μｇ／ｍＬ、少なくとも５００μｇ／ｍＬ、または少なくとも１ｍｇ／ｍＬ。

【００７３】

いくつかの実施形態において、本発明のサンプルは、中和抗体またはタンパク質を含有し得るあらゆる体液であってもよい。例として、血液、血清、リンパ、血漿、滑液、脳脊髄液、涙、生検または組織サンプル、細胞懸濁液、唾液、口腔液、粘液、羊水、初乳、乳腺分泌物、尿、汗、および組織培養培地を含むがこれらに限定されない。

【００７４】

いくつかの実施形態において、本発明のサンプルを複数の希釈度でアッセイすることによって、サンプル中に存在する中和活性の正確な定量化を得てもよい。各サンプルが希釈された量に基づいて、各サンプル中の中和活性の単位を算出してもよい。

【００７５】

いくつかの実施形態において、本発明のサンプルを希釈することによって、サンプルの非特異的なバックグラウンド構成要素による干渉を避けてもよい。たとえば、血清中に高濃度見出されるタンパク質は、いくつかの条件においてアッセイの構成要素と非特異的に相互作用してアッセイの感度を低減させることがある。サンプル希釈によって非特異的結合を低減または除去することによって、アッセイのシグナル対ノイズ比を増加させてもよい。

【００７６】

いくつかの実施形態において、本発明のサンプルは希釈せずにアッセイされてもよい。他の実施形態において、本発明のサンプルは、たとえば１：１、１：２、１：５、１：１

10

20

30

40

50

0、1:15、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:80、1:1000、1:5000、1:10000、または1:50000などの希釈係数にてアッセイされてもよい。他の実施形態において、本発明のサンプルはさらに大きい希釈係数にてアッセイされてもよい。

【0077】

いくつかの実施形態において、本発明のBMP応答性細胞は、BMP受容体を発現してBMPに誘導されるタンパク質シグナリングの形質導入を可能にすることによって、BMPと細胞受容体との相互作用に応答して遺伝子発現制御要素の活性化をもたらすような、細胞のあらゆる集団であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明のアッセイは1個の細胞または細胞の集団を用いてもよい。いくつかの実施形態において、BMP応答性細胞は、A549、SAOS-2、ROSおよびCSC12を含むがこれらに限定されない。他の実施形態において、BMP応答性細胞はA549細胞である。いくつかの実施形態において、BMP応答性細胞は、骨髄、脂肪または筋肉のいずれかに由来する一次間質細胞を含むがこれに限定されない。

10

【0078】

細胞は、本発明のアッセイに用いられるときには、通常の細胞生育のために適切なあらゆる密度で生育される。適切な密度を得るために用いられる細胞の数は、部分的にはアッセイに用いられる組織培養皿またはプレートのサイズおよび表面積によって決められる。

【0079】

アッセイにおいて細胞はあらゆる密度で用いられてもよい。いくつかの実施形態において、細胞はアッセイにおいて以下の細胞密度にて用いられてもよい：少なくとも10%コンフルエント、少なくとも25%コンフルエント、少なくとも50%コンフルエント、少なくとも80%コンフルエント、少なくとも90%コンフルエント、または少なくとも99%コンフルエント。

20

【0080】

いくつかの実施形態において、細胞は本発明のアッセイにおいて以下の濃度にて用いられる：少なくとも $1 \times 10^3 / \text{mL}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^4 / \text{mL}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^5 / \text{mL}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 / \text{mL}$ 、または少なくとも $1 \times 10^7 / \text{mL}$ 。いくつかの実施形態においては、1細胞/サンプルから 10^9 細胞/サンプルが本発明のアッセイにおいて用いられてもよい。

30

【0081】

いくつかの実施形態において、細胞は細胞系である。いくつかの実施形態において、細胞は対象から単離されてエキスピボで培養された細胞である。

【0082】

いくつかの実施形態において、本発明の細胞は哺乳動物または非哺乳動物のものであってもよい。細胞は、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスターおよびその他の脊椎動物種を含むがこれらに限定されないあらゆる種のものであってもよい。細胞は、たとえば昆虫細胞などの非脊椎動物種からのものであってもよい。細胞は、たとえばバクテリア細胞などの原核細胞であってもよい。

40

【0083】

細胞は、当該技術分野において公知の技術のいずれかに従って培養されてもよい。細胞は、細胞培養に好適なあらゆる培養フラスコ、プレートまたは皿において生育されてもよい。細胞培養に適した培地、補助剤および培養条件は当業者に周知である。

【0084】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、BMPへの露出によって発現が調節され得る内因性初期遺伝子を測定する。内因性遺伝子の転写をモニタすることは、レポーター遺伝子を駆動する短いプロモーター領域を含有する組換え構成物からの発現を測定することよりも、インピボ活性をよりよく反映する。さらに、BMP処置の後に初期に遺伝子発現を測定することによって、より高いアッセイ特異性が得られ、かつ血清サンプル中に

50

見出される非BMP構成要素の干渉を受けにくくなる。たとえば、いくつかのヒト血清サンプルによって誘導される細胞毒性と、BMP応答要素に駆動されるルシフェラーゼレポーターアッセイにおける低いシグナル測定値とは明らかな相関関係がある。これに対して、QPCRアッセイの読取は細胞の生存性（毒性）に影響されなかった。

【0085】

いくつかの実施形態において、BMPへの露出によって発現が調節され得る内因性遺伝子は、表1に示される遺伝子から選択される遺伝子を含むがこれらに限定されない：

【0086】

【表1 - 1】

表1

10

遺伝子名	遺伝子記号
4-アミノ酪酸アミトランスフェラーゼ	ABAT
ATP結合カセット、サブファミリーA (ABC1)、メンバー1	ABCA1
アクチン、アルファ、心筋	ACTC
ディスインテグリン様およびメタロプロテアーゼ(レプロリシンタイプ)およびトロンボスポンジンtp	ADAMTS9

遺伝子名	遺伝子記号
ディスインテグリン様およびメタロプロテアーゼ(レプロリシンタイプ)およびトロンボスポンジンtp	ADAMTS9
ADAMTS様3	ADAMTSL3
AF15q14タンパク質	AF15Q14
染色体1qからのALL1融合遺伝子	AF1Q

20

【0087】

【表 1 - 2】

遺伝子名	遺伝子記号
伝子///染色体1qからのAL L1融合遺伝子	
アグリカン1(硫酸コンドロイチンプロテオグリカン1、大型凝集プロテオグリカン)	AGC1
アグリカン1(硫酸コンドロイチンプロテオグリカン1、大型凝集プロテオグリカン)	AGC1
アグリカン1(硫酸コンドロイチンプロテオグリカン1、大型凝集プロテオグリカン)	AGC1
Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質(グラビン)12	AKAP12
Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質(グラビン)12	AKAP12
Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質(グラビン)12	AKAP12
Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質7	AKAP7
アルカリホスファターゼ、肝臓/骨/腎臓	ALPL
アデニルメチオニンデカルボキシラーゼ1	AMD1
アデニルメチオニンデカルボキシラーゼ1	AMD1
アンフォテリン誘導遺伝子2	AMIGO2
アンジオポエチン様2	ANGPTL2
アンジオポエチン様2	ANGPTL2
アンジオポエチン様2	ANGPTL2
アニリン、アクチン結合タンパク質(scraps相同体、Drosophila)	ANLN
アニリン、アクチン結合タンパク質(scraps相同体、Drosophila)	ANLN
炭疽毒素受容体1	ANTXR1
炭疽毒素受容体1	ANTXR1
アポリポタンパク質B mRNA編集酵素、触媒ポリペプチド様3B	APOBEC3B
Rho GTPアーゼ活性化タンパク質21	ARHGAP21
ADPリボシル化因子様7	ARL7
ADPリボシル化因子様7	ARL7

遺伝子名	遺伝子記号
アスボリン(LRRクラス1)	ASPN
ATPアーゼファミリー、AAAドメイン含有2	ATAD2
Atonal相同体8 (Drosophila)	ATOH8
Atonal相同体8 (Drosophila)	ATOH8
ATPアーゼ、Na ⁺ /K ⁺ 輸送、ベータ1ポリペプチド	ATP1B1
オーロキナーゼB	AURKB
BMPおよびアクチン膜結合阻害物質相同体(Xenopus laevis)	BAMBI
塩基性ヘリックスルーパーヘリックスドメイン含有、クラスB、2	BHLHB2
バキュロウイルスIAPリピート含有5(サバイビン)	BIRC5
バキュロウイルスIAPリピート含有5(サバイビン)	BIRC5
バキュロウイルスIAPリピート含有5(サバイビン)	BIRC5
バソヌクリン2	BNC2
乳癌1、早発性	BRCA1
BTB(POZ)ドメイン含有14A	BTBD14A
塩基性転写要素結合タンパク質1	BTEB1
BUB1ベンズイミダゾール非阻害出芽1相同体ベータ(酵母)	BUB1B
染色体10オープンリーディングフレーム3	C10orf3
染色体18オープンリーディングフレーム1	C18orf1
染色体18オープンリーディングフレーム24	C18orf24
C1qおよび腫瘍壊死因子関連タンパク質1///C1qおよび腫瘍壊死因子	C1QTNF1
C1qおよび腫瘍壊死因子関連タンパク質5	C1QTNF5
染色体20オープンリーディングフレーム	C20orf129

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【表 1 - 3】

遺伝子名	遺伝子記号
レーム129	
染色体20オープンリーディング フレーム39	C20orf39
染色体20オープンリーディング フレーム82	C20orf82
染色体22オープンリーディング フレーム18	C22orf18
染色体2オープンリーディングフレ ーム31／／染色体2オープンリ ーディングフレーム31	C2orf31
カルシトニン関連ポリペプチド 、ベータ	CALCB
カスパーゼ動員ドメインファミリー 、メンバー10	CARD10
ケモカイン(C-Cモチーフ) リガンド2	CCL2
サイクリンB1	CCNB1
サイクリンB1	CCNB1
サイクリンB2	CCNB2
サイクリンE2	CCNE2
CD24抗原(小細胞肺癌クラ スター4抗原)	CD24
CD24抗原(小細胞肺癌クラ スター4抗原)	CD24
CD24抗原(小細胞肺癌クラ スター4抗原)	CD24
CD24抗原(小細胞肺癌クラ スター4抗原)	CD24
CD24抗原(小細胞肺癌クラ スター4抗原)	CD24
細胞分裂サイクル2、G1からSお よびG2からM	CDC2
細胞分裂サイクル2、G1からSお よびG2からM	CDC2
CDC20細胞分裂サイクル20 相同体(S. cerevisiae)	CDC20
CDC6細胞分裂サイクル6相同体 (S. cerevisiae)	CDC6
CDC6細胞分裂サイクル6相同体 (S. cerevisiae)	CDC6
細胞分裂サイクル関連1	CDCA1

遺伝子名	遺伝子記号
細胞分裂サイクル関連3	CDCA3
サイクリン依存性キナーゼ阻 害物質1C(p57、Kip2)	CDKN1C
サイクリン依存性キナーゼ阻害物 質3(CDK2関連二重特異性ホス ファターゼ)	CDKN3
サイクリン依存性キナーゼ阻害物 質3(CDK2関連二重特異性ホス ファターゼ)	CDKN3
CCAAT／エンハンサー結合タン パク質(C／EBP)、アルファ	CEBPA
セントロメアタンパク質A、17kDa	CENPA
セントロメアタンパク質F、 350／400ka(マイトシン)	CENPF
クレアチンキナーゼ、脳	CKB
塩素細胞内チャネル3	CLIC3
コラーゲン、タイプXI、アルファ1	COL11A1
コラーゲン、タイプXIV、アルファ1 (アンジュリン)	COL14A1
コラーゲン、タイプIX、アルファ2	COL9A2
軟骨オリゴマーマトリックスタン パク質	COMP
コアプロモーター領域結合タン パク質	COPEB
コピンV	CPNE5
サイトカイン受容体様因子1	CRLF1
クリスタリン、アルファB	CRYAB
システインおよびグリシンリッチタ ンパク質2	CSRP2
システインおよびグリシンリッチタ ンパク質2	CSRP2
コンドロイチン硫酸シンターゼ3	CSS3
シスタチンA(ステフィンA)	CSTA
CTPシンターゼ	CTPS
カテプシンC	CTSC
サイトグロビン	CYGB
dachsous 1 (Drosophila)	DCHS1
DNA損傷誘導可能転写物4様	DDIT4L
DEPドメイン含有1	DEPDC1
DEPドメイン含有1	DEPDC1

10

20

30

40

【表 1 - 4】

遺伝子名	遺伝子記号
DEPDメイン含有1B	DEPDC1B
デオドナーゼ、ヨードチロニン、 タイプII	DIO2
デオドナーゼ、ヨードチロニン、 タイプII	DIO2
仮説上のタンパク質 DKFZp434B044	DKFZP434B044
仮説上のタンパク質 DKFZP761M1511	DKFZP761M1511
仮説上のタンパク質 DKFZp762A217	DKFZp762A217
仮説上のタンパク質 DKFZp762A217	DKFZp762A217
dickkopf 相同体1 (<i>Xenopus laevis</i>)	DKK1
discs, 大相同体7 (<i>Drosophila</i>)	DLG7
遠位欠失ホモボックス1	DLX1
遠位欠失ホモボックス2	DLX2
遠位欠失ホモボックス3	DLX3
遠位欠失ホモボックス5	DLX5
遠位欠失ホモボックス6	DLX6
遠位欠失ホモボックス6	DLX6
ダイニン、細胞質、中間ポリペ チド1	DNC11
二重特異性ホスファターゼ2	DUSP2
二重特異性ホスファターゼ4	DUSP4
二重特異性ホスファターゼ6	DUSP6
ジスフェリン、肢帯型筋ジストロ フィー2B(常染色体劣性)	DYSF
細胞外マトリックスタンパク質2、 女性器官および脂肪細胞特異 的	ECM2
内皮分化、スフィンゴ脂質Gタン パク質結合受容体、3	EDG3
エンドセリン1	EDN1
エンドセリン受容体タイプA	EDNRA
エンドセリン受容体タイプA	EDNRA
エンドセリン受容体タイプA	EDNRA
EFハンドドメイン含有1	EFHD1

遺伝子名	遺伝子記号
初期増殖応答3	EGR3
真核生物翻訳開始因子2B、 サブユニット2ペーダ、39kDa	EIF2B2
エラスチン(大動脈弁上狭窄、 Williams-Beuren症候群)	ELN
外胚葉神経皮質 (BTB様ドメイン有)	ENC1
外胚葉神経皮質 (BTB様ドメイン有)	ENC1
凝固因子III (トロンボプラスチン、組織因子)	F3
脂肪酸結合タンパク質5 (乾癬関連)	FABP5
フィブリン2	FBLN2
Fボックスタンパク質5	FBXO5
フラップ構造特異的エンドヌクレ アーゼ1	FEN1
線維芽細胞増殖因子5	FGF5
線維芽細胞増殖因子7(ケラチノ サイト増殖因子)///仮説上の タンパク質	FGF7 /// FLJ30435
線維芽細胞増殖因子受容体3 (軟骨無形成症、致死性低身長 症)	FGFR3
線維芽細胞増殖因子受容体3 (軟骨無形成症、致死性低身長 症)	FGFR3
fidgetin様1	FIGNL1
仮説上のタンパク質 FLJ10156	FLJ10156
仮説上のタンパク質 FLJ10520	FLJ10520
仮説上のタンパク質 FLJ10719	FLJ10719
仮説上のタンパク質 FLJ20105	FLJ20105
仮説上のタンパク質 FLJ20701 ///仮説上の タンパク質FLJ20701	FLJ20701
仮説上のタンパク質 FLJ23191	FLJ23191
FLJ23311タンパク質	FLJ23311
仮説上のタンパク質	FLJ40629

10

20

30

40

【0090】

【表 1 - 5】

遺伝子名	遺伝子記号
FLJ40629	
フォークヘッドボックスM1	FOXM1
Fraser症候群1	FRAS1
frizzled関連タンパク質	FRZB
FtsJ相同体1 (E. coli)	FTSJ1
frizzled 相同体1 (Drosophila)	FZD1
frizzled 相同体8 (Drosophila) /// frizzled 相同体8 (Drosophila)	FZD8
frizzled 相同体8 (Drosophila)	FZD8
GABA (A) 受容体関連タンパク質様1	GABARAPL1
GABA (A) 受容体関連タンパク質様1	GABARAPL1
増殖分化因子5 (軟骨由来形態形成タンパク質1)	GDF5
成長ホルモン受容体	GHR
グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質)、アルファ阻害活性ポリペ	GNAI1
グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質)、ガンマ2	GNG2
ゴルジ関連PDZおよびコイルドコイルモチーフ含	GOPC
グリセロール-3-リン酸脱水素酵素1様	GPD1L
グレムリン1相同体、システインノットスーパーファミリー (Xenopus laevis)	GREM1
グレムリン2相同体、システインノットスーパーファミリー (Xenopus laevis)	GREM2
グレムリン2相同体、システインノットスーパーファミリー (Xenopus laevis)	GREM2
Gタンパク質結合受容体キナーゼ5	GRK5
G-2およびS相発現1	GTSE1
グリコゲニン2	GYG2
グリコゲニン2	GYG2
ヒアルロナンおよびプロテオ	HAPLN3

遺伝子名	遺伝子記号
グリカンリンクタンパク質3	
ヒアルロナンシンターゼ2	HAS2
ヒアルロナンシンターゼ3	HAS3
染色体縮合タンパク質G	HCAP-G
染色体縮合タンパク質G	HCAP-G
ヘリカーゼ、リンパ系特異的	HELLS
ヘリカーゼ、リンパ系特異的	HELLS
毛様/分裂エンハンサー、YRP Wモチーフ1 関連	HEY1
毛様/分裂エンハンサー、YRP Wモチーフ1 関連	HEY1
ヒアルロナン媒介運動性受容体 (RHAMM)	HMMR
ヒアルロナン媒介運動性受容体 (RHAMM)	HMMR
ヒスタミンN-メチルトランスフェラーゼ	HNMT
ヘテロ核リボヌクレオタンパク質D様	HNRPDL
熱ショック70kDaタンパク質2	HSPA2
HSPC150タンパク質、ユビキチン結合酵素と類似	HSPC150
DNA結合阻害物質1、ドミナントネガティブヘリックススループ-ヘリックスタンパク質	ID1
DNA結合阻害物質2、ドミナントネガティブヘリックススループ-ヘリックスタンパク質	ID2
DNA結合阻害物質3、ドミナントネガティブヘリックススループ-ヘリックスタンパク質	ID3
DNA結合阻害物質4、ドミナントネガティブヘリックススループ-ヘリックスタンパク質	ID4
DNA結合阻害物質4、ドミナントネガティブヘリックススループ-ヘリックスタンパク質	ID4
インスリン様成長因子1 (ソマトメジンC)	IGF1
インスリン様成長因子1 (ソマトメジンC)	IGF1
インスリン様成長因子結合タンパク質5	IGFBP5

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

【表 1 - 6】

遺伝子名	遺伝子記号
インスリン様成長因子結合タンパク質5	IGFBP5
インスリン様成長因子結合タンパク質5	IGFBP5
インスリン様成長因子結合タンパク質7	IGFBP7
インターロイキン6(インターフェロン、ベータ2)	IL6
インターロイキン7受容体///インターロイキン7受容体	IL7R
インターロイキン7受容体	IL7R
インターロイキン8	IL8
インヒビン、ベータA(アクチビンA、アクチビンABアルファポリペプチド)	INHBA
インヒビン、ベータA(アクチビンA、アクチビンABアルファポリペプチド)	INHBA
インテグリン、アルファ9	ITGA9
インフルエンザウイルスNS1A結合タンパク質	IVNS1ABP
jagged 1 (Alagille症候群)	JAG1
jagged 1 (Alagille症候群)	JAG1
カリウム電位開口型チャネル、Isk関連ファミリー、メンバー4	KCNE4
カリウムチャネル、サブファミリーK、メンバー2	KCNK2
カリウムチャネル四量体化ドメイン含有15	KCTD15
カリウムチャネル四量体化ドメイン含有15	KCTD15
KIAA0186遺伝子産物	KIAA0186
KIAA0527タンパク質	KIAA0527
KIAA1026タンパク質	KIAA1026
KIAA1102タンパク質	KIAA1102
KIAA1102タンパク質	KIAA1102
KIAA1102タンパク質	KIAA1102
KIAA1912タンパク質	KIAA1912
キネシンファミリーメンバー 11	KIF11
キネシンファミリーメンバー 14	KIF14
キネシンファミリーメンバー 20A	KIF20A
キネシンファミリーメンバー 23	KIF23
キネシンファミリーメンバー 2C	KIF2C

遺伝子名	遺伝子記号
キネシンファミリーメンバー 4A	KIF4A
v-kit Hardy-Zuckerman 4 ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子相同体	KIT
キネシン様7	KNSL7
カリオフェリンアルファ2(RAGコホート1、インボーチンアルファ1)///カリオフェリンアルファ2(RA	KPNA2
ケラチン7	KRT7
ケラチン関連タンパク質1-3 ///ケラチン関連タンパク質1-3	KRTAP1-3
ケラチン関連タンパク質2-4	KRTAP2-4
マウス肢芽および心臓遺伝子のオルソログの可能性///マウスliのオルソログの可能性	LBH
LIMドメイン結合3	LDB3
リンパ系エンハンサー結合因子1	LEF1
lunatic fringe 相同体 (Drosophila)	LFNG
レグマイン	LGMN
黄体ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体	LHCGR
LIMドメインキナーゼ2	LIMK2
lin-7相同体B(C. elegans)	LIN7B
lin-7相同体B(C. elegans)	LIN7B
ラミンB1	LMNB1
LIMドメインオンリー2 (ロンボチン様1)	LMO2
仮説上のタンパク質 LOC146909	LOC146909
仮説上のタンパク質 LOC150837	LOC150837
仮説上のタンパク質 LOC157570	LOC157570
仮説上のタンパク質 LOC163782	LOC163782
リボソームタンパク質L22と類似	LOC200916
仮説上のタンパク質 LOC201725	LOC201725
分泌タンパク質 LOC284013	LOC284013

10

20

30

40

【表 1 - 7】

遺伝子名	遺伝子記号
仮説上のタンパク質 LOC285705	LOC285705
仮説上のタンパク質 LOC285758	LOC285758
仮説上のタンパク質 LOC339924	LOC339924
仮説上LOC387763	LOC387763
ウロプラキン1と類似のテラスパ ニン	LOC90139
仮説上のタンパク質 LOC92270	LOC92270
ロイシンリッチリピートおよび免疫 グロブリン様ドメイン1///ロイ シンリッチリピート	LRIG1
低密度リボタンパク質受容体関 連タンパク質4	LRP4
ロイシンリッチリピート含有15	LRRC15
MAD2有糸分裂停止欠損様1 (酵母)	MAD2L1
MAD2有糸分裂停止欠損様1 (酵母)	MAD2L1
マイトジェン活性化タンパク質キ ナーゼキナーゼキナーゼ4	MAP3K4
メラノーマ細胞接着分子	MCAM
メラノーマ細胞接着分子	MCAM
メラノーマ細胞接着分子	MCAM
メラノーマ細胞接着分子	MCAM
MCM10ミニ染色体維持欠損10 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM10
MCM10ミニ染色体維持欠損10 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM10
MCM10ミニ染色体維持欠損10 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM10
MCM8ミニ染色体維持欠損8 (<i>S. cerevisiae</i>)	MCM8
母体胚性ロイシンジッパー キナーゼ	MELK

間充織ホメオボックス2(増殖停 止特異的ホメオボックス)	MEOX2
中胚葉特異的転写物相同体 (マウス)	MEST
乳脂肪小球EGF因子8タンパク質	MFGE8
抗p97(メラノーマ関連)、モノ クローナル抗体133. 2によって 同定	MFI2
仮説上のタンパク質 MGC13057	MGC13057
仮説上のタンパク質 MGC24103	MGC24103
チューブリン、ベータポリペプチド パラログ	MGC8685
モノグリセリドリパーゼ/// モノグリセリドリパーゼ	MGLL
モノグリセリドリパーゼ	MGLL
マトリクスGlaタンパク質	MGP
モノクローナル抗体Ki-67に よって同定された抗原	MKI67
モノクローナル抗体Ki-67に よって同定された抗原	MKI67
MLF1相互作用タンパク質	MLF1IP
髄膜腫(平衡転位の崩壊)1	MN1
ミトコンドリアリボソームタン パク質S6	MRPS6
mshホメオボックス相同体1 (<i>Drosophila</i>)	MSX1
mshホメオボックス相同体2 (<i>Drosophila</i>)	MSX2
more than blood 相同体	MTB
V-myb 骨髄芽球症ウイルス癌 遺伝子相同体(トリ)様1	MYBL1
NEDD4関連E3ユビキチンリガー ゼNEDL2	NEDL2
NIMA (never in mitosis gene a)関連キナーゼ2	NEK2
ネオゲニン相同体1(ニワトリ)	NEO1
ニューロピリン(NRP)およびトロ イド(TLL)様2	NETO2

10

20

30

40

【表 1 - 8】

遺伝子名	遺伝子記号
ニコチンアミドNメチルトランスフェラーゼ	NNMT
ノギン	NOG
核内受容体サブファミリー4、グループA、メンバー2	NR4A2
神経栄養因子ロシキナーゼ、受容体、タイプ2	NTRK2
核小体および紡錘関連タンパク質1	NUSAP1
核小体および紡錘関連タンパク質1	NUSAP1
Opa相互作用タンパク質5	OIP5
オルファクトメジン様2B	OLFML2B
PTPL1 関連RhoGAP1	PARG1
プロトカドヘリンベータ10	PCDHB10
プロトカドヘリンベータ14	PCDHB14
プロトカドヘリンベータ7	PCDHB7
DNA複製複合体GINSタンパク質PSF2	Pfs2
胎盤増殖因子、血管内皮増殖因子関連タンパク質	PGF
胎盤特異的8	PLAC8
プラスミノゲン活性化因子、組織	PLAT
プレクストリン相同ドメイン、ファミリーH(MyTH4ドメインを有する)メンバー2を含有	PLEKHH2
polo様キナーゼ4 (Drosophila)	PLK4
プレキシンA2	PLXNA2
ポドカリキシン様	PODXL
ポリメラーゼ(DNA用)、イプシロン2(p59サブユニット)	POLE2
ポリメラーゼ(DNA用)、イプシロン3(p17サブユニット)	POLE3
PTPRF相互作用タンパク質、結合タンパク質2(リプリンベータ2)	PPFIBP2
ペプチジルプロリルイソメラーゼF(シクロフィリンF)	PPIF
タンパク質ホスファターゼ1、制御(阻害)サブユニット3C	PPP1R3C
細胞質分裂のタンパク質制御	PRC1

遺伝子名	遺伝子記号
因子1	
プロリンアルギニンリッチ末端ロイシンリッチリピートタンパク質	PRELP
プライマーゼ、ポリペプチド2A、58kDa	PRIM2A
ペアード関連ホメオボックス2	PRRX2
プロテアーゼ、セリン、35	PRSS35
ホスホリボシルトランスフェラーゼドメイン含有1	PRTFDC1
プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ2(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲ	PTGS2
プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ2(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲ	PTGS2
タンパク質チロシンホスファターゼ様(触媒アルギニンに代えてプロリン)、メンバー	PTPLB
Rac、GTPアーゼ活性化タンパク質1	RACGAP1
RAD51 関連タンパク質1	RAD51AP1
RA制御核マトリックス関連タンパク質	RAMP
RA制御核マトリックス関連タンパク質	RAMP
網膜芽細胞腫様1(p107)	RBL1
RNA結合モチーフタンパク質24	RBM24
複製因子C(活性化因子1)3、38kDa	RFC3
ralGアニンヌクレオチド解離刺激物質様1	RGL1
Gタンパク質シグナリングの制御因子3	RGS3
Gタンパク質シグナリングの制御因子4	RGS4
ロンボイド、小脈様2 (Drosophila)	RHBDL2
Ras誘導老化1	RIS1
リボヌクレオチドレダクターゼM1ポリペプチド	RRM1
リボヌクレオチドレダクターゼM2ポリペプチド	RRM2
リボヌクレオチドレダクターゼM2	RRM2

10

20

30

40

【表 1 - 9】

遺伝子名	遺伝子記号
ポリペプチド	
stoned B/TFIIAアルファ/ベータ様因子//TFIIAアルファ/ベータ様因子	SALF /// ALF
不穏アルファモチーフドメイン含有11	SAMD11
シンデリン	SCIN
CTCL腫瘍抗原se57-1	SE57-1
セマドメイン、膜貫通ドメイン(TM)、および細胞質ドメイン、(セマフォリン)6D	SEMA6D
セマドメイン、膜貫通ドメイン(TM)、および細胞質ドメイン、(セマフォリン)6D	SEMA6D
セレン含有タンパク質P、血漿、1	SEPP1
セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害物質、クレイドB(オボアルブミン)、メンバー2	SERPINB2
セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害物質、クレイドE(ネキシン、プラスミノゲン活性化因子)	SERPINE1
セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害物質、クレイドE(ネキシン、プラスミノゲン活性化因子)	SERPINE1
セストリン3	SESN3
shugoshin様2(S. pombe)	SGOL2
SH2-B 相同体	SH2B
SHC SH2-ドメイン結合タンパク質1	SHCBP1
溶質輸送体ファミリー27(脂肪酸トランスポーター)、メンバー3	SLC27A3
溶質輸送体ファミリー40(鉄制御トランスポーター)、メンバー1	SLC40A1
SMAD、DPP相同体に対する母体6(Drosophila)	SMAD6
SMAD、DPP相同体に対する母体7(Drosophila)	SMAD7
SPARC関連モジュラーカルシウム結合1	SMOC1
カタツムリ相同体1 (Drosophila)	SNAI1
シヌクレイン、アルファ相互作用	SNCAIP

遺伝子名	遺伝子記号
タンパク質(シンフィリン)	
サイトカインシグナリングのサブレッサー2	SOCS2
硬結性骨化症	SOST
SRV(性決定領域Y)ボックス4	SOX4
SRV(性決定領域Y)ボックス4	SOX4
SRV(性決定領域Y)ボックス4	SOX4
SRV(性決定領域Y)ボックス4	SOX4
SRV(性決定領域Y)ボックス9(屈曲肢異形成症、常染色体性転換)	SOX9
Sp7転写因子	SP7
精子関連抗原5	SPAG5
動原体タンパク質Spc25	Spc25
腫瘍形成能の抑制7様	ST7L
シグナル伝達性転写因子4	STAT4
スタニオカルシン2	STC2
スタニオカルシン2	STC2
セリン/スレオニンキナーゼ6	STK6
セリン/スレオニンキナーゼ6	STK6
スルファターゼ2	SULF2
シナプトボジン2	SYNPO2
シナプトボジン2	SYNPO2
シナプトボジン2	SYNPO2
シナプトタグミンXV	SYT15
トランスフォーミング、酸性コイルドコイル含有タンパク質3	TACC3
TAFATタンパク質5	TAFAT5
TAFATタンパク質5	TAFAT5
TPRドメイン、アンキリンリピートおよびコイルドコイル含有	TANC
Tボックス2	TBX2
Tボックス3(尺骨乳腺症候群)	TBX3
トランスフォーミング成長因子、ベータ3	TGFB3
トロンボスポニン1	THBS1
チミジンキナーゼ1、可溶性	TK1

10

20

30

40

【表 1 - 10】

遺伝子名	遺伝子記号
チミジキナーゼ1、可溶性	TK1
膜貫通4スーパーファミリーメンバー1	TM4SF1
膜貫通4スーパーファミリーメンバー1	TM4SF1
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー11b(オステオプロテジェリン)	TNFRSF11B
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー11b(オステオプロテジェリン)	TNFRSF11B
トポイソメラーゼ(DNA)IIアルファ 170kDa	TOP2A
トポイソメラーゼ(DNA)IIアルファ 170kDa	TOP2A
T-LAK細胞由来タンパク質キナーゼ	TOPK
トロポミオシン1(アルファ)	TPM1
TPX2、微小管結合タンパク質相同体(Xenopus laevis)	TPX2
TTKタンパク質キナーゼ	TTK
チューブリン、ベータポリペプチド /// チューブリン、ベータポリペプチドパラログ	TUBB /// MGC8685
チューブリン、ガンマ1	TUBG1

遺伝子名	遺伝子記号
チミジル酸シンターゼ	TYMS
ユビキチン結合酵素E2C	UBE2C
ユビキチン結合酵素E2S	UBE2S
ユビキチン様、PHDおよびRINGフィンガードメイン含有、1	UHRF1
unc-5相同体B (C. elegans)	UNC5B
unc-5相同体B (C. elegans)	UNC5B
WDリピートドメイン1	WDR1
WNT1誘導可能シグナリング経路タンパク質1	WISP1
WNT1誘導可能シグナリング経路タンパク質1	WISP1
Xg血液型(偽常染色体の境界分割、X染色体上)	XG
ジンクフィンガーおよびBTBDフィン含有1	ZBTB1
ジンクフィンガータンパク質36、C3Hタイプ、相同体(マウス)	ZFP36
ジンクフィンガータンパク質367	ZNF367
ZW10相互作用物質	ZWINT

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、BMPへの露出によって発現が調節され得る内因性遺伝子は、初期遺伝子である。いくつかの実施形態において、本発明の内因性初期遺伝子は、BMPへの露出の際にシグナルプロセス経路の初期段階において発現する遺伝子を含んでもよい。

【0096】

いくつかの実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後48時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後24時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後18時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後12時間以内にその発現が調節される遺伝子である。さらに他の実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後6時間以内にその発現が調節される遺伝子である。他の実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後4時間以内にその発現が調節される遺伝子である。他の実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後2時間以内にその発現が調節される遺伝子である。他の実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後1時間以内にその発現が調節される遺伝子である。他の実施形態において、初期遺伝子は、BMPへの露出後30分以内にその発現が調節される遺伝子である。

【0097】

いくつかの実施形態において、内因性初期遺伝子は、Id-1、Id-2、Id-3、Id-4、Msx2、Dlx2、Dlx3、Dlx5、Noggin、Smad6、Smad7およびRunx2を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、

内因性初期遺伝子は I d - 1 遺伝子である。転写因子 I D - 1 は塩基性ヘリックス - ループ - ヘリックスタンパク質のドミナントネガティブ阻害物質であり、B M P の直接的標的である。B M P は I D - 1 プロモーターを強力に活性化し、I D タンパク質の異所的発現は B M P に誘導される応答を模倣できる。したがって、I d - 1 遺伝子の活性化は B M P シグナル伝達に対する初期マーカーとして有用であり得る。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態において、B M P への露出によって発現が調節され得る内因性遺伝子は、後期遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、B M P への露出後 4 8 時間より後にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、B M P への露出後 4 8 時間より後だが 7 2 時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、B M P への露出後 4 8 時間より後だが 9 6 時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、B M P への露出後 4 8 時間より後だが 1 2 0 時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、B M P への露出後 4 8 時間より後だが 1 4 4 時間以内にその発現が調節される遺伝子である。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、B M P への露出後 4 8 時間より後だが 1 6 8 時間以内にその発現が調節される遺伝子である。

10

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、H E Y 1、D I O 2、A D A M T S 9、H A S 3、F G F R 3、M F I 2、C H I 3 L 1、N O G、B A M B I、G R E M 1、G R E M 2 および S O S T を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、後期遺伝子は、F G F R 3、D I O 2、H E Y 1、H A S 3、A D A M T S 9、および M F I 2 を含むがこれらに限定されない。他の実施形態において、後期遺伝子は、N O G、B A M B I、G R E M 1、および G R E M 2 を含むがこれらに限定されない。

20

【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態において、遺伝子の発現は、B M P への露出によってアップレギュレートされる。他の実施形態において、遺伝子の発現は、B M P への露出によってダウンレギュレートされる。

【 0 1 0 1 】

いくつかの実施形態においては、定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (Q P C R) を用いて、サンプル処理された細胞または未処理の細胞中の内因性遺伝子の c D N A を増幅する。Q P C R は非常に感度が良い方法のため、目的の遺伝子の転写の非常に小さな変化の検出が可能である。したがって、Q P C R に基づくアッセイは感度が高く、生物サンプル中に存在する少量の中和抗体の検出に有用であり得る。T a q M a n プローブを用いた定量リアルタイム P C R の方法は当該技術分野において周知である。リアルタイム定量 P C R のための詳細なプロトコルは、たとえば G i b s o n ら、" A n o v e l m e t h o d f o r r e a l t i m e q u a n t i t a t i v e R T - P C R " , G e n o m e R e s . , 1 0 : 9 9 5 - 1 0 0 1 (1 9 9 6) および H e i d ら、" R e a l t i m e q u a n t i t a t i v e P C R " , G e n o m e R e s . , 1 0 : 9 8 6 - 9 9 4 (1 9 9 6) などに記載されている。

30

40

【 0 1 0 2 】

いくつかの実施形態においては、本発明のサンプルをプレスクリーニングして、目的の B M P に特異的な抗体が存在するかどうかを決定してから、その抗体が中和抗体かどうかを決定してもよい。本発明のサンプルは、一次中和抗体アッセイで陽性反応を示したものであって、今回中和抗体の存在を確認するアッセイとして本発明のアッセイを受けるものであってもよい。いくつかの実施形態において、サンプルは E L I S A アッセイなどのイムノアッセイによってプレスクリーニングされる。他の実施形態において、サンプルは細胞に基づくアッセイ、たとえばレポーター遺伝子の活性化などによってプレスクリーニングされる。レポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子であってもよい。ルシフェラーゼ遺伝子は、B M P への露出によって調節され得る遺伝子のプロモーターにつながれてもよい

50

。こうした遺伝子は初期または後期遺伝子であってもよく、I d - 1、I d - 2、I d - 3、I d - 4、M s x 2、D l x 2、D l x 3、D l x 5、N o g g i n、S m a d 6、S m a d 7、R u n x 2、フィブロモジュリン、H e y 1およびS F R P - 2を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、サンプルは細胞に基づくアッセイ、たとえばラット骨肉腫（R O S）細胞などにおけるアルカリホスファターゼ活性のモニタリングを伴うアッセイなどによってプレスクリーニングされる。

【0103】

本発明のいくつかの実施形態において、アッセイは、同じアッセイプレート上にテストサンプルと対照サンプルとを含有する96ウェルプレート上で行なわれる。他の実施形態において、アッセイはハイスループットスクリーニングによって行なわれる。

10

【0104】

本明細書において例示のためにのみ提供され、決して本発明を限定するものと解釈されるべきではない以下の実施例によって、本発明の実施がさらにより完全に理解されるであろう。

【実施例】

【0105】

（実施例1）

定量PCR（QPCR）によるヒト血清サンプル中のOP-1に対する中和抗体の検出
1%のFBSを含有する培地（1%のFBSを含有するF-12K培地（ATCC Cat. # 30-2004）中のA549細胞（ATCC Cat. # CCL-185）を、最適な播種密度で96ウェル組織培養マイクロタイタープレート上に播き、細胞が単層中でプレートに安定に付着するまで37℃にてインキュベートした。このステップは細胞型によって数時間から最高24時間までかかってもよい。A549細胞の場合には、細胞は24時間でプレートに付着する。

20

【0106】

予め決定された有効BMP濃度を正常ヒト血清（NHS）プールにスパイクしたもののかなる正の対照は、97.5μLのNHSプールを2.5μLの24μg/mLのOP-1スパイクと混合することによって調製した。

【0107】

NHS中の40μg/mL（「12G3/1000」の抗BMP抗体（12G3モノクローナル抗体）からなる正の対照は、以下のとおり調製した。12G3モノクローナル抗体を、プールされたNHS中で200μg/mLに希釈した。次いでこの抗体をNHSでさらに希釈して40μg/mLにし、合計体積を97.5μLにした。次いで2.5μL体積の24μg/mLのOP-1スパイクを混合物に加えた。

30

【0108】

NHS中の20μg/mL「12G3/500」の抗BMP抗体（12G3モノクローナル抗体）からなる正の対照は、以下のとおり調製した。12G3モノクローナル抗体を、プールされたNHS中で200μg/mLに希釈した。次いでこの抗体をNHSでさらに希釈して20μg/mLにし、合計体積を97.5μLにした。次いで2.5μL体積の24μg/mLのOP-1スパイクを混合物に加えた。

40

【0109】

サンプルに「有効BMP濃度」をスパイクして、細胞刺激の前に最低30分間プレインキュベートさせた。

【0110】

「有効BMP濃度」は、15ng/mLまたは25ng/mLのいずれかのBMP-7（各々3つずつ行なった）をだんだん増加する濃度の抗BMP-7モノクローナル抗体（12G3）とともにインキュベートすることによって決定した。2つの濃度に対する相対量（RQ）値（以下により詳細に考察する）を比較して、15ng/mLの濃度のBMP-7を有効濃度と決定した。

【0111】

50

対照およびサンプルをすべて最小必要希釈度 (MRD) に希釈して、予めプレート培養された細胞を含有するプレートに最低2つ分を加えた。MRDは、異なる希釈度 (1:10、1:20、1:40、1:80) の非スパイクNHSプールをテストして、血清を含有しない対照サンプル (No NHS) と類似のバックグラウンドRQ値を示すような血清サンプルの最小希釈度を決定することによって決定した。図2に示すとおり、MRDは1:40であることが決定された。

【0112】

サンプル添加の後、プレートを37℃にて3時間インキュベートした。3時間というインキュベーション期間は、異なるインキュベーション期間における標的ノハウスキーピング (Id-1 / GAPDH) 遺伝子発現の比率を比較する研究に基づいて選択された、最適化期間であった。簡単に述べると、細胞をだんだん増加する濃度のBMP-7とともに19時間または3時間インキュベートして、標的ノハウスキーピング (Id-1 / GAPDH) 遺伝子発現の比率に対する影響を決定した。図3に示すとおり、応答曲線に基づいて、最適化期間として3時間のインキュベーション期間を選択した。標的ノハウスキーピング (Id-1 / GAPDH) 遺伝子発現の比率に対する異なる濃度のFBSを比較する研究に基づいて、アッセイで用いるFBSの濃度も最適化した。簡単に述べると、細胞を1%または5%のFBS中のだんだん増加する濃度のBMP-7とともに3時間インキュベートして、標的ノハウスキーピング (Id-1 / GAPDH) 遺伝子発現の比率に対する影響を決定した。図3に示すとおり、応答曲線に基づいて、最適化条件として1%のFBSを選択した。

10

20

【0113】

細胞を溶解し、96ウェルTurbo Captureプレート (Qiagen, Valencia, CA) を用いてポリA+ mRNAを単離した。

【0114】

次いで、単離したmRNAを鋳型として用いて、逆転写反応におけるcDNA合成を行なった。まずサンプルを5分間25℃に調整し、次いで42℃にて30分間逆転写反応を行なった。次いでサンプルを85℃にて5分間インキュベートしてRT酵素を変性させてから4℃に冷却した。

【0115】

予め確認した遺伝子特異的なTaqMan試薬 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、QPCRによって標的 (Id-1) およびハウスキーピング (GAPDH) 遺伝子発現を測定した。2つの遺伝子の各々に対して各cDNAサンプルを3つのウェルで分析し、cDNAサンプル当り合計6つのQPCR反応および血清サンプル当り12の反応を行なった。PCR反応は、たとえばTaqMan Universal PCR Master Mixを用いてABI 7900HT Fast Real-Time PCRシステムなどで行なわれてもよい。デルタデルタCt法 (LivakおよびSchmittgen, 2001) を用いて、標的 (Id-1) およびハウスキーピング (GAPDH) 遺伝子発現を定量した。簡単に述べると、標的 (Id-1) およびハウスキーピング (GAPDH) 遺伝子の両方に対して、遺伝子の増幅が閾値を超えるPCRサイクル (Ct) を記録した。3つの標的遺伝子反復実験 (replicates) の平均Ctから3つのハウスキーピング遺伝子反復実験の平均Ctを引くことによって、各細胞培養ウェルの平均デルタCtを算出した。次いで、各未知試料のデルタCtから、NHSプールにスパイクされたBMPからなる校正物質サンプルのデルタCtを引いて、デルタデルタCtを得た。各未知試料のデルタデルタCtは、校正物質サンプルのデルタデルタCtに対して表わされ、これを相対量またはRQ値と呼んだ。次いで、処置反復実験からのRQ値の平均、標準偏差およびパーセントCVを算出して報告した。

30

40

【0116】

表2に示されるとおり、標的Id-1遺伝子およびハウスキーピングGAPDH遺伝子は類似の効率で増幅された。遺伝子発現の正規化のためには標的およびハウスキーピング

50

遺伝子の類似の効率が必要であるため、このことは重要な特徴である。

【 0 1 1 7 】

【 表 2 】

表2

QPCR ラン	ID-1 勾配	効率	GAPDH 勾配	効率
1	-3.34	99%	-3.26	103%
2	-3.49	94%	-3.06	112%
3	-3.45	95%	-3.38	97%
4	-3.70	86%	-3.37	98%
5	-3.34	99%	-3.41	96%
6	-3.15	108%	-3.34	99%
7	-3.61	89%	-3.51	93%
平均		96%		100%

10

OP - 1 (BMP - 7) もハウスキーピング GAPDH 遺伝子の発現に影響しなかった。図 4 に示されるとおり、テストされた 80 個の異なるサンプルにおいて、GAPDH 発現率 (非スパイク / OP - 1 スパイク) は比較的均一であった。

【 0 1 1 8 】

(実施例 2)

切点の決定

20

アッセイ確認の際に行なわれた実験からのデータを用いて、アッセイ切点を決定した。この研究からのデータを以下の表 3 にまとめている。

【 0 1 1 9 】

【表 3】

表3

実験からの切点決定データ

	プレート1		プレート2		プレート3	
	平均 RQ	SD RQ	平均 RQ	SD RQ	平均 RQ	SD RQ
非スパイク	0.22	0.00	0.27	0.02	0.28	0.03
スパイク対照の平均	1.00		1.00		1.00	
12G3 1000	0.51	0.03	0.49	0.02	0.54	0.06
12G3 500	0.63	0.08	0.86	0.08	0.74	0.04
S1	1.18		1.12		1.95	
S2	1.33		1.15		1.15	
S3	1.44		1.40		1.33	
S4	1.26		1.69		1.26	
S5	1.26		1.59		1.50	
S6	1.15		1.33		1.52	
S7	1.42		1.33		1.31	
S8	1.23		1.51		1.32	
S9	1.17		1.55		1.32	
S10	1.40		1.63		1.44	
S11	0.87		1.15		1.25	
S12	1.12		1.49		1.03	
S13	1.23		1.57		1.47	
S14	1.08		1.57		1.12	
S15	1.08		1.44		1.22	
S16	1.23		1.46		1.28	
S17	1.27		1.54		1.16	
S18	1.29		1.43		0.98	
S19	1.13		1.30		1.08	
S20	1.49		1.62		1.34	
S21	0.94		1.26		1.35	
S22	1.18		1.80		1.04	
S23	1.26		1.50		1.62	
S24	1.13		1.78		1.17	
S25	1.25		1.71		1.11	
S26	1.28		1.26		1.26	
S27	1.33		1.40		1.00	
S28	1.24		1.24		1.26	
S29	1.20		1.48		1.16	
S30	1.20		1.69		1.09	
S31	1.06		1.25		1.28	
S32	1.33		1.33		1.18	
S33	1.32		1.32		1.36	
S34	1.22		1.19		1.07	
S35	1.35		1.36		1.18	
S36	1.42		1.03		1.28	
S37	1.29		1.29		1.23	
S38	1.08		1.63		1.35	
S39	1.29		1.54		1.14	
S40	1.25		1.54		1.20	
S41	0.93		1.25		1.41	
S42	1.07		0.96		1.44	
S43	0.97		1.15		1.31	
S44	1.19		1.33		1.11	
S45	1.16		1.54		1.66	
S46	0.99		1.37		1.10	
S47	1.09		1.70		1.40	
S48	1.08		2.14		1.65	
S49	1.05		1.64		1.36	
S50	0.75		1.58		1.53	
平均RQ	1.19		1.44		1.29	
標準偏差RQ	0.151		0.222		0.192	
95% LCL	0.942		1.077		0.971	
平均 95% LCL			0.997			

10

20

30

40

50

15 ng / ml の OP - 1 をスパイクした 50 個の異なる NHS サンプルをテストすることによって、アッセイ切点を決定した。各サンプルを 1 回ずつテストすることによって、50 サンプルすべてを同じ組織培養プレート上で評価できるようにした。3 枚のこうしたプレート（プレート 1、プレート 2 およびプレート 3）を同じ日にセットアップすることによって、アッセイ切点を決定するときにプレート間のばらつきを考慮できるようにした。プール NHS 中の 15 ng / mL の OP - 1 からなる対照溶液を参照として用いて、デルタデルタ Ct 法を用いて各サンプルに対する RQ 値を算出した。各プレートにおけるこの対照溶液の 4 つの反復実験すべてからの平均 RQ 値を参照として設定した。

【 0 1 2 0 】

以下の表 4 に示されるとおり、各プレートに対する RQ 分布の正規性を評価するために、3 つの統計的テスト（KS, D'Agostino & Pearson, および Sh

apiro & Wilk)を行なった。プレート1およびプレート2の場合は、3回のテストすべてがRQ分布が正規であることを示した。プレート3については、3回のテストのうち1回のみがRQ分布が正規であることを示した。しかし、まとめるとこれらの結果は正規性の傾向を示す。その結果、パラメトリック法を用いてこのアッセイに対する切点を決定した。

【0121】

【表4】

表4

	プレート1	プレート2	プレート3
値の数	50	50	50
平均	1.191	1.443	1.287
標準偏差	0.151	0.2212	0.1917
標準誤差	0.02136	0.03129	0.02711
KS正規性テスト			
KS距離	0.08291	0.0746	0.1109
P値	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
正規性テストをパスしたか(アルファ=0.05)?	はい	はい	はい
D'Agostino & Pearson オムニバス正規性テスト			
K2	3.634	2.742	11.95
P値	0.1625	0.2539	0.0025
正規性テストをパスしたか(アルファ=0.05)?	はい	はい	いいえ
Shapiro-Wilk 正規性テスト			
W	0.9772	0.9797	0.9445
P値	0.4394	0.5395	0.0203
正規性テストをパスしたか(アルファ=0.05)?	はい	はい	いいえ

各プレートからのRQに対する下側95%信頼限界(lower 95% confidence limit: 95% LCL)を決定した。次いで、この研究における3枚のプレートに対する平均95%LCLを算出した。この値は0.997であることが見出され、このアッセイに対する切点として指定された。0.997以下のRQを有するサンプルは、抗OP-1中和抗体の存在に対して陽性であるとみなした。0.997より高いRQ値を有するサンプルは陰性であるとみなした。

【0122】

(実施例3)

中間精度の確認

個別に調製した6つの15 ng/mlのOP-1スパイクを、最低1枚のプレート上で3日間テストすることによって中間精度を調べた。6サンプルの各々を、組織培養プレートの2つのウェルにてテストした。デルタデルタCt法を用いてRQ値を算出した。プールNHS中の15 ng/mLのOP-1からなる対照溶液の4つの反復実験からの平均RQ値を参照として設定した。2つのウェルごとの平均から、平均RQおよびパーセント差異も算出した。

【0123】

中間精度の研究からのデータを以下の表5にまとめている。

【0124】

【表 5】

表5
中間精度(アッセイ間の精度)

	プレートID		サンプルID	QPCRプレート サンプルID	平均RQ	平均からの %差異	状態	プレート 平均RQ	プレートRQ 標準偏差	プレート RQ %CV
実験1	対照		非スパイク	142	0.290	5.173	有効	1.219	0.061	5.025
			対照参照	144	1.000	NA	有効			
			1000 ng/ml 12G3	148	0.497	6.505	有効			
			500 ng/ml 12G3	150	0.664	0.355	有効			
	サンプル		スパイク1	176	1.193	4.925	有効			
			スパイク2	178	1.323	7.707	有効			
			スパイク3	180	1.182	4.421	有効			
			スパイク4	182	1.145	8.286	有効			
			スパイク5	184	1.234	2.732	有効			
			スパイク6	186	1.235	12.071	有効			
実験2	対照		非スパイク	256	0.227	4.034	有効	1.018	0.125	12.251
			対照参照	258	1.000	NA	有効			
			1000 ng/ml 12G3	262	0.494	0.455	有効			
			500 ng/ml 12G3	264	0.665	7.168	有効			
	サンプル		スパイク1	266	0.982	9.638	有効			
			スパイク2	268	1.175	3.345	有効			
			スパイク3	270	0.879	3.255	有効			
			スパイク4	272	1.084	1.908	有効			
			スパイク5	274	1.110	0.184	有効			
			スパイク6	276	0.878	6.948	有効			
実験3	対照		非スパイク	380	0.285	18.539	有効	1.159	0.055	4.769
			対照参照	382	1.000	NA	有効			
			1000 ng/ml 12G3	386	0.490	3.019	有効			
			500 ng/ml 12G3	388	0.726	4.190	有効			
	サンプル		スパイク1	426	1.158	1.317	有効			
			スパイク2	428	1.083	7.178	有効			
			スパイク3	430	1.103	1.504	有効			
			スパイク4	432	1.212	0.173	有効			
			スパイク5	434	1.193	4.085	有効			
			スパイク6	436	1.208	3.835	有効			
中間精度分析										
3プレートの平均RQ							1.132			
3プレートの標準偏差RQ							0.119			
3プレートの%CV RQ							10.484			
許容基準の状態							合格			

2つの処置ウェルの平均からのパーセント差異 30%という基準に基づき、中間精度研究で分析した15 ng/mlのOP-1スパイクはすべて有効であった。

【0125】

3日間にわたる有効スパイクすべての平均RQは、1.132に等しい。有効スパイクの標準偏差および%CVは、それぞれ0.119および10.484に等しい。スパイクに対するRQが30以下の%CVを生じるとき、このアッセイに対する中間精度は許容可能とみなされた。この予め定義された許容基準に基づいて、このアッセイの中間精度は許容可能とみなされた。

【0126】

(実施例4)

再現性の確認

個別に調製した6つの15 ng/mlのOP-1スパイクを、1日に3枚のプレート上でテストし、テストを1人の分析者が行なうことによって、アッセイ内の精度を調べた。6サンプルの各々を、組織培養プレートの2つのウェルにてテストした。デルタデルタCt法を用いてRQ値を算出した。プールNHS中の15 ng/mlのOP-1からなる対照溶液の4つの反復実験からの平均RQ値を参照として設定した。2つのウェルごとの平均から、平均RQおよびパーセント差異も算出した。

【0127】

中間精度の研究からのデータを以下の表6にまとめている。

【0128】

【表 6】

表6

実験からの再現性(アッセイ内の精度)

プレートID		サンプルID	QPCRプレート サンプルID	平均RQ	平均からの %差異	状態	プレート 平均RQ	プレートRQ 標準偏差	プレート RQ %CV
プレート1	対照	非スパイク	256	0.227	4.034	有効	1.018	0.125	12.251
		対照参照	258	1.000	NA	有効			
		1000 ng/ml 12G3	262	0.494	0.455	有効			
		500 ng/ml 12G3	264	0.665	7.168	有効			
	サンプル	スパイク1	266	0.982	9.638	有効			
		スパイク2	268	1.175	3.345	有効			
		スパイク3	270	0.879	3.255	有効			
		スパイク4	272	1.084	1.908	有効			
		スパイク5	274	1.110	0.184	有効			
		スパイク6	276	0.878	6.948	有効			
プレート2	対照	非スパイク	278	0.201	8.672	有効	0.973	0.089	9.154
		対照参照	280	1.000	NA	有効			
		1000 ng/ml 12G3	284	0.457	5.152	有効			
		500 ng/ml 12G3	286	0.556	6.258	有効			
	サンプル	スパイク1	288	0.981	7.062	有効			
		スパイク2	290	1.068	4.575	有効			
		スパイク3	292	0.845	2.184	有効			
		スパイク4	294	1.078	1.451	有効			
		スパイク5	296	0.934	0.960	有効			
		スパイク6	298	0.933	0.077	有効			
プレート3	対照	非スパイク	300	0.245	5.523	有効	1.061	0.113	10.610
		対照参照	302	1.000		有効			
		1000 ng/ml 12G3	306	0.564	5.318	有効			
		500 ng/ml 12G3	308	0.679	3.194	有効			
	サンプル	スパイク1	310	0.957	9.172	有効			
		スパイク2	312	1.019	4.923	有効			
		スパイク3	314	1.180	5.258	有効			
		スパイク4	316	1.210	9.664	有効			
		スパイク5	318	1.059	13.914	有効			
		スパイク6	320	0.941	10.054	有効			
再現性分析									
3プレートの平均RQ						1.017			
3プレートの標準偏差RQ						0.110			
3プレートの%CV RQ						10.767			
許容基準の状態						合格			

2つの処置ウェルの平均からのパーセント差異 30%という基準に基づき、アッセイ内精度研究で分析した15 ng/mlのOP-1スパイクはすべて有効であった。

【0129】

3枚のプレートの有効スパイクすべての平均RQは1.017に等しい。有効スパイクの標準偏差および%CVは、それぞれ0.110および10.767に等しい。各有効スパイクの平均RQが、各別個のプレート上のすべての有効スパイクに対する平均RQの±30%以内であるとき、このアッセイに対するアッセイ内精度は許容可能とされた。この予め定義された許容基準に基づいて、アッセイ内精度は許容可能とみなされた。

【0130】

(実施例5)

感度の確認

検出限界パラメータによって、このアッセイにおいて測定可能な中和影響をもたらす最低の抗OP-1抗体濃度を確認した。4つの異なる12G3抗体濃度(75、150、250および500 ng/ml)とともにOP-1スパイク(15 ng/ml)をブレインキュベートすることによって、検出限界(感度)を調べた。各12G3濃度について、1日で3枚のプレートにわたるプレート当たり6つのNHSサンプルにおいて評価した。上記に考察した他のパラメータについては、これらのサンプルを2つのウェルにてテストした。デルタデルタCt法を用いてRQ値を算出した。プールNHS中の15 ng/mlのOP-1からなる対照溶液の4つの反復実験からの平均RQ値を参照として設定した。2つのウェルごとの平均から、平均RQおよびパーセント差異も算出した。

【0131】

検出限界(感度)の研究からのデータを以下の表7にまとめている。

【0132】

10

20

30

40

50

【表 7】

表7
実験からの感度データ

プレートID		プレート1				プレート2				プレート3				感度許容基準
サンプルID		QPCR サンプル 番号	平均 RQ	平均からの %差異	状態	QPCR サンプル 番号	平均 RQ	平均からの %差異	状態	QPCR サンプル 番号	平均 RQ	平均からの %差異	状態	
非スパイク		438	0.271	9.459	有効	486	0.309	2.950	有効	546	0.244	0.926	有効	NA
対照参照		440	1.000		有効	488	1.000		有効	548	1.000		有効	
1000 ng/ml 12G3		446	0.613	16.667	有効	494	0.680	8.853	有効	554	0.605	11.144	有効	
500 ng/ml 12G3		448	0.800	6.206	有効	496	0.822	5.124	有効	556	0.790	15.898	有効	
75	反復実験 1	450	0.767	2.841	有効	498	0.808	10.029	有効	558	0.826	0.430	有効	不合格
	反復実験 2	452	0.742	15.246	有効	500	0.812	5.718	有効	560	0.826	3.636	有効	
	反復実験 3	454	0.751	17.627	有効	502	0.840	12.474	有効	562	0.902	10.131	有効	
	反復実験 4	456	0.694	1.943	有効	504	0.932	5.292	有効	564	0.903	6.692	有効	
	反復実験 5	458	0.823	11.390	有効	506	0.877	1.911	有効	566	0.940	2.200	有効	
	反復実験 6	460	1.022	10.630	有効	508	0.854	2.845	有効	568	0.970	7.605	有効	
														不合格
	反復実験 1	462	0.916	6.848	有効	510	0.803	5.588	有効	570	0.985	9.419	有効	
	反復実験 2	464	0.767	4.820	有効	512	0.758	6.698	有効	572	0.891	2.750	有効	
	反復実験 3	466	0.825	4.785	有効	514	0.666	4.583	有効	574	0.980	14.281	有効	
	反復実験 4	468	0.669	11.992	有効	516	0.693	0.900	有効	576	1.014	7.046	有効	
	反復実験 5	470	0.900	5.398	有効	518	0.721	9.878	有効	578	1.008	5.139	有効	
	反復実験 6	472	0.901	3.833	有効	520	0.657	6.706	有効	580	0.971	7.931	有効	
														不合格
	反復実験 1	486	0.968	3.914	有効	522	1.008	7.827	有効	582	1.036	10.333	有効	
	反復実験 2	488	0.995	5.348	有効	524	0.846	10.075	有効	584	0.876	15.311	有効	
	反復実験 3	490	0.934	1.466	有効	526	0.854	1.383	有効	586	0.769	0.219	有効	
	反復実験 4	492	1.003	8.746	有効	528	0.965	0.348	有効	588	0.803	0.772	有効	
	反復実験 5	494	1.075	4.398	有効	530	0.912	3.245	有効	590	0.812	2.348	有効	
	反復実験 6	496	0.788	0.706	有効	532	0.596	1.143	有効	592	0.885	8.909	有効	
														合格
	反復実験 1	474	0.770	2.253	有効	534	0.610	4.047	有効	594	0.674	7.467	有効	
	反復実験 2	476	0.811	6.633	有効	536	0.667	20.873	有効	596	0.775	8.101	有効	
	反復実験 3	478	0.817	1.641	有効	538	0.713	12.537	有効	598	0.767	6.231	有効	
	反復実験 4	480	0.791	3.039	有効	540	0.492	0.740	有効	600	0.743	8.715	有効	
	反復実験 5	482	0.783	2.896	有効	542	0.613	1.264	有効	602	0.772	4.689	有効	
	反復実験 6	484	0.843	14.039	有効	544	0.626	5.017	有効	604	0.751	2.923	有効	

検出限界（感度）に対する結果は、プレート有効性に対する許容基準を満たす。

【0133】

この研究においては4つの濃度の12G3を評価した。それらは75 ng/ml、150 ng/ml、250 ng/mlおよび500 ng/mlであった。2つの処置ウェルの平均からのパーセント差異 30%という基準に基づき、検出限界（感度）研究で分析した12G3スパイクはすべて有効であった。有効スパイクすべてがプレート特異的切点より下の平均RQ値を有するとき、検出限界（感度）は許容可能である。このアッセイに対する切点は0.997のRQ値と決定された。表7に示されるとおり、1日における3枚のプレートの500 ng/mlの12G3スパイクすべての平均RQは<0.997である。他の3つの12G3濃度（75、150および250 ng/ml）は、このパラメータに対する許容基準を満たさなかった（表7において、切点（すなわち0.997）よりも高い平均RQを有する特定の反復実験を下線で示す）。

【0134】

この予め定義された許容基準に基づいて、このアッセイの許容可能な検出限界（感度）は500 ng/mlである。

【0135】

（実施例6）

定量RT-PCRによる遺伝子発現分析

初代のヒト骨髄由来間充織幹細胞（human mesenchymal stem cells: hMSC）、ならびに間充織幹細胞増殖培地（Mesenchymal S

10

20

30

40

50

tem Cell Growth Medium: MSCGM) および骨形成分化培地 (Osteogenic Differentiation Medium: ODM) を含む hMSC 培養培地は、Lonza (Walkersville, MD) から購入した。細胞をインビトロで展開し、最初の解凍から 5 継代以内に実験に用いた。ODM 中で BMP-7 処置を適用した。ODM は、提供されたアスコルビン酸およびベータグリセロリン酸の補助剤を用いて、ただしデキサメタゾンを除いて、製造者の指示に従って調製した。MSCGM および ODM 中の FBS の濃度は約 10% だった。BMP-7 を ODM 中で示される濃度に希釈した。

【0136】

初代 hMSC を T-75 組織培養フラスコ中で 1 cm^2 当り 1.5×10^4 細胞で播種した。24 時間後に細胞を ODM 単独で、または 40 ng/ml もしくは 400 ng/ml の BMP-7 を含有する ODM で処置した。BMP-7 処置後のさまざまな時点 (1、2、3、4、5、6 および 7 日) の後に細胞を採取し、RT-QPCR 分析のために処理した。

【0137】

対照 (すなわち ODM 単独) および BMP-7 処置したヒト間充織幹細胞 (hMSC) からの RNA を、TurboCapture 96 mRNA キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて製造者のプロトコルに従って単離した。20 mM の Tris-HCl、50 mM の KCl、5 mM の MgCl_2 、500 μM の各 dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA) および $5\text{ ng}/\mu\text{l}$ の Random Primers (Promega, Madison, WI) を含有する緩衝液において、40 ユニットの M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) を用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応は 23 にて 10 分間、42 にて 50 分間行なわれ、その後 85 にて 5 分間の不活性化ステップが行なわれた。遺伝子発現分析のためのすべての試薬および計測手段は、Applied Biosystems (ABI, Foster City, CA) から得られた。定量 PCR は、7900HT Fast Real-Time PCR System および予め設計された TaqMan Gene Expression Assays を用いて、製造者の仕様書に従って行なった。Applied Biosystems の推奨手順に従って、相対定量の標準曲線法を用いて、GAPDH、HEY1、DIO2、ADAMTS9、HAS3、FGFR3、MFI2、CHI3L1、NOG (Noggin)、BAMBI、GREM1、GREM2 および SOST 遺伝子の発現を測定した。

【0138】

BMP-7 (OP-1) は、hMSC において FGFR3、DIO2、HEY1、HAS3、ADAMTS9 および MFI2 遺伝子を強力にアップレギュレートした。QPCR によって、BMP-7 処理後のこれらの遺伝子の発現の調節を確認した。6 つの遺伝子はすべて、7 日間にわたって BMP-7 処理された hMSC において用量応答性の発現増加を示し、その最大アップレギュレーションは約 580 倍 (FGFR3)、490 倍 (DIO2)、250 倍 (HEY1)、160 倍 (ADAMTS9)、110 倍 (HAS3) および 40 倍 (MFI2) であった。これらの遺伝子に対して極端な大きさのアップレギュレーションが観察されたことから、これらの遺伝子が BMP7 の媒介する造骨細胞の分化において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。図 5 を参照。

【0139】

BMP-7 は、ヒト間充織幹細胞において BMP 阻害物質である Noggin、BAMBI、GREM1 および GREM2 遺伝子の発現も顕著にアップレギュレートした。図 6 を参照。

【0140】

BMP-7 は、ヒト間充織幹細胞において CHI3L1 (軟骨糖タンパク質 39/YKL-40/キチナーゼ 3 様 1) 遺伝子の発現をダウンレギュレートした。QPCR によって、BMP-7 処理によるこの遺伝子の発現の調節を確認した。CHI3L1 は、7 日間

10

20

30

40

50

にわたって BMP - 7 処理された h M S C において用量依存性の態様で連続的にダウンレギュレートされ、より高用量の BMP - 7 において未処理細胞に比べて最大 2 4 倍のダウンレギュレーションが観察された。図 7 を参照。

【 図 1 】

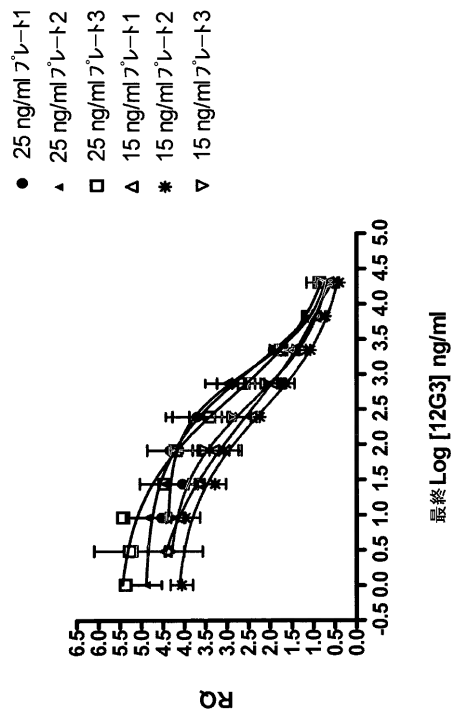


FIGURE 1

【 図 2 】

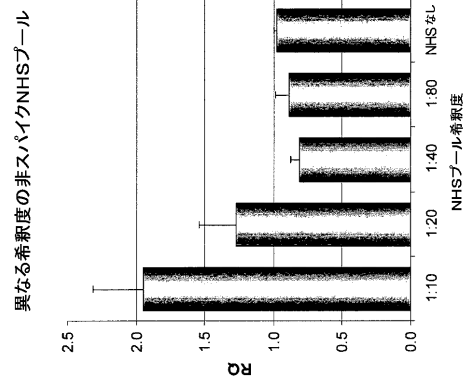
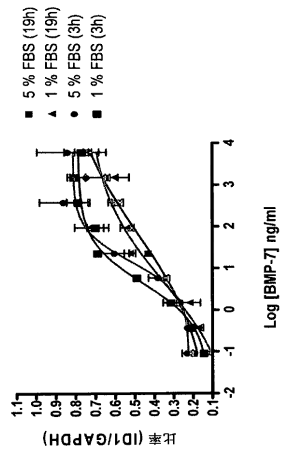


FIGURE 2

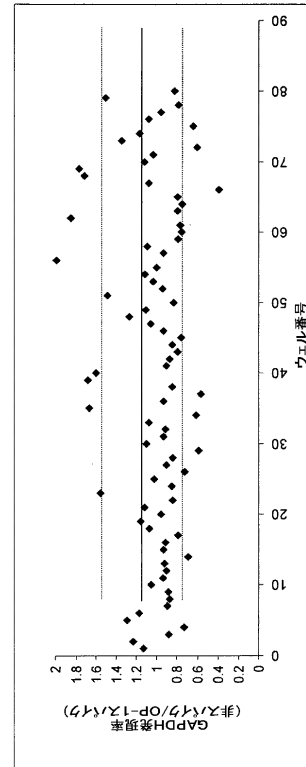
【 図 3 】

FIGURE 3



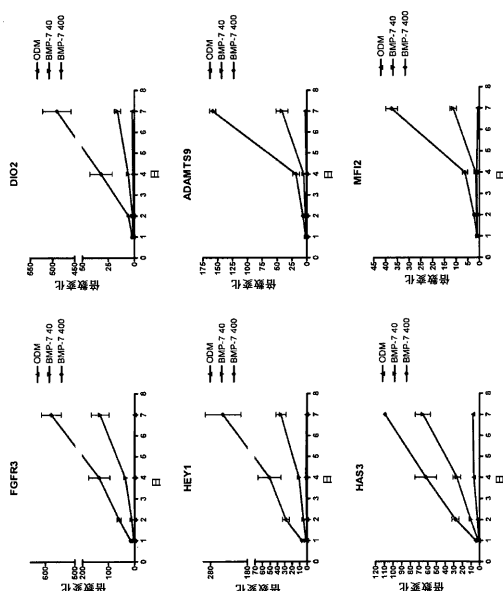
【 図 4 】

FIGURE 4



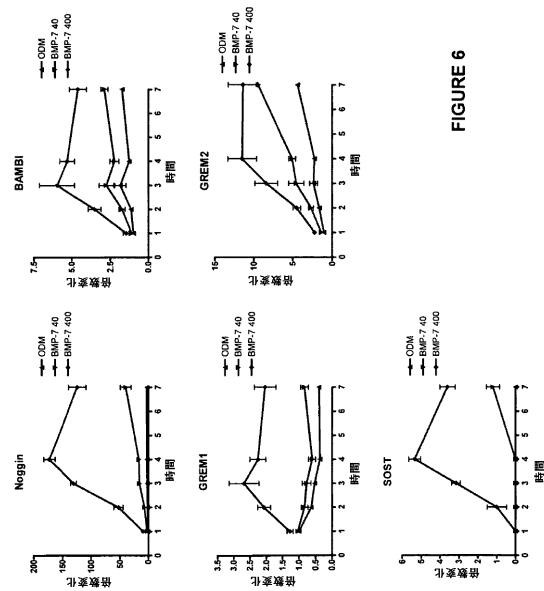
【 図 5 】

FIGURE 5



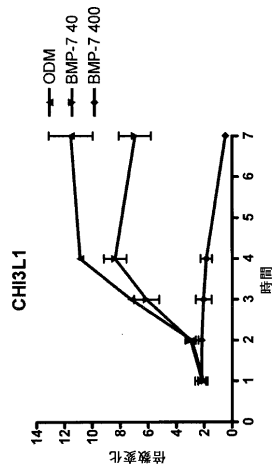
【 図 6 】

FIGURE 6



【 図 7 】

FIGURE 7



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/011154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/099245 A1 (GOROVITS BORIS [US] ET AL) 3 May 2007 (2007-05-03)	1-3,5-7, 9,10, 12-14, 21-25
Y		4,8,11, 15-20, 26,27
Y	CHEN D ET AL: "BONE MORPHOGENETIC PROTEINS" GROWTH FACTORS, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS GMBH, XX, vol. 22, no. 4, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 233-241, XP009071226 ISSN: 0897-7194 the whole document	4,8,11, 15-20, 26,27
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 12 December 2008		Date of mailing of the international search report 22/12/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Dolce, Luca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/011154

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 857 456 A (URIST MARSHALL R [US]) 15 August 1989 (1989-08-15) example 3	17-20, 26,27
A	WO 2005/041857 A (QUARK BIOTECH INC [US]; FUJIWAWA PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]; FEINSTEIN) 12 May 2005 (2005-05-12) the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/US2008/011154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007099245 A1	03-05-2007	NONE	
US 4857456 A	15-08-1989	NONE	
WO 2005041857 A	12-05-2005	CA 2541852 A1 EP 1670425 A2 JP 2007517498 T US 2008249038 A1	12-05-2005 21-06-2006 05-07-2007 09-10-2008

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アラウイ, ヒシャム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01748, ホプキントン, タマー レーン 3

(72)発明者 ラブリー, カレン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02038, フランクリン, ユニオン ストリート 1
28

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA41 CA01 CA09 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ46 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR48 QR55 QR62
QS25 QS33 QS34 QX02

专利名称(译)	检测针对骨形态发生蛋白的中和抗体的方法		
公开(公告)号	JP2010539932A	公开(公告)日	2010-12-24
申请号	JP2010526956	申请日	2008-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	史赛克公司		
申请(专利权)人(译)	史赛克公司		
[标]发明人	アラウイヒシャム ラブリーカレン		
发明人	アラウイ, ヒシャム ラブリー, カレン		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/02		
CPC分类号	C12Q1/686 C12Q1/6897 G01N33/6854 G01N2333/51 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.N C12N15/00.A C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ46 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/995833 2007-09-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及检测抗骨形态发生蛋白 (BMP) 的中和抗体的方法。更具体地, 本发明涉及用于检测抗BMP中和抗体的存在的高度特异性, 强力, 快速, 准确, 基于细胞的测定。在一个实施例中, 上述方法步骤和BMP (a) 样品接触;用包含至少一种内源基因表达的BMP-响应性细胞可以通过暴露于 (b) 中BMP, 步骤来调节 (a) ; (c) 从细胞中分离mRNA; (d) 通过逆转录反应制备对应于mRNA的cDNA; (e) 定量实时聚合酶链通过反应 (QPCR) 从步骤 (d) 的cDNA扩增基因; (f) 确定细胞中步骤 (e) 中扩增的基因的量等。

(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2010-539932 (P2010-539932)
		(43) 公表日	平成22年12月24日(2010. 12. 2)
(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)		C12Q 1/68	A
G01N 33/53 (2006.01)		G01N 33/53	D
C12N 15/09 (2006.01)		G01N 33/53	N
C12Q 1/02 (2006.01)		C12N 15/00	A
		C12Q 1/02	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)	
(21) 出願番号	特願2010-526956 (P2010-526956)	(71) 出願人	595148888
(22) 出願日	平成20年9月26日 (2008. 9. 26)		ストライカー コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成22年5月11日 (2010. 5. 11)		STRYKER CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/0111154		アメリカ合衆国ミシガン州49002, ノ
(87) 国際公開番号	W02009/045321		クマズー, エアウェー・ブルヴァード
(87) 国際公開日	平成21年4月9日 (2009. 4. 9)		2825
(31) 優先権主張番号	60/995, 833	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成19年8月28日 (2007. 9. 28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く