

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-516028
(P2023-516028A)

(43)公表日 令和5年4月17日(2023.4.17)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全133頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-552175(P2022-552175)	(71)出願人	503146324
(86)(22)出願日	令和3年3月1日(2021.3.1)		ザ プリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年10月24日(2022.10.24)		The Brigham and Women's Hospital, Inc.
(86)国際出願番号	PCT/US2021/020291		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ポストン フランシス ストリート 75
(87)国際公開番号	WO2021/174198	(74)代理人	100092783
(87)国際公開日	令和3年9月2日(2021.9.2)		弁理士 小林 浩
(31)優先権主張番号	62/983,374	(74)代理人	100120134
(32)優先日	令和2年2月28日(2020.2.28)		弁理士 大森 規雄
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100196966
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(72)発明者	ユ, ボール ビー .

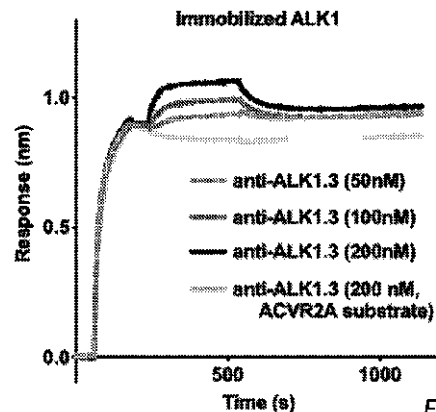
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重特異性抗体を介したトランスフォーミング増殖因子ベータスーパーファミリーシグナル伝達の選択的調節

(57)【要約】

ヘテロマー複合体、好ましくは、BMP I型およびI I型受容体の細胞外ドメインを標的にする単鎖可変ドメイン(s c F v)抗体(A b)を含むヘテロマー複合体を使用した、BMP / TGF シグナル伝達の選択的ターゲットングのための組成物および方法。

【選択図】図1 - 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも

骨形成タンパク質受容体 (BMP R) I 型 (BMP R I) に結合する第一の抗原結合ドメイン; および

骨形成タンパク質受容体 (BMP R) II 型 (BMP R II) に結合する第二の抗原結合ドメイン

を含む多重または二重特異性抗体分子であって、

前記第一および第二の抗原結合ドメインは、可動性リンカーにより互いに連結され、任意の順序であってよく、

それぞれの抗原結合ドメインは、それが結合する前記 BMP R に対してアゴニストとして作用することができ、

好ましくは、それぞれの抗原結合ドメインは、s c F v である、抗体分子。

【請求項 2】

前記抗体分子の細胞への結合が、BMP / TGF - ベータ / アクチビン / GDF シグナル伝達を開始する、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 3】

前記第一の抗原結合ドメインが、ALK 1 (ACVRL1); ALK 2 (ACVR1A); ALK 3 (BMP R 1 A); ALK 4 (ACVR1B); ALK 5 (TGFB R 1); ALK 6 (BMP R 1 B); または ALK 7 (ACVR1C) からなる群から選択される BMP R I に結合する、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 4】

前記第一の抗原結合ドメインが、ALK 1 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における CDR 配列と少なくとも 95% 同一の CDR 配列を含む; 配列番号 146、148、150、もしくは 152 における相補性決定領域と同一である VH CDR 1、2、3 および VL CDR 1、2、3 を含む; 図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の VH および / もしくは VL 配列を含む; または配列番号 146、148、150、もしくは 152 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 3 に記載の抗体分子。

【請求項 5】

前記第一の抗原結合ドメインが、ALK 2 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における CDR 配列と少なくとも 95% 同一の CDR 配列を含む; 配列番号 160、162、164、166、もしくは 168 における相補性決定領域と同一である VH CDR 1、2、3 および VL CDR 1、2、3 を含む; 図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の VH および / もしくは VL 配列を含む; または配列番号 160、162、164、166、もしくは 168 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 3 に記載の抗体分子。

【請求項 6】

前記第一の抗原結合ドメインが、ALK 3 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における CDR 配列と少なくとも 95% 同一の CDR 配列を含む; 配列番号 156 もしくは 158 における相補性決定領域と同一である VH CDR 1、2、3 および VL CDR 1、2、3 を含む; 図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の VH および / もしくは VL 配列を含む; または配列番号 156 もしくは 158 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 3 に記載の抗体分子。

【請求項 7】

前記第一の抗原結合ドメインが、ALK 4 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における CDR 配列と少なくとも 95% 同一の CDR 配列を含む; 配列番号 178 における相補性決定領域と同一である VH CDR 1、2、3 および VL CDR 1、2、3 を含む; 図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の VH および / もしくは VL 配列を含む; または配列番号 178 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 3 に記載の抗体分子

10

20

30

40

50

。

【請求項 8】

前記第一の抗原結合ドメインが、A L K 6 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 8 0 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 8 0 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 3 に記載の抗体分子

。

【請求項 9】

前記第一の抗原結合ドメインが、A L K 7 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 8 2、1 8 4、1 8 6、もしくは 1 8 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 8 2、1 8 4、1 8 6、もしくは 1 8 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 3 に記載の抗体分子。

10

【請求項 10】

前記第二の抗原結合ドメインが、A C T R I I A (A C V R 2 A) ; A C T R I I B (A C V R 2 B) ; B M P R I I (B M P R 2) ; T G F B R I I (T G F B R 2) ; または A M H R I I (A M H R 2) からなる群から選択される B M P R I I に結合する、請求項 1 に記載の抗体分子。

20

【請求項 11】

前記第二の抗原結合ドメインが、B M P R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 5 4 もしくは 2 1 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 5 4 もしくは 2 1 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 10 に記載の抗体分子。

【請求項 12】

前記第二の抗原結合ドメインが、A C T R I I A (A C V R 2 A) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 0 および 1 7 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 0 もしくは 1 7 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 10 に記載の抗体分子。

30

【請求項 13】

前記第二の抗原結合ドメインが、A C T R I I B (A C V R 2 B) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 4 もしくは 1 7 6 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 4 もしくは 1 7 6 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 10 に記載の抗体分子。

40

【請求項 14】

(i) 前記第一の抗原結合ドメインが、B M P R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または前記第二の抗原結合ドメインが、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；

(i i) 前記第一の抗原結合ドメインが、A C V R 2 A に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または前記第二の抗原結合ドメインが、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6

50

、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；

(i i i) 前記第一の抗原結合ドメインが、A C V R 2 B に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または前記第二の抗原結合ドメインが、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；

(i v) 前記第一の抗原結合ドメインが、T G F B R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または前記第二の抗原結合ドメインが、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 と結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；

(v) 前記第一の抗原結合ドメインが、A M H R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または前記第二の抗原結合ドメインが、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 1 5】

A L K 1 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 4 6、1 4 8、1 5 0、もしくは 1 5 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 4 6、1 4 8、1 5 0、もしくは 1 5 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 1 6】

A L K 2 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 6 0、1 6 2、1 6 4、1 6 6、もしくは 1 6 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 6 0、1 6 2、1 6 4、1 6 6、もしくは 1 6 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 1 7】

A L K 3 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 5 6 もしくは 1 5 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 5 6 もしくは 1 5 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 1 8】

A L K 4 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 1 9】

A L K 6 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 8 0 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 8 0 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

A L K 7 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 8 2、1 8 4、1 8 6、もしくは 1 8 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 8 2、1 8 4、1 8 6、もしくは 1 8 8 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 21】

B M P R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 5 4 もしくは 2 1 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 5 4 もしくは 2 1 2 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

10

【請求項 22】

A C T R I I A (A C V R 2 A) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 0 もしくは 1 7 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 0 および 1 7 2 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

20

【請求項 23】

A C T R I I B (A C V R 2 B) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 4 もしくは 1 7 6 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 4 もしくは 1 7 6 と少なくとも 95% 同一の配列を含む、抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 24】

対象における血管の状態を処置する方法において使用するための、請求項 1 から 14 に記載の抗体分子、または請求項 15 から 23 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分であって、任意選択で、前記血管の状態が、肺動脈性肺高血圧症または遺伝性出血性末梢血管拡張症 (H H T) 症候群である、抗体分子または抗体もしくはその抗原結合部分。

30

【請求項 25】

肺血管性漏出症候群を処置する方法において使用するための、請求項 1 から 14 に記載の抗体分子、または請求項 15 から 23 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分であって、任意選択で、前記肺血管性漏出症候群が、急性呼吸促迫症候群 (A R D S) または急性肺傷害 (A L I) である、抗体分子または抗体もしくはその抗原結合部分。

【請求項 26】

肝臓内 B M P 9 シグナル伝達欠損を有する対象における肝線維症を処置する方法において使用するための、請求項 1 から 14 に記載の抗体分子、または請求項 15 から 23 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分。

40

【請求項 27】

請求項 1 から 14 に記載の抗体分子、または請求項 15 から 23 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分をコードする核酸。

【請求項 28】

請求項 11 に記載の核酸を含み、任意選択で、請求項 1 から 14 に記載の抗体分子、または請求項 15 から 23 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分を発現する宿主細胞。

【請求項 29】

請求項 1 から 14 に記載の抗体分子、または請求項 15 から 23 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分を含む医薬組成物。

50

【請求項 3 0】

対象における血管の状態を処置する方法であって、任意選択で、前記血管の状態が、肺動脈性肺高血圧症または遺伝性出血性末梢血管拡張症（HHT）症候群であり、前記方法が、治療有効量の、請求項 1 から 1 4 に記載の抗体分子、または請求項 1 5 から 2 3 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 3 1】

肺血管性漏出症候群を処置する方法であって、任意選択で、前記肺血管性漏出症候群が、急性呼吸促進症候群（ARDS）または急性肺傷害（ALI）であり、前記方法が、治療有効量の、請求項 1 から 1 4 に記載の抗体分子、または請求項 1 5 から 2 3 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

10

【請求項 3 2】

肝臓内 BMP 9 シグナル伝達欠損を有する対象における肝線維症を処置する方法であって、治療有効量の、請求項 1 から 1 4 に記載の抗体分子、または請求項 1 5 から 2 3 に記載の抗体もしくはその抗原結合部分を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

20

本出願は、2020年2月28日付けで出願された米国仮特許出願第62/983,374号明細書の利益を主張する。前述の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発

本発明は、国立保健研究所によって付与された補助金番号第AR057374号および第HL131910号の下、政府の支援でなされた。政府は、本発明においてある種の権利を有する。

【0003】

任意選択で、BMP I 型および II 型受容体の細胞外ドメインを標的にする単鎖可変ドメイン（scFv）抗体（Ab）のヘテロマー複合体を使用した、骨形成タンパク質（BMP）/トランスフォーミング増殖因子-ベータ（TGF-β）シグナル伝達の選択的ターゲットングのための組成物および方法が、本明細書において記載される。

30

【背景技術】

【0004】

BMP / TGF-β / アクチビン / 増殖分化因子（GDF）シグナル伝達経路は、発生のパターン形成、および生後組織リモデリングを広く制御する（Waite and Eng, Nat Rev Genet. 2003 Oct;4(10):763-73）。この経路の33の公知のリガンドは、細胞表面上の5つの構成的活性型の II 型受容体および7つの条件的活性型の I 型受容体と相互作用して、下流のシグナル伝達を開始する。この2つの受容体によるシグナル伝達システムは、それぞれが限られた数のリガンドに応答する受容体対においてコンビナトリアル多様性（少なくとも5×7の可能性のあるヘテロ四量体複合体）を付与する。このシグナル伝達の生理的結果は、組織および時空間的状况に非常に依存し、骨形成または線維形成の調節、より一般的には、細胞の可塑性、細胞の肥大、細胞増殖、およびアポトーシスの制御を含み得る。組み換え BMP / TGF-β / アクチビン / GDF リガンドは、様々な病態の処置のため、または組織操作適用のため治療的に使用され得る。しかしながら、これらのリガンドの多くが、循環中で短い半減期を有し得るか、またはヘパリン結合ドメインを介して細胞外基質に隔離され、これにより、標的組織への送達が困難になり得る。

40

【0005】

TGF-β シグナル伝達は、シグナル伝達を開始するために、多量体複合体におけ

50

る I 型と I I 型受容体の架橋結合を必要とする。二量体リガンド分子は、I I 型と I 型受容体のヘテロマー複合体のアセンブリーを促進し、I I 型受容体の構成的活性型のキナーゼドメインは、I 型受容体のキナーゼドメインをトランスリン酸化し、活性化する。次いで、I 型受容体は、S M A D を含む、複数のシグナル伝達カスケードを介してシグナル伝達を模倣することができる。S M A D は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) 遺伝子である「マザーズアゲンストデカペンタプレジック」(M a d) および線虫 (*C.elegans*) 遺伝子である S m a の遺伝子産物に類似するタンパク質のファミリーであり、S M A D は、B M P、アクチビン、G D F、および T G F - リガンドの機能を仲介するエフェクタータンパク質を含む。これらの S M A D は、T G F - ベータの下流の S M A D 2 および 3、ならびに多くのアクチビンおよび G D F リガンド、ならびに大部分の B M P リガンドおよび一部の G D F リガンドの下流の S M A D 1、5、および 9 を含み、I 型受容体キナーゼによってそれらの C 末端でリン酸化され、次いで、細胞核において選択的に保持されて、遺伝子転写活性が調節される。B M P / T G F - ベータ / アクチビン / G D F 受容体複合体によって標的化される他のシグナル伝達経路は、M A P キナーゼ、P I 3 K / A k t、タンパク質キナーゼ G、および他のシグナル形質導入カスケードを含む。概して、これらのリガンド、受容体、およびそれらの下流のエフェクターシグナルは、細胞の成長、アポトーシス、分化、および可塑性を協調させるよう機能する。これらのリガンド、それらの受容体、共受容体、およびアントゴニストは、発生のパターン形成および組織リモデリングに必須の時空間勾配をコードするように働く。これらのリガンドおよび受容体はまた、鉄分ホメオスタシスを含む、成熟な生物における生理を制御するよう機能する。これらのリガンドおよび受容体は、多機能の増殖因子であるサイトカインとみなされる。

10

20

【発明の概要】

【0006】

B M P / T G F コンビナトリアルな 2 つの受容体によるシステムは、細胞のシグナル伝達の機能的特異性および時空間的制御を可能にする。機能は、S M A D (S M A D 1 / 5 / 9 対 S M A D 2 / 3) ならびに非 S M A D (すなわち、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (M A P K)、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (P I 3 K)、および / またはタンパク質キナーゼ G (P K G)) エフェクター経路の活性化を決定する、I I 型と I 型受容体の特異的対形成によって決定される。I I 型および I 型受容体の発現は、組織特異的であり、状況に応じた機能を可能にするように動的に制御される。B M P / T G F - ベータ / アクチビン / G D F ファミリーの I 型および I I 型受容体の細胞外ドメインを標的にする抗体またはその抗原結合フラグメント、好ましくは、単鎖フラグメント可変 (s c F v) 抗体のヘテロマー複合体を使用した、B M P / T G F シグナル伝達の選択的ターゲティングのための組成物および方法が、本明細書において記載される。

30

【0007】

したがって、骨形成タンパク質受容体 (B M P R) I 型 (B M P R I) に結合する第一の抗原結合ドメイン；および骨形成タンパク質受容体 (B M P R) I I 型 (B M P R I I) に結合する第二の抗原結合ドメインを少なくとも含む多重または二重特異性抗体分子が、本明細書において提供され、B M P R I または B M P R I I は、それぞれ、B M P / T G F - ベータ / アクチビン / G D F シグナル伝達経路の I 型および I I 型受容体のいずれかを指すものと解釈することができ、第一および第二の抗原結合ドメインは、可動性リンカーにより互いに連結され、それぞれの抗原結合ドメインは、それが結合する B M P R に対してアゴニストとして作用することができ、好ましくは、それぞれの抗原結合ドメインは、s c F v である。第一および第二の抗原結合ドメインは、任意の順序で分子中に存在することができ、例えば、分子は、N 末端 - 第一のドメイン - リンカー - 第二のドメイン - C 末端、または N 末端 - 第二のドメイン - リンカー - 第一のドメイン - C 末端を含み得る (例えば、図 10 A ~ D を参照のこと)。一部の実施形態では、B M P R I I 抗原結合ドメインは、B M P R I 抗原結合ドメインに対して N 末端である。可動性リンカードメインによって区切られた第一および第二の抗原結合ドメインからなり、抗原結合ドメインが、任意の順序で分子内に存在する、四量体またはそれより多い (例えば、六量体、八量体

40

50

、十量体、もしくはそれより多い)多量体アレイもまた提供される。一般に、ドメインは、対で、例えば、それぞれのBMPRII結合ドメインについて1つのBMPRI結合ドメインで存在するが、比もまた、例えば、1:1~2:1、~3:1以上(いずれかの方向に)変動し得る。

【0008】

一部の実施形態では、抗体分子の細胞への結合は、BMP/TGF-ベータ/アクチビン/GDFシグナル伝達を開始する。

【0009】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、例えば、ALK1(アクチビンA受容体様1型、もしくはACVRL1としても知られる);ALK2(ACVR1A);ALK3(BMPRI1A);ALK4(ACVR1B);ALK5(TGFBRI1);ALK6(BMPRI1B);またはALK7(ACVR1C)からなる群から選択されるBMPRIに結合する。

10

【0010】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、ALK1に結合し、任意選択で、表1もしくは図7におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む;配列番号146、148、150、もしくは152における相補性決定領域と同一であるVH CDR1、2、3およびVL CDR1、2、3を含む;図7における配列と少なくとも95%同一のVHおよび/もしくはVL配列を含む;または配列番号146、148、150、もしくは152と少なくとも95%同一の配列を含む。

20

【0011】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、ALK2に結合し、任意選択で、表1もしくは図7におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む;配列番号160、162、164、166、もしくは168における相補性決定領域と同一であるVH CDR1、2、3およびVL CDR1、2、3を含む;図7における配列と少なくとも95%同一のVHおよび/もしくはVL配列を含む;または配列番号160、162、164、166、もしくは168と少なくとも95%同一の配列を含む。

【0012】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、ALK3に結合し、任意選択で、表1もしくは図7におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む;配列番号156もしくは158における相補性決定領域と同一であるVH CDR1、2、3およびVL CDR1、2、3を含む;図7における配列と少なくとも95%同一のVHおよび/もしくはVL配列を含む;または配列番号156もしくは158と少なくとも95%同一の配列を含む。

30

【0013】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、ALK4に結合し、任意選択で、表1もしくは図7におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む;配列番号178における相補性決定領域と同一であるVH CDR1、2、3およびVL CDR1、2、3を含む;図7における配列と少なくとも95%同一のVHおよび/もしくはVL配列を含む;または配列番号178と少なくとも95%同一の配列を含む。

40

【0014】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、ALK6に結合し、任意選択で、表1もしくは図7におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む;配列番号180における相補性決定領域と同一であるVH CDR1、2、3およびVL CDR1、2、3を含む;図7における配列と少なくとも95%同一のVHおよび/もしくはVL配列を含む;または配列番号180と少なくとも95%同一の配列を含む。

【0015】

一部の実施形態では、第一の抗原結合ドメインは、ALK7に結合し、任意選択で、表1もしくは図7におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む;配列番号182、184、186、もしくは188における相補性決定領域と同一であるVH

50

C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 182、184、186、もしくは 188 と少なくとも 95% 同一の配列を含む。

【0016】

一部の実施形態では、第二の抗原結合ドメインは、A C T R I I A (A C V R 2 A) ; A C T R I I B (A C V R 2 B) ; B M P R I I (B M P R 2) ; T G F B R I I (T G F B R 2) ; または A M H R I I (A M H R 2) からなる群から選択される B M P R I I に結合する。

【0017】

一部の実施形態では、第二の抗原結合ドメインは、B M P R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 154 もしくは 212 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 154 もしくは 212 と少なくとも 95% 同一の配列を含む。

10

【0018】

一部の実施形態では、第二の抗原結合ドメインは、A C T R I I A (A C V R 2 A) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 170 および 172 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 170 もしくは 172 と少なくとも 95% 同一の配列を含む。

20

【0019】

一部の実施形態では、第二の抗原結合ドメインは、A C T R I I B (A C V R 2 B) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；配列番号 174 もしくは 176 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 95% 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 174 もしくは 176 と少なくとも 95% 同一の配列を含む。

30

【0020】

一部の実施形態では、第一および第二の抗原結合ドメインは、可能性のある $5 \times 7 = 35$ の組み合わせ、例えば、B M P R 2 と A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、もしくは A L K 7；A C V R 2 A と A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、もしくは A L K 7；A C V R 2 B と A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、もしくは A L K 7；T G F B R 2 と A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、もしくは A L K 7；または A M H R 2 と A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、もしくは A L K 7 のいずれかを含む。

【0021】

一部の実施形態では、
(i) 第一の抗原結合ドメインは、B M P R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または第二の抗原結合ドメインは、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；

40

(i i) 第一の抗原結合ドメインは、A C V R 2 A に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または第二の抗原結合ドメインは、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 95% 同一の C D R 配列を含む；

50

(i i i) 第一の抗原結合ドメインは、A C V R 2 B に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または第二の抗原結合ドメインは、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；

(i v) 第一の抗原結合ドメインは、T G F B R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または第二の抗原結合ドメインは、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；

(v) 第一の抗原結合ドメインは、A M H R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む、ならびに / または第二の抗原結合ドメインは、A L K 1、A L K 2、A L K 3、A L K 4、A L K 5、A L K 6、および A L K 7 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む。

【 0 0 2 2 】

A L K 1 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 4 6、1 4 8、1 5 0、もしくは 1 5 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 4 6、1 4 8、1 5 0、もしくは 1 5 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

【 0 0 2 3 】

A L K 2 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 6 0、1 6 2、1 6 4、1 6 6、もしくは 1 6 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 6 0、1 6 2、1 6 4、1 6 6、もしくは 1 6 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

【 0 0 2 4 】

A L K 3 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 5 6 もしくは 1 5 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 5 6 もしくは 1 5 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

【 0 0 2 5 】

A L K 4 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

【 0 0 2 6 】

A L K 6 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 8 0 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 8 0 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供され

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 2 7 】

A L K 7 に結合し、任意選択で、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 8 2、1 8 4、1 8 6、もしくは 1 8 8 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 8 2、1 8 4、1 8 6、もしくは 1 8 8 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

【 0 0 2 8 】

B M P R 2 に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 5 4 もしくは 2 1 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 5 4 もしくは 2 1 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

10

【 0 0 2 9 】

A C T R I I A (A C V R 2 A) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 0 もしくは 1 7 2 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 0 および 1 7 2 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

20

【 0 0 3 0 】

A C T R I I B (A C V R 2 B) に結合し、表 1 もしくは図 7 における C D R 配列と少なくとも 9 5 % 同一の C D R 配列を含む；配列番号 1 7 4 もしくは 1 7 6 における相補性決定領域と同一である V H C D R 1、2、3 および V L C D R 1、2、3 を含む；図 7 における配列と少なくとも 9 5 % 同一の V H および / もしくは V L 配列を含む；または配列番号 1 7 4 もしくは 1 7 6 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む抗体またはその抗原結合部分もまた、本明細書において提供される。

【 0 0 3 1 】

加えて、本明細書に記載されるように抗体分子および抗体またはその抗原結合部分を、任意選択で、薬学的に許容される担体と共に含む医薬組成物が提供される。

30

【 0 0 3 2 】

対象における血管の状態を処置するため、任意選択で、血管の状態は、肺動脈性肺高血圧症 (P A H) もしくは遺伝性出血性末梢血管拡張症 (H H T) 症候群である；より一般的には、肺高血圧症 (P H) を処置するため；肺血管性漏出症候群を処置するため、任意選択で、肺血管性漏出症候群は、急性呼吸促進症候群 (A R D S) もしくは急性肺傷害 (A L I) である；および / または肝臓内 B M P 9 シグナル伝達欠損を有する対象における肝線維症を処置するための、本明細書に記載される抗体分子および抗体またはその抗原結合部分 (もしくは組成物) を使用する方法もまた、本明細書において提供される。一部の

40

【 0 0 3 3 】

さらに、本明細書に記載される抗体分子をコードする核酸、核酸を含み、任意選択で、抗体分子を発現する宿主細胞が、本明細書において提供される。

【 0 0 3 4 】

別段定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本発明において使用するための方法および材料は、本明細書に記載され、当該技術分野で公知の他の

50

適当な方法および材料もまた、使用することができる。材料、方法、および実施例は、単に説明であり、制限することを意図しない。本明細書において述べられる全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。競合する場合、定義を含む本明細書が、支配する。

【0035】

本発明の他の特性および利点は、以下の詳細な説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1-1】s c F vタンパク質のA L K 1およびB M P R 2への結合。(A ~ B) O c t e t R e d バイオレイヤー干渉法(B L I)は、s c F vクローンA L K 1 . 3およびA L K 1 . 8が固定化A L K 1へ結合することを表す。(C ~ D) B L Iは、s c F vクローンB M P R 2 . 1 2およびB M P R 2 . 2 3が固定化B M P R 2への結合することを表す。 10

【図1-2】図1-1の続きである。

【図2-1】s c F vタンパク質のA L K 1およびB M P R 2への特異的結合。(A) O c t e t R e d バイオレイヤー干渉法(B L I)は、クローンA L K 1 . 3およびA L K 1 . 8がA L K 1へ結合するが、クローンB M P R 2 . 1 2またはB M P R 2 . 2 3へ結合しないことを表す。(B) O c t e t R e d バイオレイヤー干渉法(B L I)は、クローンB M P R 2 . 1 2およびB M P R 2 . 2 3がB M P R 2へ結合するが、クローンA L K 1 . 3またはA L K 1 . 8へ結合しないことを表す；(C)クローンA L K 1 . 3、A L K 1 . 8、B M P R 2 . 1 2、またはB M P R 2 . 2 3のいずれも、固定化A C V R 2 Aに結合しない。 20

【図2-2】図2-1の続きである。

【図3】A L K 1およびB M P R 2に特異的なs c F vは、内皮細胞におけるB M P 9結合を阻害する。様々なs c F vは、B M P 9リガンドトラップA L K 1 - F cと比較した、T I M E (ヒトテロメラーゼ不死化毛細血管内皮細胞)におけるB M P 応答エレメント(B R E - ルシフェラーゼ)レポーター活性によって測定した、B M P 9 (1 n g / m L、1 8 時間) 介在性転写活性の用量に依存した阻害を示した。

【図4-1】ビオチン化s c F vクローンは、A L K 1およびB M P R 2への選択的結合を保持する。(A) ストレプトアビジン - H R Pを用いた様々なs c F vタンパク質の免疫プロットにより、2 5 K dの種のビオチン化を確認する。(B) B L Iを使用し、無修飾およびビオチン化s c F v A L K 1 . 3の両方が、固定化A L K 1へ結合するが、無修飾およびビオチン化s c F v B M P R 2 . 1 2は結合しないことを示す。(C) B L Iを使用し、無修飾およびビオチン化s c F v B M P R 2 . 1 2の両方が、固定化B M P R 2へ結合するが、無修飾およびビオチン化s c F v A L K 1 . 3は結合しないことを示す。(D) B L Iを使用し、無修飾およびビオチン化s c F v A L K 1 . 8の両方が、固定化A L K 1へ結合するが、無修飾およびビオチン化s c F v B M P R 2 . 2 3は結合しないことを示す。 30

【図4-2】図4-1の続きである。 40

【図5】ビオチン化s c F VクローンA L K 1 . 8およびB M P R 2 . 1 2のアセンブリーされたストレプトアビジン複合体は、毛細血管内皮細胞におけるB M P シグナル伝達を誘導する。免疫プロットは、モノクローナル抗B M P 9中和抗体(m A b 3 2 0 9、1 0 n g / m L)を用いた同時処置による阻害と共に、B M P 9 (1 n g / m L、3 0 分、3 7)を用いたヒト肺毛細血管内皮細胞(P M V E C)の刺激後の、S M A D 1および3の活性化、ならびにより低い程度でのS M A D 2の活性化を表す。ビオチン化s c F vクローンA L K 1 . 8およびB M P R 2 . 1 2(それぞれ1 n m、3 0 分、3 7)の等モルの混合物を用いた細胞の処置は、ストレプトアビジン(1 μ g / m L)の存在下でS M A D 1および3の活性化を誘導するが、不存在下では誘導しない。ストレプトアビジンでアセンブリーしたビオチン化A L K 1 . 8 : B M P R 2 . 1 2複合体によるS M A D 1 / 40 50

3の活性化は、抗BMP9中和抗体を用いた同時処置によって阻害されず、これは、リガンド非依存性シグナル伝達活性を示唆している。

【図6】ビオチン化scFvクローンALK1.8およびBMPR2.12のストレプトアビジンでアセンブリーした複合体は、BMP9リガンドではなく、ALK1を必要とする様式で、肺毛細血管内皮細胞におけるSMAD1/3シグナル伝達を誘導する。(A)ストレプトアビジンでアセンブリーした(1µg/mL)ビオチン化ALK1.8:BMPR2.12クローン(それぞれ1nM)を用いたAcvr11-/- (KO)と培養したマウス肺毛細血管内皮細胞(PMVEC)ではなく、野生型(WT)の処置は、免疫ブロットによりアッセイした、SMAD1/3(30分、37)の活性化をもたらし、これは、ALK1発現の要件と一致する。組み換えヒトBMP9(rhBMP9、1ng/mL、30分、37)は、mAb3209によって阻害される様式で、野生型(WT)およびAcvr11 KO細胞におけるSMAD1/3の活性化を誘導した。対照的に、ストレプトアビジンでアセンブリーしたビオチン化ALK1.8:BMPR2.12複合体の活性は、mAb3209(10ng/mL)によって阻害されず、これは、再度、リガンド非依存性シグナル伝達と一致する。(B)培養したヒト肺毛細血管内皮細胞(PMVEC)におけるIn-Cellウエスタンアッセイを使用したリン酸化SMAD1/5の定量的測定により、組み換えヒトBMP9(rhBMP9)、およびストレプトアビジンでアセンブリーした(1µg/mL)ビオチン化ALK1.8:BMPR2.12(それぞれ1nM)複合体によるSMAD1/5の活性化が明らかになった。BMP9/BMP10リガントラップALK1-Fcを用いた細胞の処置は、BMP9介在性SMAD1/5活性化を阻害したが、ストレプトアビジンでアセンブリーしたALK1.8/BMPR2.12複合体介在性SMAD1/5活性化を阻害しなかった。

【図7-1】CDR配列。本明細書に記載する異なる定義を使用して同定したCDR配列を有する、本明細書に記載する例示的な抗体のそれぞれについての重鎖および軽鎖配列を示す。

【図7-2】図7-1の続きである。

【図7-3】図7-1の続きである。

【図7-4】図7-1の続きである。

【図7-5】図7-1の続きである。

【図7-6】図7-1の続きである。

【図7-7】図7-1の続きである。

【図7-8】図7-1の続きである。

【図7-9】図7-1の続きである。

【図7-10】図7-1の続きである。

【図7-11】図7-1の続きである。

【図7-12】図7-1の続きである。

【図7-13】図7-1の続きである。

【図7-14】図7-1の続きである。

【図7-15】図7-1の続きである。

【図7-16】図7-1の続きである。

【図7-17】図7-1の続きである。

【図7-18】図7-1の続きである。

【図7-19】図7-1の続きである。

【図7-20】図7-1の続きである。

【図7-21】図7-1の続きである。

【図7-22】図7-1の続きである。

【図7-23】図7-1の続きである。

【図8】TIME細胞におけるBMP転写活性。示した二重特異性および四重特異性コンストラクトについてのインビトロ活性アッセイデータ。Hisタグを付けた二重特異性のものは、架橋結合して、四量体を形成しない場合、活性を生じなかった。IgG Fc融

合二重特異性のものは、ジスルフィド結合したホモ二量体として発現して、抗原結合ドメインの四量体を形成する場合、ちょうどそれらがしたように、シグナル伝達を誘発した。

【図9】静脈内組み換えヒトBMP9および4価のFc融合分子は、マウスにおいて、インピボでのBMP転写活性を誘発する。Id1遺伝子転写活性に基づくBMPシグナル伝達活性を、生理食塩水(50uL)、組み換えヒトBMP9(rhBMP9、50uL中150ug/kg)、または組み換え四量体のFc融合タンパク質ACVRL1.8-L-BMPR2.12-Short-Fc(50uL中150ug/kg)の尾静脈注射の24時間後の、8週齢のマウス由来の肺組織全体においてアッセイした。BMP9またはACVRL1.8-L-BMPR2.12-Short-Fcの注射は、肺組織全体における生理食塩水と比較して、BMP転写活性の増加を誘発した。

10

【図10-1】例示的なコンストラクトの略図。(A)4価または多価のシグナル伝達分子は、可動性リンカー領域によって区切られ、免疫グロブリンG定常ドメイン(IgGFc)との融合分子として発現した、抗I型BMP受容体抗原結合領域および抗II型BMP受容体抗体結合領域を含み得る。抗原結合領域は、交互であり、ジスルフィド結合を介して、2つの同一のIgGFc融合分子のホモ二量体の組み合わせによる機能的ヘテロ四量体を形成する。あるいは、ヘテロ四量体は、それぞれ、I型およびII型抗原結合領域の固有の組み合わせを発現する、2つの非類似のIgGFc融合分子のヘテロ二量体の組み合わせを含み得る(B)。より大きな多価分子は、おそらく、だが必然的にではなく、偶数の抗体結合領域と共に、様々な循環または非循環配列において、異なる数で生じる、2つより多くの抗原結合領域を含み得る(C)。これらの分子は、同一のIgGFc融合分子のホモ二量体の組み合わせを含み得るか、または2つの非類似のIgGFc融合分子のヘテロ二量体の組み合わせを含み得る(D)。

20

【図10-2】図10-1の続きである。

【図10-3】図10-1の続きである。

【図10-4】図10-1の続きである。

【図10-5】図10-1の続きである。

【図10-6】図10-1の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0037】

アクチビンおよび増殖分化因子(GDF)ファミリーのリガンドも含むBMP/TGFシグナル伝達経路は、器官形成、胚のパターン形成、ならびに生後組織リモデリングおよび再生の重大な制御として働く。BMP/TGF/アクチビン/GDFシグナル伝達経路の内在性リガンドは乱雑状態を示し、いくつかのII型およびI型受容体にしばしば結合し、別個の機能的結果を伴う多様なリガンド-受容体シグナル伝達複合体を形成する。これらのリガンドは、それらのヘパリン結合ドメインのおかげで細胞外基質においてしばしば隔離され、したがって、治療分子として乏しい薬物動態を示す。個々のI型受容体を標的にする単純化機能獲得研究および機能喪失研究により、軟骨形成分化、骨形成分化および骨質量制御、脂肪生成分化、線維形成、ならびに腱形成分化における個々のリガンドおよび受容体における一般的な役割を確認した^{4,5}が、矛盾した結果を伴い、かつどのシグナル伝達複合体が、どの組織において関与してこれらの結果を生じるのかについての明確なデータがなかった。このファミリーにおけるリガンドおよび受容体対形成のコンビナトリアル多様性は、細胞の機能へのBMP/TGFファミリーシグナル伝達インプットを包括的にマッピングするための試みを混乱させた。

30

40

【0038】

ヘテロ二量体化を促進し、シグナル伝達を開始するよう、表面BMP/TGF-b/アクチビン/GDF受容体の細胞外ドメインを認識する操作された二重特異性抗体が、本明細書において記載される。一部の実施形態では、このような抗体は、循環中でのより制限された半減期またはより延長した半減期を有するために、C末端のIgGFcドメインを有するか、または有さないで発現させることができ、循環を通して標的組織に送達するか、またはホーミングペプチドもしくは他のホーミング分子に結合して、特定の組織を標

50

的にするか、または固体基質に吸着もしくは結合して、特定の組織の生着もしくは成長を助長することができる。

【0039】

可動性リンカー領域によって区切られ、免疫グロブリンG定常ドメイン(IgG Fc、Fcドメインは、野生型IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4配列のいずれか由来であり得るか、またはFc - 受容体への結合を変化させるよう、補体結合を変化させるよう、抗体依存性細胞傷害性を変化させるよう、二量体形成を変化させるよう、または他の機能特性を変化させるよう修飾された配列由来であり得る)との融合分子として発現された抗I型BMP受容体抗原結合領域および抗II型BMP受容体抗体結合領域を含み得る、4価または多価のシグナル伝達分子もまた記載される。Fcドメインを操作する方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、Yang et al., Front Immunol. 2018 Jan 8;8:1860を参照のこと。抗原結合領域は、交互であり、ジスルフィド結合を介して、2つの同一のIgG Fc融合分子のホモ二量体の組み合わせによる機能的ヘテロ四量体を形成し得る(図10A)。あるいは、ヘテロ四量体は、それぞれ、I型およびII型抗原結合領域の固有の組み合わせを発現する、2つの非類似のIgG Fc融合分子のヘテロ二量体の組み合わせを含み得る(図10B)。より大きな多価分子は、おそらく、だが必然的にではなく、偶数の抗体結合領域と共に、様々な循環または非循環配列において、異なる数で生じる、2つより多くの抗原結合領域を含み得る(図10C)。これらの分子は、同一のIgG Fc融合分子のホモ二量体の組み合わせを含み得るか、または2つの非類似のIgG Fc融合分子のヘテロ二量体の組み合わせを含み得る(図10D)。単鎖多量体シグナル伝達分子は、2価または多価の分子だが、より典型的には、4価の分子として、交互、連続、またはパリンドローム立体配置で、かつ循環または非循環配列において、抗I型および抗II型抗原結合領域を含み得る(図10E)。多価の単鎖シグナル伝達分子は、交互、連続、パリンドローム、または非循環配列のいずれかにおいて、2または4つより多くのシグナル伝達分子を含み得る。これらの分子は、おそらく、だが必然的にではなく、偶数の抗体結合領域を含むだろう。これらの単鎖多量体シグナル伝達分子はまた、単量体IgG Fc融合タンパク質として発現させることができる(図10F)。

【0040】

したがって、本明細書に記載されるこれらの分子は、Fc領域を含み得る。IgG Fc CH3は、ホモ二量体形成に必要であるが、特定の臨床適用のためこれを妨げるよう修飾することができる。Fcドメインを操作する方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、Yang et al., Front Immunol. 2018 Jan 8;8:1860を参照のこと。あるいは、または加えて、本明細書における分子は、特定の細胞、組織、あるいは分子を、炎症、増殖もしくは新生物的な変化、あるいはタンパク質発現、pH、任意の溶質もしくは鉄に関する細胞外体液組成、細胞外基質発現、グリコシル化、または多糖外被構造もしくは組成における他の疾患に関連する変化の存在に起因して、変化を現している組織において保持させるなどの、機能的文脈へのそれらのターゲティングを促進するための他のドメインを含み得る。

【0041】

したがって、四量体は、Fc領域を有さない単一の分子、例えば、好ましい場合、短い半減期を有する分子であり得る。それぞれのFc鎖が、二重特異性対のscFvを有する、ホモ二量体Fc融合物もまた記載される。Fc領域はまた、任意の四量体、六量体、八量体などに付加することができる。Fcとジスルフィド結合した四量体もまた記載される。

【0042】

この経路の受容体を認識する、操作された二重特異性または多重特異性抗体を使用した、骨形成タンパク質(BMP)、アクチビン、増殖分化因子(GDF)、およびトランスフォーミング増殖因子(TGF) - ベータシグナル伝達スーパーファミリーの特定のメンバーの選択的アゴニズム、シグナル伝達活性化、またはシグナル伝達調節方法もまた、本

明細書に記載される。

【0043】

I. 定義

用語「a」または「an」実体は、1つまたは複数のその実体を指すことは理解されるべきであり、例えば、「an 抗体」は、1つまたは複数の抗体を表すことは理解される。したがって、用語「a」（または「an」）、「1つまたは複数の」および「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。

【0044】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、単数形の「ポリペプチド」ならびに複数形の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって直線的に結合された単量体（アミノ酸）からなる分子を指す。用語「ポリペプチド」は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖または複数の鎖を指し、特定の長さの生成物を指さない。したがって、2つ以上のアミノ酸の鎖または複数の鎖を指すために使用されるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりに、または互換的に使用され得る。

10

【0045】

用語「ポリペプチド」はまた、非限定的に、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロッキング基による誘導体化、タンパク質切断、または天然に生じないアミノ酸による修飾を含む、ポリペプチドの発現後修飾の生成物を指すことが意図される。ポリペプチドは、天然の生物供給源に由来するか、または組み換えテクノロジーによって生成されてもよいが、必ずしも、示された核酸配列から翻訳されない。それは、化学合成によるものを含む、任意の様式で生成されてもよい。

20

【0046】

本明細書に記載されるポリペプチドは、約3以上、5以上、10以上、20以上、25以上、50以上、75以上、100以上、200以上、500以上、1,000以上、または2,000以上のアミノ酸のサイズのものであってよい。ポリペプチドは、定義された3次元構造を有してもよいが、それらは、必ずしもこのような構造を有さない。定義された3次元構造を有するポリペプチドは、フォールドとして言及されるが、定義された3次元構造を有さないポリペプチドは、むしろ、多数の異なる立体構造に適合することができ、アンフォールドとして言及される。本明細書で使用される場合、用語糖タンパク質は、アミノ酸残基、例えば、セリン残基またはアスパラギン残基の酸素含有または窒素含有側鎖を介してタンパク質に結合している少なくとも1つの炭水化物部分に結合したタンパク質を指す。

30

【0047】

「単離された」ポリペプチドもしくはフラグメント、バリエント、またはその誘導体によって、その天然の環境にないポリペプチドが意図される。特定のレベルの精製は必要とされない。例えば、単離されたポリペプチドは、その天然または天然の環境から取り出すことができる。宿主細胞において発現される、組み換え生成されたポリペプチドおよびタンパク質は、本明細書に記載される目的のため単離されることが考慮され、任意の適当な技術によって区切られ、分割され、または部分的もしくは実質的に精製された天然または組み換えポリペプチドである。

40

【0048】

ポリペプチドとして、前述のポリペプチドのフラグメント、誘導体、アナログまたはバリエント、およびその任意の組み合わせもまた含まれる。本明細書に記載される抗体または抗体ポリペプチドに言及するとき、用語「フラグメント」、「バリエント」、「誘導体」および「アナログ」は、対応する天然の結合分子、抗体、またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドを含む。本明細書に記載されるポリペプチドのフラグメントは、本明細書における他のところで考察される特定の抗体フラ

50

グメントに加えて、タンパク分解性フラグメント、ならびに欠失フラグメントを含む。本明細書に記載される抗体および抗体ポリペプチドのバリエーションは、上で記載されたフラグメント、およびアミノ酸置換（例えば、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換）、欠失、または挿入に起因する、変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドもまた含む。バリエーションは、天然に生じるか、または天然に生じないものであってもよい。天然に生じないバリエーションは、当該技術分野で公知の変異誘発技術を使用して生成されてもよい。バリエーションポリペプチドは、保存的または非保存的アミノ酸置換（例えば、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換）、欠失あるいは付加を含んでもよい。BMPRI/BMPRII特異的な結合分子、例えば、本明細書に記載される抗体および抗体ポリペプチドの誘導体は、天然のポリペプチド上で見られないさらなる特性を示すように変更されているポリペプチドである。例としては、融合タンパク質が挙げられる。バリエーションポリペプチドはまた、「ポリペプチドアナログ」として本明細書において言及されてもよい。本明細書で使用される場合、結合分子もしくはそのフラグメント、抗体、または抗体ポリペプチドの「誘導体」は、機能的な側鎖の反応によって化学的に誘導体化された1つまたは複数の残基を有する対象ポリペプチドを指す。20種の標準的なアミノ酸の1つまたは複数の天然に生じるアミノ酸誘導体を含むそのペプチドもまた、「誘導体」として含まれる。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンに置換されてもよく、5-ヒドロキシリジンは、リジンに置換されてもよく、3-メチルヒスチジンは、ヒスチジンに置換されてもよく、ホモセリンは、セリンに置換されてもよく、オルニチンは、リジンに置換されてもよい。

10

【0049】

20

用語「ポリヌクレオチド」は、単数形の核酸ならびに複数形の核酸を包含することが意図され、単離された核酸分子またはコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはプラスミドDNA（pDNA）を指す。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合または従来のものではない結合（例えば、ペプチド核酸（PNA）で見られるような、アミド結合）を含んでもよい。用語「核酸」は、ポリヌクレオチドに存在する、任意の1つまたは複数の核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNAフラグメントを指す。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドによって、その天然の環境から取り出されている、核酸分子、DNAまたはRNAが意図される。例えば、ベクターに含有される抗体をコードする組み換えポリヌクレオチドは、本明細書に記載される目的のため単離されることが考慮される。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞において維持された組み換えポリヌクレオチドまたは溶液中の（部分的もしくは実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロのRNA転写物を含む。本明細書に記載される単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は、合成的に生成されるこのような分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどの制御エレメントであってもよく、または含んでもよい。

30

【0050】

本明細書で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の部分である。「終止コドン」（TAG、TGA、またはTAA）は、アミノ酸に翻訳されないが、コード領域の一部であるとみなされ得るが、任意の隣接配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどは、コード領域の一部ではない。本明細書に記載される2つ以上のコード領域は、単一のポリヌクレオチドコンストラクトに、例えば、単一のベクター上に、または別個のポリヌクレオチドコンストラクトに、例えば、別個（異なる）ベクター上に存在し得る。さらに、任意のベクターは、単一のコード領域を含有してもよいが、または2つ以上のコード領域を含んでもよく、例えば、単一のベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードしてもよい。加えて、本明細書に記載されるベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、結合分子、抗体、またはそのフラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードする核酸に融合されているか、または融合されていない、異種コード

40

50

領域をコードしてもよい。異種コード領域は、非限定的に、分泌シグナルペプチドもしくは異種機能的ドメインなどの、特殊なエレメントまたはモチーフを含む。

【0051】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸は、DNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つまたは複数のコード領域と作動可能に結合されたプロモーターおよび/または他の転写もしくは翻訳調節エレメントを含み得る。作動可能な結合は、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドについてのコード領域のとき、制御配列の影響または調節下で遺伝子産物の発現を生じるような方法で、1つまたは複数の制御配列と結合する。2つのDNAフラグメント(ポリペプチドコード領域およびそれと結合したプロモーターなど)は、プロモーター機能の誘導が、所望される遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、および2つのDNAフラグメント間の結合の性質が、遺伝子産物の発現を指示する発現制御配列の能力と干渉しないか、または転写されるべきDNA鋳型の能力と干渉しない場合、「作動可能に結合される」または「作動可能に連結される」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターが、その核酸の転写に作用する能力があった場合、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に結合されるだろう。プロモーターは、予め決められた細胞においてのみDNAの実質的な転写を指示する細胞特異的プロモーターであってもよい。他の転写調節エレメント、加えて、プロモーター、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルは、ポリヌクレオチドと作動可能に結合して、細胞特異的な転写を指示することができる。適当なプロモーターおよび他の転写調節領域は、本明細書に開示される。

10

20

【0052】

様々な転写調節領域が、当業者に公知である。これらは、非限定的に、サイトメガロウイルス(最初期プロモーター、イントロン-Aと合わせた)、サルウイルス40(初期プロモーター)、およびレトロウイルス(ラウス肉腫ウイルスなど)由来のプロモーターおよびエンハンサーセグメントなどの、脊椎動物細胞において機能する転写調節領域を非限定的に含む。他の転写調節領域は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモンおよびウサギ - グロビンなどの脊椎動物遺伝子由来のもの、ならびに真核細胞において遺伝子発現を調節する能力がある他の配列を含む。さらなる適当な転写調節領域は、組織特異的プロモーターおよびエンハンサーならびにリンホカイン誘導性プロモーター(例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導可能なプロモーター)を含む。

30

【0053】

同様に、様々な翻訳調節エレメントが、当業者に公知である。これらは、リボソーム結合部位、翻訳開始および終止コドン、ならびにピコルナウイルス由来のエレメント(具体的には、配列内リボソーム進入部位、またはCITE配列としても言及されるIRES)を含むが、これらに限定されない。

【0054】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、RNA、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)の形態のRNAである。

40

【0055】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドおよび核酸コード領域は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指示する、分泌またはシグナルペプチドをコードするさらなるコード領域と結合されてもよい。シグナル仮説によると、哺乳類細胞によって分泌されるタンパク質は、成長しているタンパク質鎖の粗面小胞体を越えた排出が開始されると、成熟タンパク質から切断される、シグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドが、一般的に、完全または「全長」ポリペプチドから切断されて、分泌または「成熟」形態のポリペプチドを生成する、ポリペプチドのN末端に融合されたシグナルペプチドを有することを理解している。一部の実施形態では、天然のシグナルペプチド、例えば、免

50

疫グロブリン重鎖または軽鎖シグナルペプチドが使用されるか、またはそれと順に配列する機能的誘導体は、それと作動可能に結合しているポリペプチドの分泌を指示する能力を保持する。あるいは、異種哺乳類シグナルペプチド、またはその機能的誘導体を使用されてもよい。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (T P A) またはマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列で置換することができる。

【 0 0 5 6 】

別段述べられない限り、用語「障害」および「疾患」は、本明細書において互換的に使用される。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される場合、「結合分子」は、主に、抗体、およびそのフラグメントに関するが、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合性複合体 (M H C) 分子、熱ショックタンパク質 (H S P) などのシャペロンならびにカドヘリン、インテグリン、C型レクチンおよび免疫グロブリン (I g) スーパーファミリーのメンバーなどの細胞と細胞の接着分子を含むが、これらに限定されない、B M P R I / B M P R I I に結合する他の非抗体分子も指し得る。したがって、本開示の範囲を制限することなく、明確化のみのため、以下の実施形態の大部分は、抗体および抗体様分子に関して考察され、治療および診断用薬剤の開発のための結合分子の特定の実施形態を表す。

【 0 0 5 8 】

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、本明細書において互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む、B M P R I / B M P R I I - 結合分子である。脊椎動物システムにおける基本的な免疫グロブリン構造は、比較的よく解明されており、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) を参照のこと。本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、少なくとも1つ (例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ) の相補性決定領域 (C D R) (例えば、免疫グロブリン軽鎖由来の3つのC D R のいずれか、または免疫グロブリン重鎖由来の3つのC D R のいずれか) を含有し、エピトープに特異的に結合することができる、任意の抗原 - 結合分子を指す。抗体の非限定的な例としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体が挙げられる。一部の実施形態では、抗体は、ヒト抗体のF c 領域を含有することができる。用語、抗体はまた、誘導体、例えば、二重特異性抗体、単鎖抗体、ダイアボディ、線形抗体、および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体を含む。

【 0 0 5 9 】

以下でより詳細に考察される通り、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に区別され得る、広範な種類のポリペプチドを含む。当業者は、重鎖が、いくつかのサブクラス、中でも (例えば、1 - 4) を含むガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン (、 μ、 、) として分類されることを理解するだろう。それは、抗体の「クラス」を、それぞれ、I g G、I g M、I g A、I g G、またはI g Eとして決定する、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス (アイソタイプ)、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1などは、十分に特徴付けられており、機能的な専門性を付与することが知られている。これらのクラスおよびアイソタイプのそれぞれの修飾されたバージョンは、当業者は、本開示を考慮して容易に識別可能であり、したがって、本開示の範囲内にある。全ての免疫グロブリンクラスは、明らかに本開示の範囲内であり、以下の考察は、一般に、免疫グロブリン分子のI g Gクラスに関する。I g Gに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000~70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、典型的には、「Y」立体配置でジスルフィド結合によって結合され、軽鎖は、「Y」の入り口で始まり、可変領域中続く重鎖を挟む。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

軽鎖は、カッパーまたはラムダ（ κ 、 λ ）のいずれかとして分類される。それぞれの重鎖クラスは、カッパーまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合し得る。一般に、軽鎖および重鎖は、互いに共有結合し、2つの重鎖の「テール」部分は、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、B細胞もしくは遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって生成される場合、共有結合性のジスルフィド結合、または非共有結合性の結合によって、互いに結合される。重鎖において、アミノ酸配列は、Y立体配置のフォーク端にあるN末端から、それぞれの鎖の下部にあるC末端になる。

【0061】

軽鎖と重鎖の両方は、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。用語「定常」および「可変」は、機能的に使用される。この点について、軽（VL）鎖部分と重（VH）鎖部分の両方の可変ドメインが、抗原認識および特異性を決定すると理解されるだろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン（CL）および重鎖の定常ドメイン（CH1、CH2またはCH3）は、分泌、経胎盤性移動度、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。従来、定常領域ドメインのナンバリングは、抗原結合部位または抗体のアミノ末端からより遠位になるほど増す。N末端部分は、可変領域であり、C末端の部分は、定常領域であり、CH3およびCLドメインは、実際に、それぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0062】

上で示された通り、可変領域により、抗体が、抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することが可能になる。すなわち、抗体のVLドメインおよびVHドメイン、または相補性決定領域（CDR）のサブセットを組み合わせて、3次元の抗原結合部位を定義する可変領域を形成する。この4次抗体構造は、Yのそれぞれのアームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、VHおよびVL鎖のそれぞれにある3つのCDRによって定義される。BMPRI/BMPRIIに特異的に結合するのに十分な構造を含有する任意の抗体または免疫グロブリンフラグメントは、「結合フラグメント」または「免疫特異的フラグメント」として本明細書において互換的に示される。

【0063】

天然に生じる抗体において、抗体は、抗体が水溶液環境においてその3次元の立体配置をとる際に抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置決めされる、短い、不連続配列のアミノ酸である、それぞれの抗原結合ドメインに存在する「相補性決定領域」または「CDR」ともときに呼ばれる、6つの超可変領域を含む。「CDR」は、分子間可変性をほとんど示さない、4つの比較的保存された「フレームワーク」領域または「FR」によって隣接される。フレームワーク領域は、大部分、シート立体構造に適合し、CDRは、結合するループを形成し、ある場合では、シート構造の一部を形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合性の相互作用によって正しい向きにCDRを位置決めするスキャフォールドを形成するよう作用する。位置決めされたCDRによって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を定義する。この相補的な表面は、抗体のそのコグネートエピトープへの非共有結合性の結合を促進する。それぞれ、CDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸は、正確に定義されているので、当業者によって、任意の所定の重鎖または軽鎖可変領域について容易に定義され得、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる、“Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); および Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917を参照のこと。

【0064】

当該技術分野で使用され、および/または認容される用語の2つ以上の定義が存在する場合、本明細書で使用される用語の定義は、逆に明示的に述べられない限り、全てこのような意味を含むことが意図される。具体的な例は、重鎖と軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内で見られる部位を組み合わせた連続しない抗原を記載するための、用語「相補性決

10

20

30

40

50

定領域」(「CDR」)の使用である。この特定の領域は、参照により本明細書に組み込まれる、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196(1987), 901-917によって記載されており、互いに比較された場合、定義が、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにも関わらず、抗体またはそのバリエーションのCDRを指すためのいずれかの定義の適用は、本明細書において定義され、使用される用語の範囲内にあることが意図される。上で引用された参考文献のそれぞれによって定義されるCDRを包含する適切なアミノ酸残基は、比較として、表Aにおいて以下で記載される。特定のCDRを包含する正確な残基数は、CDRの配列およびサイズに依存して変動するだろう。当業者は、どの残基が、抗体の可変領域アミノ酸配列を付与した抗体のヒトIgGサブタイプ特定の超可変領域またはCDRを含むかどうかを、日常的に決定することができる。

10

【0065】

【表1】

表A:例示的なCDR定義¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31~35	26~32
VH CDR2	50~65	52~58
VH CDR3	95~102	95~102
VL CDR1	24~34	26~32
VL CDR2	50~56	50~52
VL CDR3	89~97	91~96

20

¹表Aにおける全てのCDR定義のナンバリングは、Kabatら(以下を参照のこと)によって記載されるナンバリング慣習による。

【0066】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能である可変ドメイン配列のナンバリングシステムを定義した。当業者は、配列自体を超えて任意の実験データを信頼することなく、「Kabatナンバリング」のこのシステムを任意の可変ドメイン配列に明確に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「Kabatナンバリング」は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)によって記載されるナンバリングシステムを指す。別段特定されない限り、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体における特定のアミノ酸残基位置のナンバリングへの言及は、Kabatナンバリングシステムによるが、理論上のものであり、等しく、本明細書に記載される全ての抗体に適用することはできない。例えば、第一のCDRの位置に応じて、以下のCDRは、いずれかの向きにシフトされてもよい。

30

【0067】

混乱を回避するため、用語、CDRが、CDRを同定するために使用される方法を特定することなく使用される場合、用語は、例えば、表1に示される通り、Paratome予測方法を使用して同定されるCDRを指す。

40

【0068】

本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント、免疫特異的フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、マウス化もしくはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合フラグメント、例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、Fv、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VLもしくはVHドメインのいずれかを含むフラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成され

50

るフラグメント、ならびに抗イディオタイプ（抗 I d）抗体（例えば、本明細書に開示される抗体に対する抗 I d 抗体を含む）を含むが、これらに限定されない。S c F v 分子は、当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第 5, 892, 019 号明細書において記載される。本明細書に記載される免疫グロブリンまたは抗体分子は、任意のタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、および I g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2）またはサブクラスの免疫グロブリン分子であり得る。

【0069】

一部の実施形態では、抗体は、5 価の構造を有する I g M またはその誘導体ではない。特に、具体的な適用、特に、治療的な使用において、I g M は、それらの 5 価の構造および親和性成熟の欠如により、しばしば、非特異的交差反応性および非常に低い親和性を示すため、I g G および他の 2 価の抗体または対応する結合分子ほど有用ではない。

10

【0070】

一部の実施形態では、抗体は、5 価の構造を有する I g M またはその誘導体である。

【0071】

一部の実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体ではなく、すなわち、それは、血漿免疫グロブリン試料から得られる混合物であるよりむしろ、実質的に 1 つの特定の抗体種からなる。

【0072】

単鎖抗体を含む抗体フラグメントは、可変領域を単独で、または以下のヒンジ領域、C H 1、C H 2、および C H 3 ドメインの全体もしくは一部と組み合わせて含んでもよい。ヒンジ領域、C H 1、C H 2、および C H 3 ドメインとの可変領域の任意の組み合わせをまた含む B M P R I / B M P R I I - 結合フラグメントがまた、本明細書において提供される。本明細書に記載される抗体またはその免疫特異的フラグメントは、鳥類および哺乳類を含む、任意の動物起源由来であってよい。一部の実施形態では、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはトリ抗体である。別の実施形態では、可変領域は、起源が軟骨魚類（例えば、サメ由来）であってよい。

20

【0073】

一部の実施形態では、抗体は、ヒトから単離されたヒトモノクローナル抗体である。任意選択で、ヒト抗体のフレームワーク領域は、データベースにおける関連のヒト生殖系列可変領域配列に従い、整列され、適用される、例えば、M R C C e n t r e f o r P r o t e i n E n g i n e e r i n g (C a m b r i d g e , U K) によって主催される V b a s e (v b a s e . m r c - c p e . c a m . a c . u k) を参照のこと。例えば、真の生殖系列配列と潜在的に逸脱するとみなされるアミノ酸は、クローニングプロセス中に組み込まれる P C R プライマー配列に起因し得る。ファージディスプレイ抗体ライブラリー由来の単鎖抗体フラグメント (s c F v) などの人工的に生成されたヒト様抗体または異種マウスと比較して、本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体は、(i) 動物代替のものよりむしろ、ヒト免疫応答を使用して得られていること、すなわち、抗体は、ヒト身体におけるその関連する立体構造の天然の B M P R I / B M P R I I に応答して生成されること、(i i) 個体を保護すること、または B M P R I / B M P R I I の存在が少なくとも重要であること、および (i i i) 抗体が、ヒト起源のものであるため、自己抗原に対する交差反応性のリスクが最小にされることによって特徴付けられる。したがって、本明細書で使用される場合、用語「ヒトモノクローナル抗体」、「ヒトモノクローナル自己抗体」、「ヒト抗体」などは、ヒト起源のものである、すなわち、B 細胞もしくはそのハイブリドーマなどのヒト細胞から単離された、またはヒト細胞、例えば、ヒトメモリー B 細胞の m R N A から直接クローニングされた c D N A から単離された、B M P R I / B M P R I I 結合分子を示すために使用される。ヒト抗体は、たとえ、抗体においてアミノ酸置換がなされて、例えば、結合特徴を改善するとしても、依然として「ヒト」である。

30

40

【0074】

50

下で、例えば、K u c h e r l a p a t iらによる米国特許第 5, 9 3 9, 5 9 8 号明細書において記載される、ヒト免疫グロブリンライブラリー由来または1つもしくは複数のヒト免疫グロブリンのトランスジェニックであり、内在性免疫グロブリンを発現しない動物由来の抗体は、本明細書に記載される真のヒト抗体から区別するために、ヒト様抗体と示す。

【 0 0 7 5 】

例えば、ファージディスプレイから典型的に単離された合成および半合成抗体などのヒト様抗体の重鎖と軽鎖の対形成は、必ずしも、本来のヒトB細胞で生じるように、本来の対形成を反映しない。したがって、先行技術分野で一般的に使用される組み換え発現ライブラリーから得られる F a b および s c F v フラグメントは、免疫原性および安定性に対する全ての可能性のある関連する作用を用いて人工的であるとみなすことができる。

10

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用される場合、用語「重鎖部分」は、免疫グロブリン重鎖由来のアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、C H 1 ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中部、および/もしくは下部ヒンジ領域）ドメイン、C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン、またはそのバリエーションもしくはフラグメントのうち少なくとも1つを含む。例えば、本明細書に記載される方法において使用するための結合ポリペプチドは、C H 1 ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC H 2 ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1 ドメインおよびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖、またはC H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、C H 2 ドメイン、およびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖を含んでもよい。別の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは、C H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本明細書に記載される方法において使用するための結合ポリペプチドは、C H 2 ドメインの少なくとも一部（例えば、C H 2 ドメインの全てまたは一部）を欠いてもよい。上で記載された通り、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）が、天然に生じる免疫グロブリン分子とアミノ酸配列が異なるように、修飾されてもよいことは、当業者によって理解されるだろう。

20

【 0 0 7 7 】

本明細書に開示されるある特定の抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体において、多量体の1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体の第二のポリペプチド鎖のものと同一である。あるいは、本明細書に記載される重鎖部分を含有する単量体は、同一ではない。例えば、それぞれの単量体は、例えば、二重特異性抗体またはダイアボディを形成する、異なる標的結合部位を含んでもよい。

30

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態では、本明細書に開示される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、s c F v などの単一のポリペプチド鎖からなり、可能性のあるインビボでの治療および診断的な適用のため、細胞内（イントラボディ）で発現されるべきである。

【 0 0 7 9 】

本明細書に開示される診断および処置方法における使用のための結合ポリペプチドの重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子由来であってもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、I g G 1 分子由来のC H 1 ドメインおよびI g G 3 分子由来のヒンジ領域を含んでもよい。別の例では、重鎖部分は、一部、g G 1 分子に由来するヒンジ領域、および一部、I g G 3 分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例では、重鎖部分は、一部、I g G 1 分子に由来するキメラヒンジ、および一部、I g G 4 分子に由来するキメラヒンジを含み得る。

40

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される場合、用語「軽鎖部分」は、免疫グロブリン軽鎖由来のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、軽鎖部分は、V L またはC L ドメインの少なくとも1

50

つを含む。

【0081】

抗体についてのペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4～5のアミノ酸であると考えられる。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも7、少なくとも9または少なくとも約15～約30のアミノ酸を含有してもよい。CDRは、その3次形態の抗原ペプチドまたはポリペプチドを認識することができるため、エピトープを含むアミノ酸は、連続していることを必要とせず、ある場合では、同じペプチド鎖上になくてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体によって認識されるペプチドまたはポリペプチドエピトープは、BMPRI/BMPRIIの少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、または約5～約30、約10～約30もしくは約15～約30の連続する、または連続しないアミノ酸の配列を含有する。

10

【0082】

本明細書において互換的に使用される、「特異的に結合すること」、または「特異的に認識すること」によって、結合分子、例えば、抗体が、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、および結合が、抗原結合ドメインとエピトープの間で一部の相補性を必要とすることが、一般的に意味される。この定義によると、抗体は、無作為の関連しないエピトープと結合するより容易に、その抗原結合ドメインを介して、そのエピトープに結合する場合に、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。当業者は、抗体が、連続しないエピトープの線形部分に対応するアミノ酸残基を含むか、またはからなる単離されたポリペプチドに特異的に結合するか、または特異的に認識し得ることを理解する。用語「特異性」は、ある特定の抗体が、ある特定のエピトープに結合する、相対的な親和性を述べるために本明細書において使用される。例えば、抗体「A」は、所定のエピトープについて、抗体「B」より高い特異性を有すると考えられ得るか、または抗体「A」は、それが、関連するエピトープ「D」について有するより高い特異性で、エピトープ「C」に結合すると言われ得る。

20

【0083】

存在する場合、その文法上の形の全ての、抗体の抗原との、用語「免疫学的結合特徴」、または他の結合特徴は、抗体の特異性、親和性、交差反応性、および他の結合特徴を指す。

30

【0084】

「優先的に結合すること」によって、結合分子、例えば、抗体が、関連する、類似の、相同な、または類似のエピトープに結合するより容易にエピトープに特異的に結合することが意味される。したがって、所定のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、関連するエピトープと交差反応し得るが、関連するエピトープよりむしろ、そのエピトープに結合する可能性が高いであろう。

【0085】

非限定的な例として、結合分子、例えば、抗体は、第二のエピトープについての抗体の解離定常(K_D)未満である K_D で第一のエピトープに結合する場合、第一のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第二のエピトープについての抗体の K_D より少なくとも1桁低い親和性で第一のエピトープに結合する場合、第一の抗原に優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第二のエピトープについての抗体の K_D より少なくとも2桁低い親和性で第一のエピトープに結合する場合、第一のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。

40

【0086】

別の非限定的な例では、結合分子、例えば、抗体は、第二のエピトープについての抗体のオフレート(k_{off})未満である k_{off} で第一のエピトープに結合する場合、第一のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第二のエピトープについての抗体の k_{off} より少なくとも1桁低い親和性で第

50

一のエピトープに結合する場合、第一のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第二のエピトープについての抗体の $k(\text{off})$ より少なくとも2桁低い親和性で第一のエピトープに結合する場合、第一のエピトープに優先的に結合するとみなされ得る。

【0087】

結合分子、例えば、抗体は、参照抗体のエピトープへの結合をある程度まで遮断する程度まで、そのエピトープに優先的に結合する場合、参照抗体の所定のエピトープへの結合を競合的に阻害すると言われる。競合的阻害は、当該技術分野において公知の任意の方法、例えば、競合的ELISAアッセイによって決定され得る。抗体は、参照抗体の所定のエピトープへの結合を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、競合的に阻害すると言われてもよい。当業者は、抗体のそのエピトープへの結合がまた、抗体ではない結合分子によって競合的に阻害され得ることを理解する。

10

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、個々のエピトープの結合分子、例えば、免疫グロブリン分子のCDRとの結合の強さの測定値を指し、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.(1988)の27~28頁を参照のこと。本明細書で使用される場合、用語「アビディティ」は、免疫グロブリンと抗原の集団の間の複合体の全体的な安定性、すなわち、免疫グロブリン混合物の抗原との機能的結合強度を指し、例えば、Harlowの29~34頁を参照のこと。アビディティは、集団における個々の免疫グロブリン分子の特定のエピトープとの親和性と免疫グロブリンと抗原の結合価の両方に関する。例えば、2価のモノクローナル抗体と、ポリマーなどの、高度な反復性エピトープ構造を有する抗原の間の相互作用は、高いアビディティの1つであるだろう。抗体の抗原に対する親和性またはアビディティは、任意の適当な方法を使用して実験的に決定することができ、例えば、Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y(1984)、Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y(1992)、および本明細書に記載される方法を参照のこと。抗体の抗原に対する親和性を測定する一般的な技術は、ELISA、RIA、および表面プラズモン共鳴を含む。特定の抗体と抗原の相互作用の測定された親和性は、異なる条件、例えば、塩濃度、pHの下で測定される場合、変動し得る。したがって、親和性および他の抗原結合パラメーター、例えば、 K_D 、IC50の測定値は、好ましくは、抗体と抗原の標準化溶液、および標準化バッファを用いて得られる。

20

30

【0089】

結合分子、例えば、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント、リアントもしくは誘導体はまた、それらの交差反応性に関して記載されるか、または特定されてもよい。本明細書で使用される場合、用語「交差反応性」は、1つの抗原に特異的な抗体の、第二の抗原と反応する能力；2つの異なる抗原物質の間の関連性の測定値を指す。したがって、抗体は、その形成を誘導したもの以外のエピトープに結合する場合、交差反応性である。交差反応性エピトープは、一般に、誘導性エピトープと同じ相補的な構造特性の多くを有し、ある場合では、実際に本来のものより良好に適合し得る。

40

【0090】

例えば、ある特定の抗体は、ある程度の交差反応性を有し、参照エピトープと関連するが、同一でないエピトープ、例えば、参照エピトープと少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%の同一性（本明細書に記載される技術分野で公知の方法を使用して計算される）を有するエピトープに結合する。抗体は、参照エピトープと95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%

50

未満の同一性（本明細書に記載される技術分野で公知の方法を使用して計算される）でエピトープに結合しない場合、交差反応性をほとんど有さないか、または有さないと言われ得る。抗体は、そのエピトープの任意の他のアナログ、オルソログ、または相同体と結合しない場合、ある特定のエピトープに「高度に特異的」とみなされ得る。

【0091】

結合分子、例えば、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント、バリアントもしくは誘導体はまた、BMPRI/BMPRIIに対するそれらの結合親和性に関して記載されるか、または特定されてもよい。

【0092】

既に示された通り、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および3次元立体配置は、周知である。本明細書で使用される場合、用語「VHドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端の可変ドメインを含み、用語「CH1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖の第一の（大部分のアミノ末端の）定常領域ドメインを含む。CH1ドメインは、VHドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に対してアミノ末端にある。

10

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「CH2ドメイン」は、例えば、Fcドメインにおける、従来のナンバリングスキームを使用した抗体のおよそ残基244～残基360（残基244～360、Kabataナンバリングシステム；および残基231～340、EUNナンバリングシステム；前に記載したKabata EAらを参照のこと）に広がる重鎖分子の部分を含む。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対形成されない点で固有である。むしろ、2つのN結合した分岐の炭水化物鎖は、インタクトな天然のIgG分子の2つのCH2ドメイン間に挟まれる。CH3ドメインは、IgG分子のCH2ドメインからC末端に広がり、約108残基を含むことはまた、十分に実証されている。

20

【0094】

本明細書で使用される場合、用語「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに結び付ける重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、約25残基を含み、可動性であり、これにより、2つのN末端の抗原結合領域が、独立して移動することが可能になる。ヒンジ領域は、3つの別個のドメイン：上部、中部、および下部ヒンジドメインに分けることができ、Roux et al., J. Immunol. 161(1998), 4083を参照のこと。

30

【0095】

本明細書で使用される場合、用語「ジスルフィド結合」は、2つの硫黄原子間で形成された共有結合を含む。アミノ酸システインは、第二のチオール基とジスルフィド結合または架橋を形成し得るチオール基を含む。大部分の天然に生じるIgG分子において、CH1およびCL領域は、ジスルフィド結合によって結合され、2つの重鎖は、Kabataナンバリングシステムを使用して239および242（226位または229位、EUNナンバリングシステム）に対応する位置で2つのジスルフィド結合によって結合される。

【0096】

本明細書で使用される場合、用語「結合した」、「融合した」または「融合」は、互換的に使用される。これらの用語は、化学的な結合または組み換え手段を含むどんな手段によっても、2つ以上のエレメントまたは成分を互いに結合することを指す。「インフレームの融合」は、本来のORFの正しい翻訳リーディングフレームを維持する様式で、連続するより長いORFを形成するための2つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ORF）の結合を指す。したがって、組み換え融合タンパク質は、本来のORF（そのセグメントは、通常では、天然で結合されない）によってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含有する、単一のタンパク質である。したがって、リーディングフレームは、融合されたセグメント中で連続して作られるが、セグメントは、例えば、インフレームリンカー配列によって、物理的または空間的に区切られてもよい。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドは、インフレームで融合されてもよいが、「融合された」CDRが、連続するポリペプチドの一部と

40

50

して同時翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域またはさらなるCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって区切られてもよい。

【0097】

本明細書で使用される場合、用語「発現」は、遺伝子が、生化学物質、例えば、RNAまたはポリペプチドを産生するプロセスを指す。プロセスは、非限定的に、遺伝子ノックダウンならびに一過性発現と安定的な発現の両方を含む、細胞内での遺伝子の機能的存在の任意の出現を含む。それは、非限定的に、遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)または任意の他のRNA産物への転写、およびこのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳を含む。最終的な所望される産物が、生化学物質である場合、発現は、その生化学物質および任意の前駆物質の生成を含む。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を産生する。本明細書で使用される場合、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって産生されるメッセンジャーRNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を有する核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの結合、タンパク質切断などを有するポリペプチドをさらに含む。

10

【0098】

本明細書で使用される場合、用語「試料」は、対象または患者から得られた、任意の生物学的材料を指す。一態様では、試料は、血液、血漿または尿を含み得る。他の態様では、試料は、全血、血漿、血液試料から濃縮されたB細胞、および培養細胞(例えば、対象由来のB細胞)を含み得る。試料はまた、神経組織を含む生検または組織試料を含み得る。なお他の態様では、試料は、細胞全体および/または細胞の溶解物を含み得る。血液試料は、当該技術分野で公知の方法によって収集することができる。一態様では、ペレットは、200µlのバッファー(20mM Tris、pH 7.5、0.5% Nonidet、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1M NaCl、IX Sigmaプロテアーゼインヒビター、ならびにIX Sigmaホスファターゼインヒビター1および2)中、4でボルテックスすることによって、再懸濁することができる。懸濁液を、断続的なボルテックスを用いて氷上で20分間維持することができる。15,000×g、約4で5分間スピンドウンした後、上清のアリコートは、約-70で保存することができる。

20

30

【0099】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」または「処置」は、治療的処置と予防的または予防的測定の間を指し、目的は、本明細書に記載される所望されない生理学的変化または障害を防ぐか、または遅延させる(和らげる)ことである。有益または所望される臨床結果は、検出可能であるか、または検出不可能であるかどうかに関わらず、症状の軽減、疾患の程度の減弱、疾患の安定化した(すなわち、悪化していない)状態、疾患の進行の遅延または遅くすること、疾患状態の寛解または緩和、および軽減(部分的または全体的のいずれか)を含むが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けていない場合に予測される生存と比較して、延長している生存を意味し得る。処置を必要とするものは、既に状態もしくは障害を有するもの、ならびに状態もしくは障害を有する傾向にあるもの、または状態もしくは障害の出現が妨げられるべきものを含む。

40

【0100】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳類」によって、診断、予後、予防、または治療が望まれる、任意の対象、具体的には、哺乳類対象、例えば、ヒト患者が意味される。

【0101】

成分またはステップを含む、本明細書に記載される組成物または方法はまた、それらの成分またはステップから本質的になるか、またはからなることができる。

【0102】

50

I I . 抗体

抗 B M P R I / I I 抗体およびその抗原結合フラグメント、例えば、その抗原結合ドメイン、および融合物 / 多量体が提供される。抗 B M P R I / I I 抗体またはその抗原結合フラグメントの誘導体またはバリエーションもまた、本明細書において提供される。このような抗体またはその B M P R I / B M P R I I - 結合フラグメントもしくはその誘導体もしくはバリエーションを含むコンジュゲートもまた、本明細書において提供される。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその B M P R I / B M P R I I - 結合フラグメントは、以下の実施例のセクションにおいて説明される抗体について概説される、結合特徴および / または生物学的特性を示す。

【 0 1 0 3 】

抗体およびその抗原結合フラグメント、例えば、抗原結合ドメインは、それらの可変領域、例えば、結合ドメイン、本明細書において示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む V H および / または V L 可変領域の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) を含むことによって特徴付けられてもよい。上で同定された可変領域をコードする例示的な対応するヌクレオチド配列は、本明細書に記載される (以下を参照のこと) 。 V H および / または V L 領域の上記のアミノ酸配列の C D R の例示的なセットは、以下で提供される。 C D R についての例示的な対応するフレームワーク領域はまた、本明細書において提供される。しかしながら、以下で考察される通り、当業者は、加えて、または代わりに、それらのアミノ酸配列が、本明細書に記載されるものと、 1 つ、 2 つ、 3 つのアミノ酸または C D R 2 および C D R 3 の場合、なおさらなるアミノ酸で異なる C D R が使用され得ることを、十分に認識する。

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載される抗原結合ドメインは、実施例、表 1、または図 7 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはからなる少なくとも 1 つの C D R を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントは、実施例、表 1、または図 7 に示されるアミノ酸配列を含む、またはからなる 1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、 5 つまたは 6 つの C D R を含む。以下の表は、例示的な s c F v 配列を提供する。

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

	クローン	Scfv 配列番号
BMPRI 標的		
ALK1 (ACVRL1);	クローン ALK1.2 (抗 ACVRL1/ALK1)	146
	クローン ALK1.3 (抗 ACVRL1/ALK1)	148
	クローン ALK1.8 (抗 ACVRL1/ALK1)*	150
	クローン ALK1.8b (抗 ACVRL1/ALK1)	152
ALK2 (ACVR1A);	クローン RI-2 (抗 ACVR1/ALK2)	160
	クローン RI-3 (抗 ACVR1/ALK2)	162
	クローン RI-4 (抗 ACVR1/ALK2)	164
	クローン RI-2-7 (抗 ACVR1/ALK2)	166
	クローン RI-9 (抗 ACVR1/ALK2)	168
ALK3 (BMPRI1A);	クローン B15 (抗 BMPRI1A/ALK3)	156
	クローン B16 (抗 BMPRI1A/ALK3)	158
ALK4 (ACVR1B);	クローン H5-2 (抗 ACVR1B/ALK4)	178
ALK5 (TGFB1);		--
ALK6 (BMPRI1B);	クローン H3-2 (抗 BMPRI1B/ALK6)	180
ALK7 (ACVR1C).	クローン H4-1 (抗 ACVR1C/ALK7)	182
	クローン H4-4 (抗 ACVR1C/ALK7)	184
	クローン H4-7 (抗 ACVR1C/ALK7)	186
	クローン H4-8 (抗 ACVR1C/ALK7)	188
BMPRII 標的		
ACTRIIA (ACVR2A);	クローン RII-19 (抗 ACVR2A/ACTRIIA)	170
	クローン HI-2 (抗 ACVR2A/ACTRIIA)	172
ACTRIIB (ACVR2B);	クローン H2-11 (抗 ACVR2B/ACTRIIB)	174
	クローン H2-15 (抗 ACVR2B/ACTRIIB)	176

10

20

30

40

【0106】

【表 2 - 2】

BMPRII (BMPR2);	クローン BMPR2.12 (抗 BMPR2/BMPRII)	154
	クローン BMPR2.23 (抗 BMPR2/BMPRII)	212

【0107】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、抗原結合ドメイン

50

ンは、本明細書、例えば、実施例、図7、および/または表1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)相補性決定領域1(CDR1)、VH CDR2、およびVH CDR3を含み、任意選択で、本明細書、例えば、実施例、図7、および/または表1に示される軽鎖可変領域(VL)CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3アミノ酸配列をさらに含む。

【0108】

一部の実施形態では、本明細書に記載される、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、抗原結合ドメインは、本明細書に記載される重鎖フレームワーク領域1(FR1)を含むVH(すなわち、配列番号146、148、150、152、154、160、162、164、166、168、156、158、178、180、182、184、186、188、170、172、174、176、または212のフレームワーク部分の一部または全て)を含む。

10

【0109】

一部の実施形態では、本明細書に記載される、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、抗原結合ドメインは、実施例、図7、および/もしくは表1におけるCDR配列と少なくとも95%同一のCDR配列を含む；実施例、図7、および/もしくは表1における相補性決定領域と同一であるVH CDR1、2、3およびVL CDR1、2、3を含む；図7における配列と少なくとも95%同一のVHおよび/もしくはVL配列を含む；または実施例、図7、および/もしくは表1における配列と少なくとも95%同一の配列を含む。

20

【0110】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原結合ドメイン、抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%、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100%の配列同一性を有する配列を含む、またはからなるVH CDR1、CDR2、もしくはCDR2、またはVL CDR1、CDR2、もしくはCDR3を含むVHを含む。

【0111】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、抗原結合ドメインは、参照アミノ酸配列、例えば、VHまたはLHにおける参照アミノ酸配列と比べて、0または1~10(例えば、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10)の変更、すなわち、アミノ酸置換、付加、または欠失を有する配列を含む。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。一部の実施形態では、変更は、CDRにおいてではなく、一部の実施形態では、CDRの1つにおける1または2つの変更、例えば、1つのCDR、例えば、1つの軽鎖CDRにおける最大2つの変更が存在する。このようなバリエーションは、親抗体またはその抗原結合フラグメントと同じ抗原に結合する能力を保持する。

30

【0112】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、荷電していない極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(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、トリプトファン)、ベータ-分岐の側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(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)を有するアミノ酸を含む。

40

【0113】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体のバリエーション(例えば、本明細書に記載されるアミノ酸配列のVHおよび/またはVLと比べて、アミノ酸置換、付加、または

50

欠失を有する抗体またはその抗原結合フラグメント)は、BMPRI/BMPRIIに結合する能力を保持し、および/または以下の実施例において記載される抗体の1つまたは複数の特徴を保持する。

【0114】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載されるアミノ酸配列を含む、またはからなる重鎖可変領域(VH)を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載されるアミノ酸配列を含む、またはからなる軽鎖可変領域(VL)を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載されるアミノ酸配列を含む、またはからなる重鎖可変領域(VH)を含み、本明細書に記載されるアミノ酸配列を含む、またはからなる軽鎖可変領域(VL)をさらに含む。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載される配列のVHおよびVLを含む。

10

【0115】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載されるVHを含む重鎖を含む。一部の例では、重鎖は、IgG定常領域を含む。一部の例では、重鎖は、ヒトIgG定常領域を含む。

【0116】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載されるVLを含む軽鎖を含む。一部の例では、軽鎖は、カッパー定常領域を含む。一部の例では、ヒトカッパー定常領域を含む。一部の例では、軽鎖は、ラムダ定常領域を含む。一部の例では、軽鎖は、ヒトラムダ定常領域を含む。

20

【0117】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるその抗体は、本明細書に記載されるVHを含む重鎖および本明細書に記載されるVLを含む軽鎖を含み、重鎖および/または軽鎖は、IgG(例えば、ヒトIgG)定常領域を含む。

【0118】

あるいは、本明細書に記載される抗体は、BMPRI/BMPRIIへの結合について、本明細書に記載されるVH CDR1~3を有する抗体と競合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、誘導体もしくはバリエーションである。あるいは、本明細書に記載される抗体は、BMPRI/BMPRIIへの結合について、本明細書に記載されるVL CDR1~3を有する抗体と競合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、誘導体、もしくはバリエーションである。あるいは、本明細書に記載される抗体は、BMPRI/BMPRIIへの結合について、本明細書に記載されるVH CDR1~3およびVL CDR1~3を有する抗体と競合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、誘導体、もしくはバリエーションである。あるいは、本明細書に記載される抗体は、BMPRI/BMPRIIへの結合について、本明細書に記載されるVHおよび/またはVLを有する抗体と競合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、誘導体、もしくはバリエーションである。それらの抗体は、特に治療適用のための、ヒト、げっ歯類(例えば、マウス)、キメラ、またはヒト化であってもよい。

30

40

【0119】

あるいは、本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載されるVHおよびVLを含む抗BMPRI/BMPRII抗体と同じエピトープに結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、誘導体もしくはバリエーションである。

【0120】

抗体間の競合は、試験中の免疫グロブリンが、参照抗体の、BMPRI/BMPRIIなどの、共通の抗原への特異的結合を阻害する、アッセイによって決定される。多数の種類の競合結合アッセイが知られており、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ(RIA)、固相直接または間接酵素免疫測定法(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ; Stahli et al., Methods in Enzymology 9(1983), 242-253を参照のこと;

50

固相直接ビオチン - アビジン E I A ; Kirkland et al., J. Immunol. 137(1986), 3614-3619およびCheung et al., Virology 176(1990), 546-552を参照のこと ; 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ ; Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1988)を参照のこと ; I 1 2 5 標識を使用した固相直接標識 R I A ; Morel et al, Molec. Immunol. 25(1988), 7-15およびMoldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32(1990), 77-82を参照のこと。典型的には、このようなアッセイは、これらの、標識されていない試験免疫グロブリンおよび標識された参照免疫グロブリンのいずれか、すなわち、本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体を生じる、固体表面または細胞に結合した、精製された B M P R I / B M P R I I またはその凝集物の使用を含む。競合的阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することによって測定される。通常、試験免疫グロブリンは、過剰に存在する。一部の実施形態では、競合結合アッセイは、当該技術分野で公知の条件下で行われる。競合アッセイ（競合する抗体）によって同定される抗体は、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体および生じる立体障害のため、参照抗体によって結合されるエピトープに十分に近い、隣接するエピトープへの抗体の結合を含む。通常、競合する抗体が過剰に存在するとき、それは、参照抗体の共通の抗原への特異的な結合を、少なくとも 50% または 75% 阻害するだろう。ゆえに、本発明は、B M P R I / B M P R I I への結合から、本明細書に記載される配列番号の V H および V L を含む参照抗体を競合的に阻害する抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーションもしくは誘導体をさらに対象とする。

10

20

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、免疫グロブリン重鎖可変領域（V H）を含む単離されたポリペプチドが、本明細書において提供され、重鎖可変領域の V H - C D R の少なくとも 1 つまたは重鎖可変領域の V H - C D R の少なくとも 2 つは、本明細書（例えば、V H C D R 配列について表 1 および実施例を参照のこと）に開示される抗体由来の参照重鎖 V H - C D R 1、V H - C D R 2 または V H - C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である。あるいは、V H の V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 領域は、本明細書（例えば、V H C D R 配列について表 1、図 7、および実施例を参照のこと）に開示される抗体由来の参照重鎖 V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である。したがって、本明細書に記載される重鎖可変領域は、表 1、図 7、および実施例の配列と関連する V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 ポリペプチド配列を有することができる。

30

40

【 0 1 2 2 】

C D R は、当業者によって、様々な方法 / システムによって定義される。これらのシステムおよび / または定義は、長年にわたり開発され、改良されており、K a b a t、C h o t h i a、I M G T、A b M、および C o n t a c t を含む。K a b a t 定義は、配列可変性に基づき、一般に、最も一般的に使用される。C h o t h i a 定義は、構造ループ領域の位置に基づく。I M G T システムは、可変ドメインの配列可変性および構造内の位置に基づく。A b M 定義は、K a b a t と C h o t h i a の間の折衷案である。C o n t a c t 定義は、入手可能な抗体結晶構造の分析に基づく。例示的なシステムは、K a b a t と C h o t h i a の組み合わせである。抗体配列の分析および C D R の決定のための、ソフトウェアプログラム（例えば、a b Y s i s (b i o i n f . o r g . u k / a b y s i s / s e q u e n c e _ i n p u t / k e y _ a n n o t a t i o n / k e y _ a n n o t a t i o n . c g i) および P a r a t o m e、Kunik et al. PLoS Comput Biol 8(2): e1002388(2012); Kunik et al., Nucleic Acids Res. 2012 Jul;40(Web Server issue):W521-4(2012))が、入手可能であり、当業者に知られている。

【 0 1 2 3 】

表 1 において定義される特定の C D R 配列は、一般に、P a r a t o m e 予測に基づく

50

。しかしながら、特定の抗体の重鎖 C D R もしくは複数の C D R および / または軽鎖 C D R もしくは複数の C D R への参照が、当業者に公知の全ての C D R 定義を包含することは、理解されるだろう。

【 0 1 2 4 】

表 1 が、Paratome システムによって定義される C D R を示す一方、他の C D R 定義、例えば、図 7 に示される Kabat、AbM、Contact、IMGT、または Chothia システムによって定義される C D R はまた、本発明に含まれ、図 7 および実施例において提示される配列を使用して、当業者によって容易に同定され得る。

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載される単離されたポリペプチドは、V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 領域が、本明細書に示される V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 配列と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (V H) を含み得る。

10

【 0 1 2 6 】

さらに、単離されたポリペプチドは、V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 領域が、いずれか 1 つの V H - C D R における 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 1 0 のアミノ酸置換を除き、表 1 または実施例に示される V H - C D R 1、V H - C D R 2 および V H - C D R 3 配列と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (V H) を含み得る。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的である。

20

【 0 1 2 7 】

単離されたポリペプチドは、軽鎖可変領域の V L - C D R の少なくとも 1 つまたは軽鎖可変領域の V L - C D R の少なくとも 2 つが、本明細書 (例えば、V L - C D R 配列について、実施例、表 1、および図 7 を参照のこと) に開示される抗体由来の参照軽鎖 V L - C D R 1、V L - C D R 2 または V L - C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一である、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) を含み得る。あるいは、V L の V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 領域は、本明細書 (例えば、V L - C D R 配列について実施例、表 1、および図 7 を参照のこと) に開示される抗体由来の参照軽鎖 V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であり得る。したがって、軽鎖可変領域は、表 1 または実施例の配列と関連する V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 ポリペプチド配列を有することができる。表 1 が、V L - C D R を示す一方、他の C D R 定義、例えば、Kabat または Chothia システムによって定義される V L - C D R もまた、本発明に含まれる。

30

【 0 1 2 8 】

V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 領域が、表 1 および図 7 の V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 配列と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) を含む単離されたポリペプチドがまた、本明細書において提供される。

40

【 0 1 2 9 】

単離されたポリペプチドはまた、V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 領域が、いずれか 1 つの V L - C D R における 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0 のアミノ酸置換を除き、表 1 または図 7 の V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 配列と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) を含み得る。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的である。

【 0 1 3 0 】

一般に、抗原結合ドメインのそれぞれは、表 1 または図 7 に列挙される単一クローン由来の C D R の全てを含むだろう。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗原結合能

50

を保持する限り、複数のクローン由来のCDRを含み得る。

【0131】

免疫グロブリンまたはそのコードするcDNAは、修飾することができる。したがって、本明細書に記載される方法は、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、Fab-フラグメント、二重特異性抗体、融合抗体、それらのいずれか1つの標識された抗体またはアナログを生成するステップのいずれか1つを含み得る。対応する方法が、当業者に公知であり、例えば、Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor(1988)に記載される。前記抗体の誘導体が、ファージディスプレイ技術によって得られるとき、BIACoreシステムにおいて利用される表面プラズモン共鳴を使用して、本明細書に記載される抗体のいずれか1つのものと同じエピトープに結合するファージ抗体の効率を増加させることができる(Schier, Human Antibodies Hybridomas 7(1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183(1995), 7-13)。キメラ抗体の生成は、例えば、国際公開第89/09622号パンフレットに記載される。ヒト化抗体の生成方法は、例えば、欧州特許出願公開第0239400号明細書および国際公開第90/07861号パンフレットに記載される。本発明に従って利用されるべき抗体のさらなる供給源は、いわゆる、異種抗体である。マウスにおけるヒト様抗体などの異種抗体の産生についての一般的な原理は、例えば、国際公開第91/10741号パンフレット、国際公開第94/02602号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレットおよび国際公開第96/33735号パンフレットに記載される。上で考察された通り、本明細書に記載される抗体は、完全抗体に加えて、例えば、Fv、FabおよびF(ab)2、ならびに単鎖を含む、様々な形態で存在し得、例えば、国際公開第88/09344号パンフレットを参照のこと。このような方法によって作製される抗体はまた、本明細書において提供される。

10

20

【0132】

本明細書に記載される抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖は、当該技術分野で公知の従来技術を使用して、例えば、アミノ酸欠失、挿入、置換、付加、ならびに/または組み換えおよび/もしくは当該技術分野で公知の任意の他の修飾を単独または組み合わせて使用することによって、さらに修飾することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎をなすDNA配列においてこのような修飾を導入する方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1989) N.Y.およびAusubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.(1994)を参照のこと。本明細書に記載される抗体の修飾は、側鎖修飾、骨格修飾、ならびにアセチル化、水酸化、メチル化、アミド化を含むNおよびC末端の修飾、および炭水化物または脂質部分、補助因子の付着などを含む、1つまたは複数の構成アミノ酸での化学および/または酵素誘導体化を含む。同様に、本発明は、カルボキシ末端で免疫刺激性リガンドなどの異種分子に融合した、アミノ末端で記載される抗体またはその一部のフラグメントを含む、キメラタンパク質の生成を包含し、対応する技術的な詳細については、例えば、国際公開第00/30680号パンフレットを参照のこと。

30

【0133】

加えて、重鎖CDR3(HCDR3)が、より高い程度の可変性および抗原と抗体の相互作用における主な関与を有する領域であることが、しばしば観察されるため、重鎖の特定のCDR3において、上記の結合分子を含有するもの、例えば、上述の抗体のいずれか1つの可変領域のCDR3領域を含有するものを含むペプチドが、本明細書において提供される。このようなペプチドは、容易に合成されるか、または本明細書に記載される結合剤を生成するための組み換え手段によって生成され得る。このような方法は、当業者に周知である。ペプチドは、例えば、市販されている、自動ペプチド合成装置を使用して、合成することができる。ペプチドはまた、ペプチドを発現するDNAを発現ベクターに取り込むこと、および発現ベクターを用いて細胞を形質転換して、ペプチドを産生することによる、組み換え技術によって産生することができる。

40

50

【0134】

ゆえに、結合分子、例えば、本明細書に記載される抗BMPRI/BMPRII抗体に結合し、上述の特性を提示する、すなわち、BMPRI/BMPRIIを特異的に認識する（結合する）、抗体またはその結合フラグメントが、本明細書に記載される。このような抗体および結合分子は、本明細書に記載される（例えば、実施例を参照のこと）ELISAおよびウエスタンブロットおよび免疫組織化学によって、それらの結合特異性および親和性について試験することができる。

【0135】

不死化B細胞またはBメモリー細胞の培養物から直接免疫グロブリンを得ることの代わりに、本明細書に記載される不死化細胞は、続く発現および/または遺伝子操作のための再配列された重鎖および軽鎖遺伝子座の供給源として使用することができる。再配列された抗体遺伝子を適切なmRNAから逆転写して、cDNAを産生することができる。必要に応じて、重鎖定常領域は、異なるアイソタイプのもものと交換され得るか、または除去され得る。可変領域を結合して、単鎖Fv領域をコードすることができる。複数のFv領域を結合して、1つより多くの標的に結合する能力を付与することができるか、またはキメラ重鎖と軽鎖の組み合わせを利用することができる。遺伝子材料が入手可能であると、所望される標的に結合するそれらの能力の両方を保持する、上で記載されたアナログの設計は、簡単である。抗体可変領域のクローニング方法および組み換え抗体の生成方法は、当業者に公知であり、例えば、Gilliland et al., Tissue Antigens 47(1996), 1-20 ; Doenecke et al., Leukemia 11(1997), 1787-1792に記載されている。

【0136】

適切な遺伝子材料が得られ、必要に応じて、アナログをコードするよう修飾されると、重鎖および軽鎖の可変領域を最小限でコードするものを含む、コード配列が、標準的な組み換え宿主細胞に遺伝子導入され得るベクターに含有される発現システムに挿入され得る。様々なこのような宿主細胞は、効率的なプロセッシングのため使用され得るが、哺乳類細胞が考慮されてもよい。この目的に有用な典型的な哺乳類細胞株は、CHO細胞、HEK293細胞、またはNSO細胞を含むが、これらに限定されない。

【0137】

次いで、抗体またはアナログの生成は、修飾された組み換え宿主を、宿主細胞の成長およびコード配列の発現に適切な培養条件下で培養することによって行われる。次いで、抗体は、培養物から単離することによって回収される。発現システムは、得られた抗体が、培地に分泌されるが、細胞内の産生もまた可能であるように、シグナルペプチドを含むよう設計される。

【0138】

上記に従い、本発明はまた、本明細書に記載される抗体または均等な結合分子をコードするポリヌクレオチドに関する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、上で記載される抗体の免疫グロブリン鎖の可変領域を少なくともコードする。典型的には、ポリヌクレオチドによってコードされる前記可変領域は、前記抗体の可変領域のVHおよび/またはVLの少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

【0139】

当業者は、上で記載された可変ドメインを有する抗体の可変ドメインが、所望される特異性および生物学的機能の他のポリペプチドまたは抗体の構築のため使用することができることを容易に理解するだろう。したがって、上で記載された可変ドメインの、少なくとも1つまたは複数のCDR、例えば、CDRの全てを含み、有利には、添付の実施例において記載される抗体と同じまたは類似の結合特性を実質的に有するポリペプチドおよび抗体が、本明細書において提供される。当業者は、結合親和性が、Kabattによって定義されたCDRと部分的に重複する、CDR内または超可変ループ内でアミノ酸置換を起こすことによって、増強することができることを知っており(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196(1987), 901-917)、例えば、Riechmann, et al, Nature 332(1988), 323-327を参照のこと。したがって、上述のCDRの1つまたは複数、1つも

10

20

30

40

50

しくは複数のアミノ酸置換、または2つ以下のアミノ酸置換を有する抗体がまた、本明細書において提供される。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、その免疫グロブリン鎖の1つまたは両方において、表1に記載される可変領域の2つまたは全3つのCDRを含む。

【0140】

当業者に公知の、結合分子、例えば、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、1つまたは複数のエフェクター機能を仲介する定常領域を含み得る。例えば、補体のC1成分の抗体定常領域への結合は、補体系を活性化し得る。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン作用および溶解において重要である。補体の活性化はまた、炎症応答を刺激し、自己免疫アレルギーにも関与し得る。さらに、抗体は、細胞上のFc受容体(FcR)に結合する抗体Fc領域上のFc受容体結合部位を有するFc領域を介して、様々な細胞上の受容体に結合する。IgG(ガンマ受容体)、IgE(イプシロン受容体)、IgA(アルファ受容体)およびIgM(ミュー受容体)を含む、異なるクラスの抗体に特異的である、多数のFc受容体が存在する。抗体の細胞表面上のFc受容体への結合は、抗体でコーティングされた粒子の生着および破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体でコーティングされた標的細胞の溶解(抗体依存性細胞介在性細胞傷害性、またはADCCと呼ばれる)、炎症性メディエーターの放出、胎盤移行および免疫グロブリン産生の調節を含む、多数の重要な生物学的応答を誘発する。

【0141】

したがって、本明細書に記載される一部の実施形態は、定常領域ドメインの1つまたは複数のうちの少なくとも一部が、およそ同じ免疫原性の、変更されていない抗体全体と比較したとき、低減したエフェクター機能、非共有結合性に二量体形成する能力、BMPRI/BMPRIIの部位で局在化する増加した能力、短くなった血清半減期、または長くなった血清半減期などの、所望される生化学的特徴をもたらすように、欠失されているか、またはそうでなければ変更されている、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を含む。例えば、本明細書に記載される診断および処置方法において使用するための一部の抗体は、免疫グロブリン重鎖に類似するポリペプチド鎖を含むが、1つまたは複数の重鎖ドメインの少なくとも一部を欠くドメイン欠失抗体である。例えば、ある特定の抗体において、修飾された抗体の定常領域の1つの全体ドメインが欠失され、例えば、CH2ドメインの全てまたは一部が欠失されるだろう。他の実施形態では、本明細書に記載される診断および処置方法において使用するためのある特定の抗体は、非グリコシル化または「agly」抗体として本明細書における他のところで言及される、グリコシル化を除去するよう変更されている定常領域、例えば、IgM重鎖定常領域を有する。このような「agly」抗体は、酵素的、ならびに定常領域におけるコンセンサスグリコシル化部位を操作することにより調製されてもよい。理論によって拘束されないが、「agly」抗体は、インビボでの改善された安全性および安定性プロファイルを有し得ると信じられている。所望されるエフェクター機能を有する非グリコシル化抗体を生成する方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、国際公開第2005/018572号パンフレットにおいて見られる。

【0142】

本明細書に記載されるある特定の抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体において、Fc部分は、当該技術分野において公知の技術を使用してエフェクター機能を減少するよう変異されてもよい。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化(点変異または他の手段を通じて)は、循環の修飾された抗体のFc受容体結合を低減し、これにより、BMPRI/BMPRII局在化を増加させ得る。他の場合では、それは、本発明と一致する定常領域修飾が、補体結合を仲介し、これにより、コンジュゲートされた細胞毒の血清半減期および非特異的結合を低減することであってもよい。定常領域のなお他の修飾を使用して、ジスルフィド結合、または増加した抗原特異性または抗体可動性に起因して増強された局在化を可能にするオリゴ糖部分を修飾してもよい。

BMPRI/BMPRII局在化、体内分布および血清半減期などの、得られた生理学的プロファイル、バイオアベイラビリティおよび修飾の他の生化学的作用は、過度の実験なく、周知の免疫学的技術を使用して、容易に測定され、定量され得る。

【0143】

本明細書に記載される一部の抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体において、Fc部分を変異させるか、または代替のタンパク質配列と置換して、例えば、Fc受容体、LRP、もしくはThy1受容体を介した抗体の受容体介在性エンドサイトーシスを増強することによって、または抗体が、生きている細胞へのシャトリングを、それらに害することなく可能にすると言われる、「SuperAntibodyテクノロジー」によって細胞の抗体取り込みを増加させてもよい(Expert Opin. Biol. Ther.(2005), 237-241)。例えば、細胞表面受容体の抗体結合領域とコグネートタンパク質リガンドの融合タンパク質またはBMPRI/BMPRIIならびに細胞表面受容体に結合する特異的な配列を有する二重特異性もしくは多重特異性抗体の生成は、当該技術分野において公知の技術を使用して操作によりなされてもよい。

10

【0144】

本明細書に記載される一部の抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体において、Fc部分は、変異されるか、代替のタンパク質配列と置換されてもよく、または抗体を化学的に修飾して、その血液脳関門通過を増加させてもよい。

【0145】

修飾された形態の本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、当該技術分野において公知の技術を使用して、前駆体または親抗体全体から作製することができる。典型的な技術は、本明細書においてより詳細に考察される。本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、当該技術分野で公知の技術を使用して、作製するか、または製造することができる。一部の実施形態では、抗体分子またはそのフラグメントは、「組み換えで産生される」、すなわち、組み換えDNAテクノロジーを使用して産生される。抗体分子またはそのフラグメントを作製する例示的な技術は、本明細書における他のところでより詳細に考察される。

20

【0146】

本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体はまた、共有結合が、抗体が、そのコグネートエピトープに特異的に結合することを妨げないように、例えば、任意のタイプの分子の抗体への共有結合によって修飾される誘導体を含む。例ではあるが、限定ではなく、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞のリガンドまたは他のタンパク質への結合などによって修飾されている抗体を含む。多数の化学的修飾のいずれかは、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含むが、これらに限定されない、公知の技術によって行われてもよい。加えて、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

30

【0147】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、処置されるべき動物、例えば、ヒトにおける有害な免疫応答を誘発しないだろう。一部の実施形態では、結合分子、例えば、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメントは、患者、例えば、ヒト患者由来であり、それらが由来するのと同じ種、例えば、ヒトにおいて続いて使用され、これにより、有害な免疫応答の出現が軽減されるか、または最小限にされる。

40

【0148】

脱免疫を使用して、抗体の免疫原性を減少することもできる。本明細書で使用される場合、用語「脱免疫」は、T細胞エピトープを修飾するための抗体の変更を含み、例えば、国際公開第98/52976号パンフレットおよび国際公開第00/34317号パンフ

50

レットを参照のこと。例えば、出発抗体由来のVHおよびVL配列が分析され、ヒトT細胞エピトープが、それぞれのV領域から「マッピング」され、これにより、相補性決定領域(CDR)および配列内の他の鍵となる残基との関連でのエピトープの位置が示される。T細胞エピトープマップ由来の個々のT細胞エピトープは、最終的な抗体の活性を変更するリスクが低い、代替りのアミノ酸置換を同定するために分析されている。アミノ酸置換の組み合わせを含む、広範な代替りのVHおよびVL配列が設計され、これらの配列は、本明細書に開示される診断および処置方法において使用するための、広範な結合ポリペプチド、例えば、BMPRI/BMPRII特異的抗体またはその免疫特異的フラグメントに続いて組み込まれ、次いで、機能について試験される。典型的には、12~24のバリエーション抗体が生成され、試験される。次いで、修飾されたVおよびヒトC領域を含む完全な重鎖および軽鎖遺伝子は、発現ベクターにクローニングされ、その後のプラスミドは、抗体全体の産生のため細胞株に導入される。次いで、抗体は、適切な生化学的および生物学的アッセイにおいて比較され、最適なバリエーションが同定される。

10

【0149】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組み換え、およびファージディスプレイテクノロジー、またはその組み合わせの使用を含む、当該技術分野で公知の広範な技術を使用して、調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知のもの、および例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.(1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681(1981)において教示されるものを含む、ハイブリドーマ技術を使用して産生することができる、前記参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマテクノロジーを通じて産生された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、それが産生される方法ではなく、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む、単一クローン由来である抗体を指す。したがって、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマテクノロジーを通じて産生される抗体に限定されない。

20

【0150】

周知のハイブリドーマプロセス(Kohler et al., *Nature* 256(1975), 495)において、哺乳類由来の比較的短命、または瀕死のリンパ球、例えば、本明細書に記載されるマウス対象由来のB細胞は、不死腫瘍細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)と融合され、これにより、共に不死であり、B細胞の遺伝子コードされた抗体を産生する能力がある、ハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」が生成される。得られたハイブリッドは、単一抗体の形成に特異的な遺伝子を含む、それぞれの個々の株を用いた選別、希釈、および再成長によって、単一の遺伝子株に分離される。所望される抗原に対して同種である抗体を産生し、それらの純粋な遺伝子の起源を参照して、「モノクローナル」と呼ばれる。

30

【0151】

これにより調製されたハイブリドーマ細胞が、播種され、融合されていない、親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する、1つまたは複数の物質を含有する適当な培養培地において成長される。当業者は、ハイブリドーマの形成、選別および成長のための試薬、細胞株および培地が、多数の供給源から市販されており、標準化プロトコールが、十分に確立されていることを理解するだろう。一般に、ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地が、所望される抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、本明細書に記載される免疫沈降、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などのインビトロアッセイによって決定される。所望される特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈手法によってサブクローニングされ、標準的な方法によって成長されてもよく、例えば、Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103(1986)を参照のこと。サブクローンから分泌されたモノクローナル

40

50

抗体は、例えば、タンパク質 A、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーなどの従来 of 精製方法によって、培養培地、腹水体液または血清から分離されてもよいことは、さらに理解されるだろう。

【0152】

一部の実施形態では、リンパ球は、顕微操作によって選択し、可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞は、免疫された動物または自然免疫動物、例えば、ヒトから単離し、インビトロで約7日間培養することができる。培養物は、スクリーニング基準に合致する特定の免疫グロブリンについてスクリーニングすることができる。正のウェル由来の細胞を単離することができる。個々の Ig 産生 B 細胞は、FACS によって、または補体介在性溶血ブランクアッセイにおいてそれらを同定することによって、単離することができる。Ig 産生 B 細胞は、顕微操作により試験管にとることができ、VH および VL 遺伝子は、例えば、RT-PCR を使用して増幅することができる。VH および VL 遺伝子は、抗体発現ベクターにクローニングし、発現のため、細胞（例えば、真核生物または原核生物の細胞）に遺伝子導入することができる。

10

【0153】

あるいは、抗体産生細胞株は、当業者に周知の技術を使用して、選別され、培養されてもよい。このような技術は、様々な実験室マニュアルおよび初歩的な刊行物に記載されている。この点で、以下に記載される方法および組成物における使用に適切な技術は、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) において記載されており、補足を含み、それは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0154】

特異的なエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成され得る。例えば、Fab および F(ab')₂ フラグメントは、組み換えで、またはパイン (Fab フラグメントを生成するため) もしくはペプシン (F(ab')₂ フラグメントを生成するため) などの酵素を使用した、免疫グロブリン分子のタンパク質切断によって生成されてもよい。F(ab')₂ フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖の CH1 ドメインを含有する。このようなフラグメントは、例えば、免疫グロブリンの免疫特異的部分を放射性同位元素などの検出試薬に結合させることを含む、免疫診断手法において使用するのに十分である。

30

【0155】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、抗体分子の少なくとも1つの重鎖または軽鎖 CDR を含む。別の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数の抗体分子由来の少なくとも2つの CDR を含む。別の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数の抗体分子由来の少なくとも3つの CDR を含む。別の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数の抗体分子由来の少なくとも4つの CDR を含む。別の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数の抗体分子由来の少なくとも5つの CDR を含む。別の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、1つまたは複数の抗体分子由来の少なくとも6つの CDR を含む。対象抗体において含まれ得る少なくとも1つの CDR を含む例示的な抗体分子は、本明細書に記載される。

40

【0156】

本明細書に記載される抗体は、抗体の合成について当該技術分野において公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または本明細書に記載される組み換え発現技術によって生成することができる。

【0157】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、合成定常領域を含み、1つまたは複数のドメインは、部分的または全体的に欠失される（「ドメイン欠失抗体」）。一部の実施形態では、適合可

50

能な修飾された抗体は、C H 2ドメイン全体が除去されている、ドメイン欠失コンストラクトまたはバリエーションを含むだろう。他の実施形態について、短い結合しているペプチドを、欠失ドメインで置き換えて、可変領域についての可動性および移動の自由をもたらしてもよい。当業者は、このようなコンストラクトが、抗体の代謝速度に対するC H 2ドメインの制御特性に起因して、特に好ましいことを理解するだろう。ドメイン欠失コンストラクトは、I g G 1ヒト定常ドメインをコードするベクターを使用してもたらすことができ、例えば、国際公開第02/060955号パンフレットおよび国際公開第02/096948号パンフレットを参照のこと。このベクターを操作して、C H 2ドメインを欠失し、ドメイン欠失I g G 1定常領域を発現する合成ベクターをもたらす。

【0158】

10

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、ミニボディである。ミニボディは、当該技術分野において記載される方法を使用して作製することができ、例えば、米国特許第5,837,821号明細書または国際公開第94/09817号パンフレットを参照のこと。

【0159】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、単量体サブユニット間の結合を可能にし、B M P R I / B M P R I Iへの結合を保持する限り、数個のアミノ酸、またはさらに単一のアミノ酸の欠失または置換を有する免疫グロブリン重鎖を含む。例えば、C H 2ドメインの選択された範囲における単一アミノ酸の変異は、F c結合を実質的に低減し、これにより、B M P R I / B M P R I I局在化を増加させるのに十分であり得る。同様に、調節されるべきエフェクター機能（例えば、補体結合）を調節する、1つまたは複数の定常領域ドメインのその部分を単に欠失することが望ましいかもしれない。定常領域のこのような部分的欠失は、インタクトな対象の定常領域ドメインと関連する他の所望の機能を残しながら、抗体の選択された特徴（血清半減期）を改善し得る。さらに、上で言及された通り、開示される抗体の定常領域は、得られたコンストラクトのプロファイルを増強する、1つまたは複数のアミノ酸の変異または置換を通じて合成性であってもよい。この点で、立体配置および修飾された抗体の免疫原性プロファイルを実質的に維持しながら、保存された結合部位（例えば、F c結合）によってもたらされる活性を破壊することが可能であり得る。なお他の実施形態は、エフェクター機能のような所望の特徴を増強するための、定常領域の1つまたは複数のアミノ酸の付加を含むか、またはさらなる細胞毒もしくは炭水化物付着をもたらす。このような実施形態では、選択された定常領域ドメイン由来の特定の配列を挿入するか、または複製することが望まれることもある。

20

30

【0160】

本発明はまた、本明細書に記載される抗体分子（例えば、V H領域および/またはV L領域）のバリエーション（誘導体を含む）を含む、本質的にからなる、またはからなる抗体を提供し、抗体またはそのフラグメントは、B M P R I / B M P R I Iに免疫特異的に結合する。当業者に公知の標準的な技術を使用して、アミノ酸置換をもたらす部位特異的変異誘発およびP C R介在性変異誘発を含むが、これらに限定されない、抗体をコードするヌクレオチド配列において変異を導入することができる。一部の実施形態では、バリエーション（誘導体を含む）は、参照V H領域、V H - C D R 1、V H - C D R 2、V H - C D R 3、V L領域、V L - C D R 1、V L - C D R 2、またはV L - C D R 3と比べて、50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換をコードする。あるいは、変異は、飽和変異誘発などによる、コード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入することができ、得られた変異体を生物学的活性についてスクリーニングして、活性（例えば、B M P R I / B M P R I Iに結合する能力）を保持する変異体を同定することができる。

40

【0161】

50

例えば、フレームワーク領域においてのみ、または抗体分子のCDR領域においてのみ変異を誘導することが可能である。導入された変異は、サイレントまたは中性ミスセンス変異であってもよく、例えば、抗体の抗原に結合する能力に対する作用を有さないか、またはほぼ有さなくてもよく、実際、一部のこのような変異は、アミノ酸配列を一切変化させない。これらのタイプの変異は、コドン使用を最適化するか、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するのに有用であり得る。本明細書に記載される抗体をコードするコドン最適化されたコード領域は、本明細書における他のところで開示される。あるいは、非中性ミスセンス変異は、抗原に結合する抗体の能力を変更し得る。大部分のサイレントおよび中性ミスセンス変異の位置は、おそらく、フレームワーク領域にあり、一方、大部分の非中性ミスセンス変異の位置は、おそらく、CDRにあるが、これは、絶対条件ではない。当業者は、抗原結合活性が変更されていないこと、または結合活性（例えば、抗原結合活性の改善もしくは抗体特異性の変更）が変更されていることなどの、所望される特性を有する変異分子を設計し、試験することができるだろう。変異誘発後、コードされるタンパク質は、日常的に発現されてもよく、コードされるタンパク質の機能的および/または生物学的活性（例えば、BMPRI/BMPRIIの少なくとも1つのエピトープに免疫特異的に結合する能力）は、本明細書に記載される技術を使用して、または当該技術分野で公知の技術を日常的に修飾することによって決定することができる。

10

【0162】

BMPRI/BMPRII結合剤、例えば、非限定的に、本明細書に記載されるBMPRI/BMPRII結合抗体は、任意のインビボまたはインビトロモデルを使用して特徴付けられてもよい。当業者は、本明細書に記載されるBMPRI/BMPRII結合剤（例えば、抗体）が、本明細書に記載されるマウスモデルにおいて特徴付けられ得ることを容易に理解する。

20

【0163】

III. 抗体をコードするポリヌクレオチド

本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドもまた、本明細書において提供される。抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、無修飾のRNAもしくはDNAまたは修飾されたRNAもしくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドで構成されることができる。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、1本鎖および2本鎖DNA、1本鎖および2本鎖領域の混合物であるDNA、1本鎖および2本鎖RNA、ならびに1本鎖および2本鎖領域の混合物であるRNA、1本鎖もしくはより典型的には、2本鎖であり得るか、または1本鎖および2本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッドした分子からなり得る。加えて、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む3本鎖領域からなり得る。抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドはまた、1つまたは複数の修飾された塩基または安定性もしくは他の理由のため修飾されたDNAもしくはRNA骨格を含有して

30

40

【0164】

免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）由来のポリペプチドの非天然のバリエーションをコードする単離されたポリヌクレオチドは、1つまたは複数のアミノ酸置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入されるように、1つまたは複数のヌクレオチド置換、付加または欠失を、免疫グロブリンのヌクレオチド配列に導入することによって生成することができる。変異は、部位特異的変異誘発およびPCR介在性変異誘発などの、標準的な技術によって導入されてもよい。一部の実施形態では、

50

保存的アミノ酸置換は、1つまたは複数の非必須のアミノ酸残基で行われる。

【0165】

周知の通り、RNAは、グアニジウムイソシアネート抽出および沈殿、続いて遠心分離またはクロマトグラフィーなどの、標準的な技術によって、本来のB細胞、ハイブリドーマ細胞から、または他の形質転換された細胞から単離され得る。所望の場合、mRNAは、オリゴdTセルロース上のクロマトグラフィーなどの標準的な技術によって、トータルRNAから単離されてもよい。適当な技術は、当該技術分野で知られている。一部の実施形態では、抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、周知の方法に従い、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを使用して、同時または別々のいずれかで作製され得る。PCRは、コンセンサス定常領域プライマーによって、または公開された重鎖および軽鎖DNAならびにアミノ酸配列に基づき、より特異的なプライマーによって開始されてもよい。上で考察された通り、PCRをまた使用して、抗体軽鎖および重鎖をコードするDNAクローンを単離してもよい。この場合では、ライブラリーは、コンセンサスプライマーまたはヒト定常領域プローブなどの、より大きな相同プローブによってスクリーニングされてもよい。

10

【0166】

DNA、典型的には、プラスミドDNAは、当該技術分野において公知の技術を使用して細胞から単離され、例えば、組み換えDNA技術に関する前述の参考文献において、詳細に記載される標準的な周知の技術に従って、制限酵素マッピングされ、配列決定されてもよい。もちろん、DNAは、単離プロセスまたは続く分析中のいずれかのポイントでの本発明に従った合成であってもよい。

20

【0167】

一部の実施形態では、重鎖可変領域のCDRの少なくとも1つまたは重鎖可変領域のVH-CDRの少なくとも2つが、本明細書に開示される抗体由来の参照重鎖VH-CDR1、VH-CDR2、またはVH-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)をコードする核酸を含む、本質的にからなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。あるいは、VHのVH-CDR1、VH-CDR2、またはVH-CDR3領域は、本明細書に開示される抗体由来の参照重鎖VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。したがって、本実施形態によると、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域は、実施例に示されるポリペプチド配列に関連するVH-CDR1、VH-CDR2、またはVH-CDR3ポリペプチド配列を有する。

30

【0168】

一部の実施形態では、VH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3領域が、いずれか1つのVH-CDRにおける1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸置換を除き、実施例に示されるVH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3群と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)をコードする核酸を含む、本質的にからなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的である。

40

【0169】

別の実施形態では、軽鎖可変領域のVL-CDRの少なくとも1つまたは軽鎖可変領域のVL-CDRの少なくとも2つが、本明細書に開示される抗体由来の参照軽鎖VL-CDR1、VL-CDR2、またはVL-CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)をコードする核酸を含む、本質的にからなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。あるいは、VLのVL-CDR1、VL-CDR2、またはVL-CDR3領域は、本明細書に開示される抗体由来の

50

参照軽鎖 V L - C D R 1、V L - C D R 2、および V L - C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である。したがって、本実施形態によると、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域は、実施例に示されるポリペプチド配列と関連する V L - C D R 1、V L - C D R 2、または V L - C D R 3 ポリペプチド配列を有する。

【0170】

別の実施形態では、V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 領域が、いずれか 1 つの V L - C D R における 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 10 のアミノ酸置換を除き、実施例に示される V L - C D R 1、V L - C D R 2 および V L - C D R 3 群と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) をコードする核酸を含む、本質的にかつらなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的である。

10

【0171】

別の実施形態では、V H - C D R 1、V H - C D R 2、および V H - C D R 3 領域が、実施例に示される V H - C D R 1、V H - C D R 2、および V H - C D R 3 群と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (V H) をコードする核酸を含む、本質的にかつらなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。

【0172】

別の実施形態では、V L - C D R 1、V L - C D R 2、および V L - C D R 3 領域が、実施例に示される V L - C D R 1、V L - C D R 2、および V L - C D R 3 群と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) をコードする核酸を含む、本質的にかつらなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。

20

【0173】

当該技術分野で知られている通り、2 つのポリペプチドまたは 2 つのポリヌクレオチド間の「配列同一性」は、あるポリペプチドまたはポリヌクレオチドのアミノ酸または核酸配列を、第二のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列と比較することによって決定される。本明細書において考察されるとき、任意の特定のポリペプチドが、別のポリペプチドと少なくとも約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% または 95% 同一であるかどうかは、非限定的に、BESTFIT プログラム (Wisconsin 配列分析パッケージ、Unix 用のバージョン 8、Genetics Computer Group、University Research Park、575 Science Drive、Madison、WI 53711) などの、当該技術分野において公知の方法およびコンピュータプログラム / ソフトウェアを使用して決定することができる。BESTFIT は、2 つの配列の間の同一性の最善なセグメントを見出すための、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2(1981), 482-489 の局所相同アルゴリズムを使用する。BESTFIT または特定の配列が、例えば、本明細書に記載される参照配列 (例えば、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント) と 95% 同一であるかどうかを決定するための任意の他の配列アライメントプログラムを使用するとき、パラメーターは、もちろん、同一性のパーセンテージが、参照ポリペプチド配列の全長にわたり計算され、参照配列におけるアミノ酸の総数の最大 5% の同一性ギャップが許容されるように、設定される。

30

40

【0174】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書において示される抗 B M P R I / B M P R I I 抗体の V H または V L 領域のポリヌクレオチド配列を有する核酸を含む、本質的にかつらなる、またはからなる。この点で、当業者は、少なくとも軽鎖および / または重鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドが、両方の免疫グロブリン鎖および一

50

方のみの可変ドメインをコードし得ることは、容易に理解するだろう。本明細書、例えば、実施例、図7、または表1に示される抗体またはその抗原結合フラグメントのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはからなるポリヌクレオチドが、さらに本明細書において提供される。

【0175】

一部の実施形態では、参照重鎖VHと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%または95%同一の免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする核酸を含む、本質的にからなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。一部の実施形態では、参照重鎖可変領域のアミノ酸配列は、本明細書に示される通りである。

10

【0176】

一部の実施形態では、参照軽鎖VLと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%または95%同一の免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする核酸を含む、本質的にからなる、またはからなる単離されたポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。一部の実施形態では、参照軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、本明細書に示される通りである。

【0177】

本明細書に記載される、他のところで記載される、ポリヌクレオチドのフラグメントがまた、本明細書において提供される。加えて、本明細書に記載される融合ポリヌクレオチド、Fabフラグメント、および他の誘導体をコードするポリヌクレオチドがまた考慮される。

20

【0178】

ポリヌクレオチドは、当該技術分野において公知の任意の方法によって生成されるか、または製造されてもよい。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、抗体をコードするポリヌクレオチドは、例えば、簡単に言うと、抗体をコードする配列の重複するオリゴヌクレオチド含有部分の合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーション、ならびに次いでPCRによりライゲーションされたオリゴヌクレオチドの増幅を含む、Kutmeier et al., *BioTechniques* 17(1994), 242に記載される、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブリーされてもよい。

【0179】

あるいは、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、適当な供給源由来の核酸から生成されてもよい。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンが、入手可能でないが、抗体分子の配列が公知である場合、抗体をコードする核酸は、化学的に合成されるか、または適当な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリー、またはそれから生成したcDNAライブラリー、または抗体を発現する選択されたハイブリドーマ細胞などの、BMPRI/BMPRII特異的抗体を発現する任意の組織もしくは細胞から単離された核酸、好ましくは、ポリA+RNA）から、配列の3'および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用したPCR増幅によって、または例えば、cDNAクローンを、抗体をコードするcDNAライブラリーから同定するための特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用したクローニングによって得られてもよい。次いで、PCRによって生成された、増幅された核酸は、当該技術分野で周知の任意の方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクローニングされてもよい。

30

40

【0180】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、そのヌクレオチド配列は、異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成するための、例えば、アミノ酸置換、欠失、および/または挿入を生成するための、ヌクレオチド配列の操作、例えば、組み換えDNA技術、部位特異的変異誘発、PCRなど（例えば、共に、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., C

50

old Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1990)および Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1998)に記載される技術を参照のこと) についての当該技術分野において周知の方法を使用して操作されてもよい。

【0181】

IV. 融合タンパク質およびコンジュゲート

一部の実施形態では、抗体ポリペプチドは、抗体と通常結合しないアミノ酸配列または1つまたは複数の部分を含む。例示的な修飾は、以下でより詳細に記載される。例えば、本明細書に記載される単鎖 f v 抗体フラグメントは、可動性リンカー配列を含んでもよいが、または、機能的部分(例えば、PEG、薬物、毒素、または蛍光、放射性、酵素、核磁気、重金属などの標識など)を付加するように修飾されてもよい。

10

【0182】

本明細書に記載される抗体ポリペプチドは、融合タンパク質を含むか、本質的にからなるか、またはからなってもよい。融合タンパク質は、例えば、免疫グロブリン B M P R I / B M P R I I - 結合ドメインを、少なくとも1つの標的結合部位、および少なくとも1つの異種部分、すなわち、天然では天然に結合しない部分と共に含む、キメラ分子である。アミノ酸配列は、通常、融合ポリペプチドにおいて一緒にもたらされる別個のタンパク質に存在し得るか、または通常、同じタンパク質に存在し得るが、融合ポリペプチドにおいて新たな配置で置かれる。融合タンパク質は、例えば、化学合成によって、またはペプチド領域が、所望される関係でコードされる、ポリヌクレオチドを生成し、翻訳することによって、生成されてもよい。

20

【0183】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに適用される、用語「異種」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それらが比較される、実体の残りのものと別個の実体に由来することを意味する。例えば、本明細書で使用される場合、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくはアナログに融合されるべき「異種ポリペプチド」は、同じ種の非免疫グロブリンポリペプチドまたは異なる種の免疫グロブリンもしくは非免疫グロブリンポリペプチド由来である。

【0184】

本明細書における他のところでより詳細に考察される通り、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、さらに、NもしくはC末端で異種ポリペプチドに組み換式的に融合されるか、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的にコンジュゲート(共有結合性および非共有結合性コンジュゲーションを含む)されてもよい。例えば、抗体は、検出アッセイにおける標識および異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、または毒素などのエフェクター分子として有用な分子に組み換式的に融合されるか、またはコンジュゲートされてもよく、例えば、国際公開第92/08495号パンフレット; 国際公開第91/14438号パンフレット; 国際公開第89/12624号パンフレット; 米国特許第5,314,995号明細書; および欧州特許出願第0396387号明細書を参照のこと。

30

【0185】

一部の例では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、薬物にコンジュゲートされる。かかる薬物コンジュゲートを生成する方法は、当該技術分野において公知であり、本明細書に記載される(例えば、以下の実施例を参照のこと)。一部の例では、薬物は、免疫抑制性薬物である(例えば、免疫抑制性薬物の例については、以下のセクション「免疫抑制性または免疫制御薬物」を参照のこと)。一部の例では、薬物は、タキソールである。一部の例では、薬物は、抗体またはその抗原結合フラグメントに直接コンジュゲートされる。一部の例では、薬物は、リンカーを介して抗体またはその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる。薬物を、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメントにコンジュゲートするために使用され得るリンカーの例は、サクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)またはマレイミ

40

50

、またはそのフラグメント、誘導体、もしくはバリエーションのVH-CDR3のアミノ酸配列、および融合タンパク質が、BMPRI/BMPRIIに特異的に結合する異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。別の実施形態では、融合タンパク質は、本明細書に記載される抗体の少なくとも1つのVH領域のアミノ酸配列および本明細書に記載される抗体またはそのフラグメント、誘導体もしくはバリエーションの少なくとも1つのVL領域のアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質のVHおよびVL領域は、BMPRI/BMPRIIに特異的に結合する単一の抗体（またはscFvもしくはFabフラグメント）に対応する。なお別の実施形態では、本明細書に開示される診断および処置方法において使用するための融合タンパク質は、抗体のVH CDRのいずれか1つ、2つ、3つ以上のアミノ酸配列、および抗体、またはそのフラグメントもしくはバリエーションのVL CDRのいずれか1つ、2つ、3つ以上のアミノ酸配列、ならびに異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、VH-CDRまたはVL-CDRの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上は、本明細書に記載される単一の抗体（またはscFvもしくはFabフラグメント）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子もまた、本明細書において提供される。

10

【0188】

文献において報告される例示的な融合タンパク質は、T細胞受容体 (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al., Nature 337(1989), 525-531; Traunecker et al., Nature 339(1989), 68-70; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9(1990), 347-353; およびByrn et al., Nature 344(1990), 667-670); L-セレクチン (ホーミング受容体) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110(1990), 2221-2229; およびWatson et al., Nature 349(1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., Cell 61(1990), 1303-1313); CD28およびB7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173(1991), 721-730); CTLA-4 (Linsley et al., J. Exp. Med. 174(1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66(1991), 1133-1144); TNF受容体 (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(1991), 10535-10539; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27(1991), 2883-2886; およびPeppel et al., J. Exp. Med. 174(1991), 1483-1489(1991); ならびにIgE受容体 a (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115(1991), Abstract No. 1448) の融合物を含む。

20

30

【0189】

本明細書における他のところで考察される通り、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を、異種ポリペプチドに融合して、ポリペプチドのインビボでの半減期を延長するか、または当該技術分野で公知の方法を使用したイムノアッセイにおいて使用してもよい。例えば、一部の実施形態では、PEGを、本明細書に記載される抗体にコンジュゲートして、インビボでのそれらの半減期を延長することができる、例えば、Leong et al., Cytokine 16(2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54(2002), 531; またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30(2002), 512を参照のこと。

40

【0190】

さらに、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を、ペプチドなどの、マーカー配列に融合して、それらの増殖または検出を促進することができる。特定の実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、市販されている多くの中でも、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311) において提供されるタグなどの、ヘキサ-ヒスチジンペプチド (HIS) である。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989), 821-824に記載される通り、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の好都合な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグは、イ

50

ンフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「H A」タグ (Wils on et al., Cell 37(1984), 767) および「フラッグ」タグを含むが、これらに限定されない。

【0191】

融合タンパク質は、当該技術分野で周知である方法を使用して調製することができる、例えば、米国特許第5,116,964号明細書および第5,225,538号明細書を参照のこと。融合が作製される正確な部位を経験的に選択して、融合タンパク質の分泌または結合特徴を最適化してもよい。次いで、融合タンパク質をコードするDNAは、発現のため宿主細胞に遺伝子導入される。

【0192】

本明細書に記載される抗体は、コンジュゲートされていない形態で使用されてもよいか、または例えば、分子の治療特性を改善するために、標的検出を促進するために、または患者の画像化もしくは治療のために、様々な分子の少なくとも1つにコンジュゲートされてもよい。本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、精製が行われるとき、精製前または後のいずれかに、標識されるか、またはコンジュゲートされ得る。特に、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的応答修飾因子、医薬製剤、またはPEGにコンジュゲートされてもよい。

【0193】

従来 of 抗体を含む免疫毒素であるコンジュゲートは、当該技術分野において広く記載されている。毒素は、従来 of カップリング技術によって抗体に結合されてもよいか、またはタンパク質毒素部分を含有する免疫毒素は、融合タンパク質として生成され得る。本明細書に記載される抗体に対応する方法で使用して、このような免疫毒素を得ることができる。このような免疫毒素の説明は、Byers, Seminars Cell. Biol. 2(1991), 59-70およびFanger, Immunol. Today 12(1991), 51-54によって記載されるものである。

【0194】

当業者は、コンジュゲートがまた、コンジュゲートされるべき選択された剤に依存して、様々な技術を使用してアセンブリされてもよいことを理解するだろう。例えば、ピオチンとのコンジュゲートは、例えば、BMPRI/BMPRII結合ポリペプチドを、ピオチンN-ヒドロキシサクシニミドエステルなどのピオチンの活性化エステルと反応させることによって調製される。同様に、蛍光マーカ-とのコンジュゲートは、カップリング剤、例えば、本明細書において挙げられるものの存在下で、またはイソチオシアネート、もしくはフルオレセイン-イソチオシアネートとの反応によって調製されてもよい。本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーションもしくは誘導体のコンジュゲートは、同様の様式で調製される。

【0195】

診断または治療用薬剤にコンジュゲートされた、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体もまた、本明細書において提供される。抗体を診断で使用して、例えば、BMPRI/BMPRII関連疾患の存在を示す、BMPRI/BMPRII関連疾患になるリスクを示す、BMPRI/BMPRII関連疾患の発症もしくは進行をモニターすることができ、すなわち、臨床検査手法の一部として使用して、例えば、所定の処置および/または予防レジメンの有効性を決定することができる。検出は、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を、検出可能な物質にカップリングすることによって促進することができる。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、様々なポジトロン断層撮影を使用した陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンを含み、例えば、診断として使用するため、抗体にコンジュゲートされ得る金属イオンについて、米国特許第4,741,900号明細書を参照のこと。適当な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、

10

20

30

40

50

またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、適当な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、適当な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ、発光材料の例としては、ルミノールが挙げられ、生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、適当な放射性材料の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc が挙げられる。

【0196】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体はまた、化学発光化合物とカップリングさせることによって、検出可能に標識することができる。次いで、化学発光でタグ付けされた抗体の存在は、化学反応の経過中に生じる発光の存在を検出することによって決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマトミックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュー酸エステルである。

10

【0197】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を検出可能に標識することができる方法の1つは、それを酵素に結合させること、および結合した生成物を酵素免疫測定法 (EIA) において使用することによるものである (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2(1978), 1-7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31(1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73(1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo(1981)。抗体に結合している酵素は、例えば、分光光度法、蛍光定量的または視覚的手段によって検出することができる、化学的な部分を生成するような様式で、適切な基質、好ましくは、発色性基質と反応するだろう。抗体を検出可能に標識するために使用することができる酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイド異性化酵素、酵母アルコール脱水素酵素、アルファ-グリセロリン酸、脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコース酸化酵素、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらに限定されない。加えて、検出は、酵素の発色性基質を利用する、比色分析方法によって達成することができる。検出はまた、同様に調製した標準物質との比較における基質の酵素反応の程度の視覚的比較によって達成されてもよい。

20

30

【0198】

検出はまた、様々な他のイムノアッセイのいずれかを使用して達成してもよい。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を放射性標識することによって、ラジオイムノアッセイ (RIA) の使用を通じて抗体を検出することが可能である (例えば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)) を参照のこと、それは、参照により本明細書に組み込まれる)。放射性同位元素は、ガンマカウンター、シンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィを含むが、これらに限定されない手段によって検出することができる。

40

【0199】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体はまた、 ^{152}Eu 、またはランタニドシリーズの他のものなどの、蛍光放出金属を使用して検出可能に標識することができる。これらの金属を、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの金属キレート基を使用して抗体に結合することができる。

50

【 0 2 0 0 】

様々な部分を抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体にコンジュゲートさせる技術は周知であり、例えば、Arnon et al., " Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy ", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al.(eds.), pp. 243-56(Alan R. Liss, Inc.(1985); Hellstrom et al., " Antibodies For Drug Delivery ", in Controlled Drug Delivery(2nd Ed.), Robinson et al.(eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53(1987); Thorpe, " Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review ", in Monoclonal Antibodies ' 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al.(eds.), pp. 475-506(1985); " A 10
analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy ", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al.(eds.), Academic Press pp. 303-16(1985)、およびThorpe et al., " The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates ", Immunol. Rev. 62(1982), 119-158を参照のこと。

【 0 2 0 1 】

上述の通り、一部の実施形態では、結合分子、例えば、結合ポリペプチド、例えば、抗体またはその免疫特異的フラグメントの安全性または有効性を増強する部分をコンジュゲートすることができる。例えば、一部の実施形態では、PEGを本明細書に記載される結合分子にコンジュゲートして、インビボでのそれらの半減期を延長することができる。L 20
eong et al., Cytokine 16(2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54(2002), 531; またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30(2002), 512。

【 0 2 0 2 】

二重特異性および多重特異性抗体

本明細書に記載される二重特異性および多重特異性抗体試薬は、この経路のI型とII型受容体の複合体をアセンブリーするための代替リガンドとして働くことができる。これらの試薬は、I型とII型受容体のアセンブリーを開始して、下流のSMADタンパク質をリン酸化し、内在性リガンドのものと類似の様式でシグナル伝達を調節する。大部分が、多数の別個のI型およびII型リガンドと対形成し得る、内在性リガンドと対照的に、 30
受容体の重複する特異性に起因して、この適用の二重特異性および多重特異性試薬は、I型およびII型受容体の特定の対を標的とする。受容体の特定の対をターゲティングすることによって、これらの試薬は、内在性リガンドによって通常もたらされる他の受容体対形成をもたらしなく、それらの受容体対の下流の特定の機能を誘発することができる。受容体のこの選択的ターゲティングは、そうでなければ、所定の内在性リガンドによって活性化され得る、他の受容体対の活性化を回避しながら、特定の対の受容体の活性化によって生じる活性を動員することができる。受容体のこの選択的ターゲティングは、治療目的に望ましくない作用を排除しながら、所定のTGF-ベータスーパーファミリーリガンドの望ましい活性を高めることができる。

【 0 2 0 3 】

本明細書に記載される表面BMP/TGF-ベータ受容体の様々な組み合わせについての特異性を有する二重特異性抗体は、文脈の広い範囲で、例えば、治療的に使用することができる。TGF-ベータスーパーファミリーのI型およびII型受容体を認識する多重特異性または二重特異性抗体は、内在性BMP、アクチビン、GDF、およびTGF-ベータリガンドに類似の、SMADエフェクターの特定のBMPまたはTGF-ベータ経路特異的活性化、遺伝子転写、ならびに細胞生物学および運命を誘発することができる。 40

【 0 2 0 4 】

二重特異性抗体のシグナル伝達は、天然のリガンドの乱雑状態を有さず、これにより、全身投与に関わらず、特定の標的組織において特定の細胞作用を誘発する方法がもたらされる。しばしば、天然のリガンドとの場合である、複数のII型および複数のI型受容体 50

への結合の代わりに、二重特異性は、単一の I I 型および I 型対を標的にする。これは、シグナル伝達の生物学的作用および標的にされる組織を制限するだろう。数分から数時間測定する、循環中での半減期を有する、天然のリガンドと異なり、二重特異性シグナル伝達分子は、所望される生物学的作用に依存して調整することができる薬物動態を有する。二重特異性 I g G F c 分子は、一般に、治療 I g G 分子または他の I g G F c 融合分子の場合である、数週間の半減期を有すると予想される。しかし、F c、すなわち、F (a b ') 2 フラグメント、または二重特異性単鎖 F v (s c F v) 分子を含まない、二重特異性分子として発現される場合、数分または数時間のオーダーでより短い半減期を有するように設計することもできる。二重特異性 I g G F c は、天然の I g G F c ドメイン、または変異体 I g G F c ドメインの使用に依存して、A D C C または補体固定機能に基づく特定の作用に向けられ得る。

10

【 0 2 0 5 】

細胞外基質グリコサミノグリカンへの結合、およびこれによる、循環または標的細胞からの隔離を引き起こすヘパラン硫酸結合ドメインを有する天然のリガンドと異なり、操作された二重特異性シグナル伝達分子は、より好ましい分布および薬力学のため多様な組織を標的にするように全身投与することができる。

【 0 2 0 6 】

変異タンパク質としても知られる、B M P / T G F - ベータシグナル伝達経路の変異したタンパク質リガンドは、より選択的な受容体ターゲティング、組織ターゲティング、または薬物動態および薬力学を有するように設計することができる。選択的様式でそれらの機能の一部を働かせるために、B M P / T G F - ベータシグナル伝達経路の変異タンパク質を生成することができるが、これらの変異タンパク質は、おそらく、免疫原性であるだろうし、抗薬物抗体応答は、それらの治療試薬の作用を中和し、繰り返し使用または曝露を用いたそれらの作用を減らすか、または無効にするだけでなく、また、内在性リガンドに対する病原体の自己免疫応答を引き起こし、その必須の機能を阻害し、内在性生理的機能の永久的な機能障害を引き起こし得る。

20

【 0 2 0 7 】

操作された多重特異性および二重特異性抗体試薬は、抗薬物抗体応答を生じ得るが、他の治療抗体と同様に、これらの応答、およびそれらの対応する作用は、内在性抗体イデオタイプおよびペプチド配列に一致させるための配列最適化によって、ならびにタンパク質発現およびタンパク質フォールディング、組織化ならびに送達システムを最適化することによって最小にすることができる。本発明者らは、他の治療抗体と同様、抗薬物抗体応答の発生は、存在する場合、多くの原因で、治療有効性を破壊しないと予想する。

30

【 0 2 0 8 】

この経路の多くの内在性リガンドには、ヘパラン硫酸結合ドメインを介して細胞外基質タンパク質が、または活性を制御するそれらの組織における生化学的な変化による活性化までの間、活性の潜在的な部位でこれらのタンパク質を隔離させるよう働く他の細胞外基質タンパク質が、天然で結合する。これらの相互作用はまた、投与された内在性リガンドが、標的細胞上で作用する能力を制限し得る。したがって、これらのタンパク質は、全身投与に適当ではないかもしれない。この経路を標的にする二重特異性または多重特異性抗体試薬は、全身投与することができ、治療作用のため多様な組織コンパートメントに分散することができる。操作された二重特異性シグナル伝達分子が、より好ましい分布および薬力学のため多様な組織を標的にするために全身投与されてもよい。この経路を標的にする二重特異性または多重特異性抗体試薬は、代わりに、特定の組織コンパートメントにそれらの作用を集中させるように、ホーミングドメインを用いたターゲティングを生じ得る。

40

【 0 2 0 9 】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子またはその免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原結合部分を指す。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、抗原に結合する能力を保持する、F (a b) および F (a b ') 2 フ

50

ラグメントが挙げられる。このようなフラグメントは、市販か、または当該技術分野で公知の方法を使用して得ることができる。例えば、F (a b) 2フラグメントは、1つのF (a b) 2フラグメントおよびF c部分の多数の小さいペプチドを通常生じる非特異的なエンドペプチダーゼである、ペプシンなどの酵素を用いて抗体を処理することによって、生成することができる。得られたF (a b) 2フラグメントは、2つのジスルフィド結合したF a b単位からなる。F cフラグメントは、広範に分解され、透析、ゲル濾過またはイオン交換クロマトグラフィーによってF (a b) 2から分離することができる。F (a b) フラグメントは、I g G分子を、還元剤の存在下で、類似のサイズの3つのフラグメント：2つのF a bフラグメントおよび1つのF cフラグメントに分解する非特異的なチオール - エンドペプチダーゼであるパピインを使用して生成することができる。F cフラグメントが目的のものであるとき、パピインは、50,000ダルトンのF cフラグメントを生じて、F (a b) フラグメントを単離するため、選択する酵素であり、F cフラグメントは、例えば、タンパク質A / Gを使用した親和性精製によって除去することができる。F (a b) フラグメントを生成する、多数のキットが市販されている。加えて、抗原結合フラグメントを生成する、市販のサービス、例えば、Bio Express、West Lebanon、NHを使用することができる。抗体は、少なくとも二重特異性（すなわち、同じまたは異なる抗原のいずれかの上の2つの異なるエピトープを認識する；例えば、Brinkmann and Kontermann, MAbs. 2017 Feb-Mar;9(2): 182-212を参照のこと）または多重特異性（すなわち、2つより多くのエピトープの認識を示す；例えば、Egan et al., MAbs. 2017 Jan;9(1): 68-84を参照のこと）である。

10

20

【0210】

抗体は、脱免疫するか、またはヒト化、完全ヒト、非ヒト、例えば、マウス、もしくは単鎖抗体であることができる。一部の実施形態では、抗体は、エフェクター機能を有し、補体を固定することができる。一部の実施形態では、抗体は、F c受容体に結合する低減した能力を有するか、または有さない。例えば、抗体は、F c受容体への結合を支持しない、アイソタイプもしくはサブタイプ、フラグメントまたは他の変異体であり得、例えば、変異誘発または欠損したF c受容体結合領域を有する。

【0211】

好ましい実施形態では、抗体は、単鎖抗体である。単鎖抗体 (s c F V) は、操作することができる（例えば、Colcher et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 880:263-80(1999);およびReiter, Clin. Cancer Res. 2:245-52(1996);Ahmad et al., Clin Dev Immunol. 2012;2012:980250 ; Brinkmann and Kontermann, MAbs. 2017 Feb-Mar;9(2): 182-212を参照のこと）。単鎖抗体を二量体形成または多量体形成させて、同じ標的タンパク質の異なるエピトープに対する特異性を有する多価の抗体を生成することができる。

30

【0212】

一部の実施形態では、本明細書に記載される二重特異性および多重特異性試薬は、それぞれが、異なるタンパク質標的に結合する、2つの以上異なるs c F Vを含み、それぞれのs c F vが、イントラボディ可動性ペプチドリンカーによって互いに結合された重 (V H) 鎖および軽 (V L) 鎖の可変領域を含む。このイントラボディリンカーは、V HおよびV L鎖が正しくフォールディングおよび相互作用するのに十分な長さであり、親水性ドメインを含むべきである。一部の実施形態では、イントラボディリンカーは、任意選択で、溶解性を増強するよう分散させた荷電したG l uおよびL y sを伴う、G l yおよびS e r残基の伸長を含む。例えば、Ahmad et al., Clin Dev Immunol. 2012;2012:980250を参照のこと。

40

【0213】

次いで、s c F Vは、例えば、5 ~ 50、15 ~ 40、または20 ~ 30のアミノ酸（例えば、少なくとも5、10、15、もしくは20アミノ酸、最大25、35、40もしくは50のアミノ酸、およびエンドポイントとして前述の数を含む全ての範囲）の可動性インターボディリンカーと互いに結合される。インターボディリンカーは、操作されたり

50

【表 3】

表 A-I 型および II 型 BMPR

受容体	型	NCBI GenBank RefSeq 受託番号
アクチビン A 受容体様 1 型、 ALK1、ACVRL1	I	NP_000011.2
アクチビン A 受容体 1 型、 ALK2、ACVR1	I	NP_001096.1
骨形成タンパク質受容体 1A 型、 ALK3、BMPR1A	I	NP_004320.2
アクチビン A 受容体 1B 型、 ALK4、ACVR1B	I	NP_004293.1 アイソフォーム a NP_064732.3 アイソフォーム b NP_064733.3 アイソフォーム c
トランスフォーミング増殖因子ベ ータ受容体 1、ALK5、TGFBR1	I	NP_004603.1 アイソフォーム 1 NP_001124388.1 アイソフォーム 2 NP_001293139.1 アイソフォーム 3
骨形成タンパク質受容体 1B 型、 ALK6、BMPR1B	I	NP_001243722.1 アイソフォーム a NP_001194.1 アイソフォーム b
アクチビン A 受容体 1C 型、 ALK7、ACVR1C	I	NP_660302.2 アイソフォーム 1 NP_001104501.1 アイソフォーム 2 NP_001104502.1 アイソフォーム 3 NP_001104503.1 アイソフォーム 4
アクチビン A 受容体 2A 型、 ACTRIIA、ACVR2	II	NP_001607.1 アイソフォーム 1 NP_001265508.1 アイソフォーム 2
アクチビン A 受容体 2B 型、 ACTRIIB、ACVR2B	II	NP_001097.2
骨形成タンパク質受容体 2 型、 BMPR2、BMPR2	II	NP_001195.2
トランスフォーミング増殖因子ベ ータ受容体 2、TGFBR2、 TGFBR2	II	NP_001020018.1 アイソフォーム a NP_003233.4 アイソフォーム b
抗ミューラー管ホルモン受容体 2 型、AMHR2、AMHR2	II	NP_065434.1 アイソフォーム 1 NP_001158162.1 アイソフォーム 2 NP_001158163.1 アイソフォーム 3

10

20

30

【0217】

C D R および s c F V の例示的な配列が、本明細書、例えば、表 1 において提供される。本抗体において使用される配列は、標的に結合する能力および参照抗体のアゴニストとしての活性、例えば、参照抗体の活性のレベルの少なくとも 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、または 95% を保持する限り、本明細書において提供される配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、または 99% 同一であり得る。2 つの配列間の「同一性」の計算は、以下の通り行うことができる。配列は、最適な比較目的のため整列される（例えば、ギャップは、最適なアライメントのため第一および第二の核酸配列の一方または両方に導入することができ、同一でない配列は、比較目的のため無視することができる）。比較目的のため整列された配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも 70%（例えば、少なくとも 80%、90% または 100%）である。

40

50

次いで、対応するヌクレオチド位置のヌクレオチドが比較される。第一の配列中の位置が、第二の配列中の対応する位置の同じヌクレオチドによって占有されるとき、次いで、分子は、その位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、ギャップの数、および2つの配列の最適なアライメントのため導入される必要があるそれぞれのギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【0218】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数値計算用アルゴリズムを使用して達成することができる。一部の実施形態では、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、Blossum62マトリックス、PAM250マトリックス、NW Sgapdna.CMPマトリックスのいずれかを使用した、GC Gソフトウェアパッケージ(gcg.comで入手可能)におけるGAPプログラムに組み込まれている、NeedlemanおよびWunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)アルゴリズムを使用して決定される。一部の実施形態では、2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、PAM120重量残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用した、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている、E. MeyersおよびW. Miller((1989) CABIOS, 4:11-17)のアルゴリズムを使用して決定することができる。

10

【0219】

一部の実施形態では、本明細書に記載される二重特異性および多重特異性試薬はまた、公知の抗I型または抗II型受容体抗体、例えば、表BまたはCにおいて提供される抗I型または抗II型受容体抗体由来の1つまたは複数の抗原結合ドメインを含み得るか、または含まない。

20

【0220】

30

40

50

【表 4】

表 B-例示的な抗 I 型または抗 II 型受容体抗体配列

公開番号/学術雑誌	著者/発明者/出願人	標的	日付
Nature Structural Biology, 7(6):492-496	Kirsch T, Sebald W, and Dreyer MK	抗 BMPRIA	2000
米国公開第 2013/0089560 号明細書	Chartier-Courtaud BC and Gurney AL	形態形成タンパク質受容体結合剤およびその使用方法	2013
国際公開第 2018/183376 号パンフレット	Rigel Pharmaceuticals, Inc.	ACVR2A 特異的抗体およびその使用方法	2018
米国公開第 2013/0344067 号明細書	Acceleron Pharma, Inc.	ACVRL1 受容体およびリガンドアンタゴニストおよびその使用	2013
米国特許第 7,537,762 号明細書	Amgen Fremont Inc., Pfizer Inc.	アクチビン受容体様キナーゼ-1 に対するヒトモノクローナル抗体 I	2009
米国特許第 10,428,148 号明細書	Saitama Medical University, Daiichi Sankyo Company	抗 ACVR1	2019
米国公開第 2016/0075772 号明細書	Regeneron Pharmaceuticals	進行性骨化性線維異形成症の処置 (抗 ACVR1)	2016
米国公開第 2015/0125471 号明細書	INSERM, Universite Paul Sabater Toulouse III, Centre National De La Recherche Scientifi ue	炎症の貧血の処置および診断において使用するための方法および医薬組成物	2015
米国特許第 9,611,321 号明細書	Fox Chase Cancer Center	合理的に設計された抗ミューラー管阻害物質 II 型受容体抗体	2017
国際公開第 2019/086331 号パンフレット	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT	二重特異性抗体結合 ACVRL1 および BMPR2	2019
米国特許第 9,969,806 号明細書	Novartis AG	臀部骨折手術後の筋量および機能を改善するための BIMAGRUMAB の投与 (抗 ACVR2A/B)	2018
国際公開第 2011/056497 号パンフレット	Genentech Inc.	アクチビン受容体 IIB 型組成物および使用方法	2010
米国特許第 10,260,068 号明細書	Sumitomo Dainippon Pharma Co. Lt., Kyoto University	進行性骨化性線維異形成症のための予防的薬剤および治療的薬剤 (抗 ACVR1)	2019
米国特許第 9,493,556 号明細書	Acceleron Pharma Inc.	ACVR2A 結合剤およびその使用	2016
国際公開第 95/30003 号パンフレット	Creative Biomolecules Inc., The Ludwig Institute for Cancer Research	形態形成タンパク質特異的細胞表面受容体およびその使用 (I 型および II 型受容体標的)	1995
米国公開第 2011/0182904 号明細書	Zimmerman D, Selby M, Srinivasan M, Bell M, Singh S, Leblanc HN, Zens KD, Sproul TW	骨形成タンパク質に対する抗体およびその受容体ならびにその使用方法	2011
欧州特許第 3345921 号明細書	Knopf J, Seehra J, Kumar R	抗 ACTRIIB 抗体	2018
米国特許第 9,365,65 号明細書	Feige J, Glass D, Hatakeyama S, Richardson BP, Trifilieff E	抗 ACTRIIB 抗体	2016
米国公開第 2017/0306027 号明細書	Knopf J, Kumar R, Grinberg A, Pearsall RS, Sako DS, Castonguay R, Li G, Dagon Y	抗 ALK7 抗体	2017

10

20

30

40

【 0 2 2 1 】

50

【表 5 - 1】

表 C-国際公開第 2019086331 号パンフレットの配列

CDR	配列	配列番号	
第一の二重特異性抗体コンストラクト(TPP-14696)			
鎖 1(TPP-13654/抗 ACVRL1)			
CDR H1	IYAMS	184.	
CDR H2	AISGSGGSTYYADSVKG	185.	
CDR H3	DFDY	186.	
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	187.	
CDR L2	GNINRPS	188.	10
CDR L3	AAWDDSLNGRV	189.	
鎖 2(TPP-13667/抗 BMPR2)			
CDR H1	NAWMN	190.	
CDR H2	SISSSSYIYYADSVKG	191.	
CDR H3	AVAAGGMFWGLDQ	192.	
CDR L1	SGSRNIGSNVH	193.	
CDR L2	GNSNRPS	194.	
CDR L3	QSYDSSLNDHVV	195.	
第二の二重特異性抗体コンストラクト(TPP-14719)			
鎖 1(TPP-13660/抗 ACVRL1)			
CDR H1	SYAMS	196.	20
CDR H2	NINQDGSEKNYVDSMRG	197.	
CDR H3	EFDY	198.	
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	199.	
CDR L2	GNNKRPS	200.	
CDR L3	AAWDDSLNGRV	201.	
鎖 2(TPP-13469/抗 BMPR2)			
CDR H1	DYYMT	202.	
CDR H2	SISGGSTYYADSRKG	203.	
CDR H3	DFGVAGWFGQYGMDV	204.	
CDR L1	TGSSSNIGAGYDVH	205.	30
CDR L2	RSNQRPS	206.	
CDR L3	SSYAGNYNLV	207.	
個々の抗 ACVRL1 抗体クローン			
TPP-13660			
CDR H1	SYAMS	208.	
CDR H2	NINQDGSEKNYVDSMR	209.	
CDR H3	EFDY	210.	
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	211.	
CDR L2	GNNKRPS	212.	
CDR L3	AAWDDSLNGRV	213.	40

【 0 2 2 2 】

【表 5 - 2】

CDR	配列	配列番号
TPP-13654		
CDR H1	IYAMS	214.
CDR H2	AISGSGGSTYYADSVKG	215.
CDR H3	DFDY	216.
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	217.
CDR L2	GNINRPS	218.
CDR L3	AAWDDSLNGRV	219.
個々の抗 Bmpr2 抗体クローン		
TPP-13667		
CDR H1	NAWMN	220.
CDR H2	SISSSSSYIYYADSVKG	221.
CDR H3	AVAAGGMFWGLDQ	222.
CDR L1	SGSRNIGSNVH	223.
CDR L2	GNSNRPS	224.
CDR L3	QSYDSSLNDHVV	225.
TPP-13469		
CDR H1	DYYMT	226.
CDR H2	SISGGSTYYADSRKG	227.
CDR H3	DFGVAGWFGQYGMDV	228.
CDR L1	TGSSSNIGAGYDVH	229.
CDR L2	RSNQRPS	230.
CDR L3	SSYAGNYNLV	231.

10

20

【0223】

二重特異性および多重特異性抗体は、例えば、遺伝子操作された細胞または動物において、抗体をコードする配列を含む核酸から発現され、次いで、精製することができる。したがって、本明細書に記載される抗体をコードする核酸を含有する、抗体をコードする核酸ならびにベクター、好ましくは、発現ベクターもまた、本明細書において提供される。本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、結合されている別の核酸を輸送する能力がある核酸分子を指し、プラスミド、コスミドまたはウイルスベクターを含み得る。ベクターは、自己複製する能力があり得、宿主DNAに統合することができる。ウイルスベクターは、例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスを含む。

30

【0224】

ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で、本明細書に記載される抗体をコードする核酸を含み得る。好ましくは、組み換え発現ベクターは、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つまたは複数の制御配列を含む。用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。制御配列は、ヌクレオチド配列の恒常的発現を指示するもの、ならびに組織特異的制御および/または誘導性配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現レベルなどのような要因に依存し得る。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、これにより、本明細書に記載される抗体をコードする本明細書に記載される核酸によってコードされる、融合タンパク質またはポリペプチドを含む、タンパク質またはポリペプチドを生成することができる。

40

【0225】

50

組み換え発現ベクターは、原核生物または真核生物の細胞における本明細書に記載される抗体の発現のため設計することができる。例えば、本発明のポリペプチドは、大腸菌 (*E. coli*)、昆虫細胞 (例えば、バキュロウイルス発現ベクターを使用)、酵母細胞または哺乳類細胞において発現させることができる。適当な宿主細胞は、Goeddel, (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CAにおいてさらに考察されている。あるいは、組み換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写され、翻訳され得る。当該技術分野において公知の方法を使用して、本明細書に記載される方法または組成物における使用のため、発現または翻訳後に、本明細書に記載される抗体を精製することができる。

10

【0226】

あるいは、核酸の発現のための、本明細書に記載される抗体をコードする核酸、またはベクター (例えば、ウイルスベクター) は、それを必要とする対象に送達することができる。

【0227】

V. 抗体ポリペプチドの発現

本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体を提供するための単離された遺伝子材料の操作後、抗体をコードするポリヌクレオチドは、典型的には、所望される量の抗体を生成するために使用され得る宿主細胞に導入するための発現ベクターに挿入される。抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ、例えば、標的分子に結合する抗体の重鎖または軽鎖の組み換え発現は、本明細書に記載される。本明細書に記載される抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはその一部 (好ましくは、重鎖または軽鎖可変ドメインを含有する) をコードするポリヌクレオチドが得られたら、抗体分子を生成するためのベクターは、当該技術分野で周知の技術を使用した組み換えDNAテクノロジーによって生成されてもよい。したがって、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含有するポリヌクレオチドを発現させることによる、タンパク質を調製する方法は、本明細書に記載される。当業者に周知である方法を使用して、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳調節シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、例えば、インビトロ組み換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組み換えを含む。したがって、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される抗体分子、もしくはその抗原結合フラグメント、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターが、本明細書において提供される。このようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでもよく (例えば、国際公開第86/05807号パンフレットおよび国際公開第89/01036号パンフレット; ならびに米国特許第5,122,464号明細書を参照のこと)、抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖全体の発現のためのこのようなベクターにクローニングされてもよい。

20

30

【0228】

用語「ベクター」または「発現ベクター」は、宿主細胞における所望される遺伝子に導入し、発現させるためのビヒクルとして、本明細書に記載される方法に従い使用されるベクターを意味するために本明細書において使用される。当業者に公知である通り、このようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群から容易に選択され得る。一般に、本明細書に記載されるベクターは、選択マーカー、所望される遺伝子のクローニングを促進するための適切な制限酵素部位、ならびに真核生物または原核生物細胞において侵入し、および/または複製する能力を含むだろう。多数の発現ベクターシステムが利用されてもよい。例えば、1つの種類のベクターは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス (RSV、MMTVもしくはMOMLV) またはSV40ウイルスなどの動物ウイルス由来である、DNAエレメントを利用する。他のものは、内部リボソ

40

50

ーム結合部位を有するポリシストロニック系の使用を含む。加えて、DNAをそれらの染色体に統合した細胞は、遺伝子導入された宿主細胞の選択を可能にする1つまたは複数のマーカーを導入することによって選択されてもよい。マーカーは、栄養要求性宿主への原栄養性、殺生物剤抵抗性（例えば、抗生物質）または銅などの重金属に対する抵抗性をもたらしてもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、発現されるべきDNA配列に直接結合されるか、または同時形質転換によって同じ細胞に導入され得る。さらなるエレメントはまた、mRNAの最適な合成のため必要とされてもよい。これらのエレメントは、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含んでもよい。

【0229】

特定の実施形態では、クローニングされた可変領域遺伝子は、上で考察された重鎖および軽鎖定常領域遺伝子（例えば、ヒト重鎖および軽鎖定常領域遺伝子）と共に、発現ベクターに挿入される。真核細胞における発現を誘発する能力がある任意の発現ベクターが、使用されてもよい。適当なベクターの例としては、プラスミドpCDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、およびpZeoSV2（Invitrogen、San Diego、CAから入手可能）、ならびにプラスミドpCI（Promega、Madison、WIから入手可能）が挙げられるが、これらに限定されない。一般に、高レベルの免疫グロブリン重鎖および軽鎖を適当に発現するものについての多数の形質転換された細胞のスクリーニングは、例えば、ロボット支援システムによって、行われ得る日常的な実験である。ベクターシステムはまた、米国特許第5,736,137号明細書および米国特許第5,658,570号明細書において教示され、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。このシステムは、高発現レベル、例えば、>30pg/細胞/日をもたらす。他の例示的なベクターシステムは、例えば、米国特許第6,413,777号明細書において開示される。

【0230】

他の実施形態では、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体は、米国特許出願公開第2003-0157641号明細書において開示されるものなどのポリシストロニックコンストラクトを使用して発現されてもよく、その全体が本明細書に組み込まれる。これらの発現システムにおいて、抗体の重鎖および軽鎖などの目的の複数の遺伝子産物は、単一ポリシストロニックコンストラクトから生成されてもよい。これらのシステムは、有利には、比較的高いレベルの抗体をもたらすための配列内リボソーム進入部位（IRES）を使用する。同等のIRES配列は、本明細書にまた組み込まれる、米国特許第6,193,980号明細書において開示される。当業者は、このような発現システムを使用して、本出願において開示される抗体の全範囲を効率的に生成し得ることは理解されるだろう。

【0231】

より一般的には、抗体の単量体サブユニットをコードするベクターまたはDNA配列が、調製されると、発現ベクターは、適切な宿主細胞に導入され得る。プラスミドの宿主細胞への導入は、当業者に周知の様々な技術によって達成することができる。これらは、例えば、Fugene（登録商標）またはリポフェクタミンを使用したリポトランスフェクション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープ化されたDNAを用いた細胞融合、微量注射、およびインタクトなウイルスの感染を含む、遺伝子導入を含むが、これらに限定されない。典型的には、宿主へのプラスミド導入は、標準的なリン酸カルシウム共沈殿法を介したものである。発現コンストラクトを有する宿主細胞は、軽鎖および重鎖の生成に適切な条件下で成長させ、重鎖および/または軽鎖タンパク質合成についてアッセイされる。例示的なアッセイ技術は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、または蛍光標示式細胞分取分析（FACS）、免疫組織化学などを含む。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 2 】

発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞に移動され、次いで、遺伝子導入された細胞は、従来技術によって培養された、本明細書に記載される方法において使用するための抗体が生成される。したがって、異種プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される抗体もしくはその抗原結合フラグメント、またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞がまた、本明細書において提供される。特定の実施形態では、2本鎖化された抗体の発現のため、重鎖と軽鎖の両方をコードするベクターは、以下で詳細に記載される通り、免疫グロブリン分子全体の発現のため、宿主細胞において同時発現されてもよい。

【 0 2 3 3 】

宿主細胞は、本明細書に記載される2つの発現ベクターである、重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクターを用いて同時に遺伝子導入されてもよい。2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの均等な発現を可能にする、同一の選択可能なマーカーを含有してもよい。あるいは、重鎖と軽鎖ポリペプチドの両方をコードする、単一ベクターが使用されてもよい。このような状況下で、軽鎖は、有利には、重鎖前に置かれて、過剰な毒性のない重鎖を回避する、Proudfoot, Nature 322(1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(1980), 2197を参照のこと。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含んでもよい。

【 0 2 3 4 】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」は、組み換えDNA技術を使用して構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードする、ベクターを有する細胞を指す。抗体の組み換え宿主からの単離のプロセスの記載において、用語「細胞」および「細胞培養物」は、他のところで明らかに特定されない限り、抗体の供給源を示すために互換的に使用される。言い換えると、ポリペプチドの「細胞」からの回収は、細胞全体のスピンドウン、または培地と懸濁された細胞の両方を含有する細胞培養物のいずれかからを意味し得る。

【 0 2 3 5 】

様々な宿主発現ベクターシステムを利用して、本明細書に記載される方法において使用するための抗体分子を発現させてもよい。このような宿主発現システムは、目的のコード配列が、生成され、続いて精製され得るビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列を用いて形質転換されるか、または遺伝子導入されるとき、インサイツで本明細書に記載される抗体分子を発現し得る細胞もまた表す。これらは、抗体をコードする配列を含有する組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）、枯草菌（*B. subtilis*））；抗体をコードする配列を含有する組み換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母（例えば、サッカロマイセス属（*Saccharomyces*）、ピキア属（*Pichia*））；抗体をコードする配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を用いて感染させた昆虫細胞システム；組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を用いて感染させた、または抗体をコードする配列を含有する組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）を用いて形質転換された植物細胞システム；または哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組み換え発現コンストラクトを有する哺乳類細胞システム（例えば、COS、CHO、NSO、BLK、293、3T3細胞）などの微生物を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、特に、組み換え抗体分子全体の発現のための、大腸菌（*Escherichia coli*）などの細菌細胞、より好ましくは、真核細胞は、組み換え抗体分子の発現のため使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと合わせた、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳類細胞は、抗体の効率的な発現システ

10

20

30

40

50

ムであり、例えば、Foecking et al., Gene 45(1986), 101;Cockett et al., Bio/Technology 8(1990), 2を参照のこと。

【0236】

タンパク質発現のため使用される宿主細胞株は、しばしば、哺乳類起源のものであり、当業者は、そこで発現されるべき所望される遺伝子産物に最も適している、特定の宿主細胞株を決定する能力を示す。例示的な宿主細胞株は、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)、DG44およびDUXB11(チャイニーズハムスター卵巣株、DHFRマイナス)、HELA(ヒト子宮頸癌)、CVI(サル腎臓株)、COS(CVIのSV40 T抗原を用いた誘導体)、VERY、BHK(ベビーハムスター腎臓)、MDCK、WI38、R1610(チャイニーズハムスター線維芽細胞)、BALBC/3T3(マウス線維芽細胞)、HAK(ハムスター腎臓株)、SP2/O(マウス骨髄腫)、P3x63-Ag3.653(マウス骨髄腫)、BFA-1c1BPT(ウシ内皮細胞)、RAJI(ヒトリンパ球)および293(ヒト腎臓)を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、宿主細胞株は、CHOまたは293細胞である。宿主細胞株は、典型的には、市販のサービスであるAmerican Tissue Culture Collectionから、または公開された文献から入手可能である。

10

【0237】

加えて、挿入された配列の発現を調節するか、または所望される特定の様式で遺伝子産物を修飾し、プロセシングする宿主細胞株が選択されてもよい。タンパク質生成物のこのような修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセシングならびにタンパク質および遺伝子産物の修飾の特徴的および特異的なメカニズムを有する。適切な細胞株または宿主システムを選択して、発現される外来タンパク質の正しい修飾およびプロセシングを確実にすることができる。この目的で、主要な転写物の正しいプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化の細胞機構を有する真核生物宿主細胞が使用されてもよい。

20

【0238】

組み換えタンパク質の長期間の高収率の生成のため、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株が、操作により作製されてもよい。ウイルス複製起源を含有する発現ベクターを使用するよりむしろ、宿主細胞は、適切な発現調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)によって調節されるDNA、および選択可能なマーカーを用いて形質転換することができる。外来DNAの導入後、操作された細胞を、富化培地において1~2日間成長させてもよく、次いで、選択培地に切り替える。組み換えプラスミドにおける選択可能なマーカーは、選択に対する抵抗性を付与し、細胞が、プラスミドをそれらの染色体に安定的に統合し、成長してフォーカスを形成し、順に、クローニングされ、細胞株に拡大されることが可能になる。この方法を有利に使用して、抗体分子を安定的に発現する細胞株を操作により作製してもよい。

30

【0239】

それぞれ、tk-、hgprt-またはaprt-細胞において利用することができる、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., Cell 11(1977), 223)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48(1992), 202)、およびアデニンホスホリボシル転移酵素(Lowy et al., Cell 22(1980), 817)遺伝子を含むが、これらに限定されない、多数の選択システムが使用されてもよい。また、抗代謝物抵抗性は、以下の遺伝子:メトトレキサートに対する抵抗性を付与する、dhfr(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77(1980), 357;O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(1981), 1527);ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与する、gpt(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(1981), 2072);アミノグリコシドG-418に対する抵抗性を付与する、neo、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy

40

50

12(1993), 488-505 ; Wu and Wu, *Biotherapy* 3(1991), 87-95 ; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32(1993), 573-596; Mulligan, *Science* 260(1993), 926-932 ; および Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62(1993), 191-217; TIB TECH 11(1993), 155-215 ; ならびにハイグロマイシンに対する抵抗性を付与する、hygro (Santerre et al., *Gene* 30(1984), 147) のための選択基盤として使用することができる。使用することができる組み換えDNAテクノロジーの、当該技術分野で一般的に公知の方法は、Ausubel et al.(eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY(1993) ; Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990) ; および Chapters 12 and 13, Dracopoli et al.(eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY(1994) ; Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1(1981)において記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0240】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加することができ、概説については、Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expressison of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, New York, Vol. 3.(1987)を参照のこと。抗体を発現するベクターシステムにおけるマーカーが、増幅可能であるとき、宿主細胞の培養物に存在する阻害剤のレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させるだろう。増幅された領域は、抗体遺伝子と関連するため、抗体の生成はまた、増加されるだろう、Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3(1983), 257を参照のこと。

【0241】

インビトロでの生成により、多量の所望されるポリペプチドを得るためのスケールアップが可能になる。組織培養条件下での哺乳類細胞培養技術は、当該技術分野において公知であり、例えば、エアリフト反応器もしくは連続攪拌反応器における均一な懸濁培養、または例えば、中空繊維、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上での固定化もしくは捕捉細胞培養を含む。必要および/または所望される場合、ポリペプチド溶液は、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的生合成後または本明細書に記載されるHICクロマトグラフィーステップ前もしくは続く、通例のクロマトグラフィー法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロース上でのクロマトグラフィーまたは(イムノ-)親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。

【0242】

本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合フラグメント、バリエーション、もしくは誘導体をコードする遺伝子はまた、細菌または昆虫または酵母または植物細胞などの非哺乳類細胞において発現することもできる。核酸を容易に取り込む細菌は、大腸菌 (*Escherichia coli*) もしくはサルモネラ属 (*Salmonella*) の株などの、腸内細菌科のメンバー ; 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などのバチルス科 (*Bacillaceae*) ; 肺炎球菌属 (*Pneumococcus*) ; ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、およびヘモフィルス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*) を含む。細菌において発現されるとき、異種ポリペプチドは、典型的には、封人体の一部にあることは、さらに理解されるだろう。異種ポリペプチドは、単離され、精製され、次いで、機能的分子にアセンブリーされなければならない。4価形態の抗体が望ましい場合、次いで、サブユニットは、4価の抗体に自己アセンブリーするだろう、例えば、国際公開第02/096948号パンフレットを参照のこと。

【0243】

細菌システムにおいて、多数の発現ベクターは、有利には、発現されている抗体分子のため意図される使用に依存して選択されてもよい。例えば、多量のこのようなタンパク質が、生成されるべきであるとき、抗体分子の医薬組成物の生成のため、容易に精製される

融合タンパク質生成物の高レベルの発現を指示するベクターが、望ましくてもよい。このようなベクターは、融合タンパク質が生成されるように、抗体をコードする配列が、lacZコード領域とインフレームでベクターに個々にライゲーションされ得る、大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクター pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2(1983), 1791); pINベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13(1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24(1989), 5503-5509) などを含むが、これらに限定されない。pGEXベクターをまた使用して、外来ポリペプチドをグルタチオンS-転移酵素 (GST) との融合タンパク質として発現させてもよい。一般に、このような融合タンパク質は、可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズのマトリックスへの吸着および結合、続いて、遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解された細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物が、GST部分から放出され得るように、トロンピンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

10

【0244】

原核生物に加えて、真核生物微生物がまた使用されてもよい。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、または一般的なパン酵母が、真核生物微生物の中でも最も一般的に使用されるが、多数の他の株、例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) が、一般的に入手可能である。サッカロマイセス属 (*Saccharomyces*) における発現のため、プラスミド YRp7、例えば、(Stinchcomb et al., Nature 282(1979), 39; Kingsman et al., Gene 7(1979), 141; Tschemper et al., Gene 10(1980), 157) が、一般的に使用される。このプラスミドは既に、トリプトファンにおいて成長する能力を欠く酵母の変異株、例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1 (Jones, Genetics 85(1977), 12) のための選択マーカーをもたらず TRP1 遺伝子を含む。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての trp1 損傷の存在は、トリプトファンの不存在下での成長によって、形質転換を検出するのに有効な環境をもたらず。

20

【0245】

昆虫システムにおいて、キンウワバ科核多角体病ウイルス (*AcNPV*) が、典型的には、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。ウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞において成長する。抗体をコードする配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングされ、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の調節下に置かれてもよい。

30

【0246】

明細書に記載される抗体が、組み換え発現されると、本明細書に記載される、抗体全体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態は、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性、特に、タンパク質A後の特定の抗原についての親和性によって、およびサイズ分類カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差次的溶解性、例えば、硫酸アンモニウム沈殿によるもの、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によるものを含む、当該技術分野の標準的な手法に従い、精製することができる。あるいは、本明細書に記載される抗体の親和性を増加させる別の方法は、米国特許出願公開第2002-0123057号明細書において開示される。

40

【0247】

VI. 使用方法

本組成物および方法は、研究ならびに治療用などを含む、様々な方法で使用することができる。

【0248】

例えば、骨格筋および軟部組織における異所性軟骨内骨の形成である異所性骨化 (HO

50

)は、関節の不動および疼痛からの病的状態の有意な原因である。HOに關与する正確なメカニズムは、分かっていないが、外傷、炎症および生体力学ストレスとのその関連性が、障害された損傷修復およびホメオスタシスのプロセスを示唆する。本発明者らは、骨形成タンパク質(BMP)I型受容体ALK2の活性化変異によって引き起こされる進行性骨化性線維異形成症(FOP)であるHO(一方、外傷によって誘導されたHOは、ALK2、ALK3および潜在的に、ALK6によって制御されると思われる)の一遺伝子性原因の基礎をなすメカニズムを調査した。FOPおよび後天的な形態のHOは、不適切なBMPシグナル伝達の共通のメカニズムを共有するが、BMPシグナルが骨形成対組織再生を制御すると解釈される様式の理解は不完全なままである。

【0249】

BMP9は、血管内皮静止状態を誘発し得る多機能性リガンドであり、肺高血圧症の動物モデルにおける肺血管疾患に対して保護性である。しかしながら、一部の状況において、動物のBMP9を用いた処置は、異所性骨化、または注射部位での軟部組織における異所性骨の所望されない形成を導き得る。BMP9は、II型受容体BMPRII、ACTRIIAおよびACTRIIBに会合し、I型受容体ALK1およびALK2に会合する。BMPRIIおよびALK1に会合することによって、二重特異性抗体試薬は、組織常在性線維脂肪生成前駆細胞などの、骨形成能を有する細胞におけるALK2を用いたこれらのII型受容体のいずれかの活性化に起因する異所性骨化を引き起こすことなく、および潜在的に、肝臓におけるALK2を用いたII型受容体のいずれかの活性化に起因する肝臓壊死を引き起こすことなく、BMPRIIおよびALK1の活性化に起因する、BMP9の血管内皮静止状態作用を誘発し得ることが提案される。機能の特異性は、全ての組織中、特に、異所性骨化に關与する間葉系幹細胞上で発現され、BMP6およびBMP7などの高度な骨形成分子のシグナル伝達と關連するALK2とは対照的に、内皮に限定され内皮BMP9シグナル伝達機能と關連するALK1を標的にすることによって制御される。

【0250】

したがって、肺動脈性肺高血圧症および遺伝性出血性末梢血管拡張症(HHT)症候群を含む血管の状態の処置のための、BMPRIIおよびALK1を認識して、BMP9のシグナル伝達を再現する、例示的な二重特異性抗体が提供される。他の例は、表Dにおいて以下で提供される。

【0251】

【表6】

表 D-二重特異性 BMP/TGFβ シグナル伝達 Ab の潜在的な筋骨格および結合組織疾患適用

標的の組み合わせ	治療的使用
抗 ACTRIIA + 抗 ALK2	軟骨形成、軟骨修復;骨折治癒、偽関節、人工関節エンジニアリング;ヘモクロマトーシス
抗 ACTRIIA + 抗 ALK3	褐色脂肪生成;メタボリックシンドローム;腎線維症
抗 BMPRII + 抗 ALK3	骨形成;骨折治癒;偽関節;人工関節エンジニアリング;ヘモクロマトーシス
抗 BMPRII + 抗 ALK6	腱修復、治癒、および再建
抗 TGFBRII + 抗 ALK5	マルファン症候群、ロイス・ディーツ症候群;固形腫瘍
抗 BMPRII + 抗 ALK7	再建手術または審美術のための脂肪生成
抗 AMHRII + 抗 ALK6	卵巣癌;受精/避妊の調節

【0252】

したがって、例えば、ALK2シグナル伝達に起因するBMP9の異所性骨化作用を伴

10

20

30

40

50

わず、内在性 BMP 9 と関連する ALK 2 シグナル伝達の動員を回避することによって、肝臓壊死および再生に対する望ましくない影響を回避して、この疾患における欠損 BMP 9 シグナル伝達を増強するために、抗 BMPRII / 抗 ALK 1 二重特異性抗体を介した肺動脈性肺高血圧症の処置のために使用することができる、抗 BMPRII / 抗 ALK 1 二重特異性抗体を含む治療分子が本明細書において提供される。

【0253】

本明細書に記載される方法はまた、この疾患における欠損 BMP 9 シグナル伝達を増強するための抗 BMPRII / 抗 ALK 1 二重特異性抗体を介した遺伝性出血性末梢血管拡張症の処置；欠損 BMP 9 シグナル伝達を再現するための抗 BMPRII / 抗 ALK 1 二重特異性抗体を介した急性呼吸促進症候群 (ARDS)、急性肺傷害 (ALI) または他の肺血管性漏出症候群の処置；内皮機能不全が、欠損 BMP 9 シグナル伝達を再現するための抗 BMPRII / 抗 ALK 1 二重特異性抗体による調節に受容性であり得る、様々な他の血管疾患状態の処置；肝臓内 BMP 9 シグナル伝達欠損を再現するための抗 BMPRII / 抗 ALK 1 二重特異性抗体を介した肝線維症の処置を含み得る。

10

【0254】

方法はまた、抗 BMPRII / 抗 ALK 3、抗 BMPRII / 抗 ALK 2、抗 ACTRIIA / 抗 ALK 3、または抗 ACTRIIA / 抗 ALK 2 二重特異性抗体を介した腎線維症の処置を含み得る。理想的なターゲティング分子の同定は、最小の異所性骨化作用を含む大部分の抗線維化作用を有するシグナル伝達分子の同定に依存するだろう。

【0255】

方法はまた、骨芽細胞分化および骨石灰化を促進し、これにより、軟骨内骨形成を促進するための BMP 2、BMP 4、または BMP 6 シグナル伝達を再現するための抗 BMPRII / 抗 ALK 3 二重特異性抗体を使用した骨折の処置、骨折偽関節の修復、または骨融合の誘導を含み得る。

20

【0256】

方法はまた、軟骨細胞分化を介して軟骨形成を促進し、これにより、軟骨内骨形成を促進するための BMP 6、BMP 7 または BMP 8 シグナル伝達を再現するための抗 ALK 2 二重特異性抗体と共に、抗 BMPRII / 抗 ALK 3 または抗 ACTRIIA を使用した、骨折の処置、骨折偽関節の修復、または骨融合の誘導を含み得る。

【0257】

方法はまた、軟骨または骨組織のエンジニアリングのため、抗 BMPRII / 抗 ALK 3 または抗 BMPRII / 抗 ALK 2 二重特異性抗体を使用した、骨形成または軟骨形成分化のエクスピボまたはインビトロでの誘導を含み得る。

30

【0258】

治療分子は、例えば、外傷後の骨の治療エンジニアリング、再建術、または整形外科、脊髄もしくは神経外科的手法のための、BMPRII および ALK 3 (もしくは ALK 2) の活性化を介して、または ACTRIIA および ALK 2 (もしくは ALK 3) の活性化を介して、エクスピボで骨形成を誘導するため使用され得る、抗 BMPRII / 抗 ALK 3、抗 BMPRII / 抗 ALK 2、抗 ACTRIIA / 抗 ALK 3、または抗 ACTRIIA / 抗 ALK 2 二重特異性抗体を含む。肝臓における BMPRII および ALK 3、または ACTRIIA および ALK 2 の活性化を刺激することによって、肝臓におけるヘプシジン発現を誘導するため、ならびに輸血依存性貧血、ベータサラセミアおよびヘモクロマトーシス様の状態において過負荷された鉄を減少させるための、抗 BMPRII / 抗 ALK 3 または抗 ACTRIIA / 抗 ALK 2 二重特異性抗体を含む治療分子がまた、本明細書において提供される。

40

【0259】

抗 ACTRIIB / 抗 ALK 7 二重特異性抗体を含む例示的な治療分子は、再建および審美外科手術適用のため、ACTRIIB および ALK 7 の活性化を介して、脂肪生成を誘導するため使用することができる。これらの薬剤は、患者由来細胞またはヒト前駆細胞からの生物学的インプラントの製造のため、インサイツ、またはエクスピボでの形成手術

50

、整形外科および再建手術適用のため使用することができる。

【0260】

ALK2と一緒にBMPRIIまたはACTRIIAをターゲティングするための、抗BMPR2/抗ALK2または抗ACTRIIA/抗ALK2を含む治療分子を使用して、褐色脂肪生成を促進し、エネルギー利用を改善することにより、メタボリックシンドローム、肥満、もしくは糖尿病および関連する障害を改善もしくは修正することができる。

【0261】

抗BMPR2/抗ALK6または抗ACTRIIA/抗ALK6二重特異性抗体を含む治療分子は、例えば、腱前駆組織、または腱の可能性を有する間葉系幹細胞におけるGDF5、GDF6、およびGDF7の組織特異的作用を刺激することによる、BMPRIIまたはACTRIIAおよびALK6の活性化を介した腱形成の誘導のため、使用することができる。これらの薬剤は、患者由来細胞またはヒト前駆細胞からの生物学的インプラントの製造のため、インサイツ、またはエクスピボでの整形外科および再建手術適用のため使用することができる。

10

【0262】

抗TGFBR1/抗ALK5、抗TGFBR1/抗ALK4、抗ACTRIIA/抗ALK5または抗ACTRIIA/抗ALK4、抗ACTRIIB/抗ALK5または抗ACTRIIB/抗ALK4二重特異性抗体を含む治療分子は、例えば、TGFBR1およびALK5の活性化によって、またはTGFBR1およびALK4、または代わりに、ALK4もしくはALK5と共にACTRIIAもしくはACTRIIBの活性化を介して、腫瘍細胞の成長停止を誘導するため使用することができる。

20

【0263】

抗TGFBR1/抗ALK5 抗TGFBR1/抗ALK4二重特異性抗体を含む治療分子は、例えば、TGFBR1およびALK5の活性化を介した、もしくはTGFBR1およびALK4の活性化を介した、再建もしくは審美手術適用のため、またはTGFBR1およびALK5の活性化を介した、もしくはTGFBR1およびALK4の活性化を介した、マルファン疾患、ロイス・ディーツ症候群、および制御不全もしくは欠損TGFBR1シグナル伝達に起因する他の大動脈障害の処置のために、線維化組織の形成を誘導するため使用することができる。

【0264】

抗ACTRIIA/抗ALK5または抗ACTRIIA/抗ALK4二重特異性抗体を含む治療分子は、例えば、肥大型心筋症、または高血圧性心疾患において見られるものなどの、病的な肥大を阻害するために、ACTRIIAおよびALK4、またはALK5をターゲティングするため、使用することができる。

30

【0265】

受容体の他の組み合わせを、二重特異性抗体を介して標的にして、組織および細胞における新規の生理的作用を誘導することができる。例えば、抗TGFBR2/抗ALK3；抗BMPR2/抗ALK4；抗BMPR2/抗ALK5は、I型受容体によって指示されるが、II型およびI型受容体のこの特異的な補体を発現する組織の高度に制限されたサブセットにおける生理学（それぞれ、ALK3を介してBMP2/4を、ALK4を介してGDF8/11を、ALK5を介してTGFb1/3を刺激する骨形成、抗筋形成、または線維形成）を誘導し得る。あるいは、これらの新規または非天然のシグナル伝達の組み合わせは、内在性リガンドを用いて見られない固有のバイオロジーを誘発し得るが、治療上有用であるかもしれない。このようなバイオロジーは、石灰化から分離された軟骨形成、または軟骨形成から分離された石灰化を含み得る。

40

【0266】

上記の二重特異性抗体または適用のいずれかにおいて、抗AMHRII、抗ACTRIIAまたは抗ACTRIIBは、類似の、より強力な、またはより組織選択的な作用を達成するための所定の抗I型受容体抗体との組み合わせで、抗BMPRIIと互換可能であり得る。

50

【0267】

この状況で使用される場合、「処置すること」は、障害の少なくとも1つの症状を回復させることを意味する。状態の処置のための治療有効量の本明細書に記載される化合物の投与は、少なくとも1つの症状または臨床パラメーターの改善をもたらすだろう。

【0268】

VII. 医薬組成物および投与方法

本明細書に記載される方法は、有効成分として本明細書に記載される二重特異性抗体を含む医薬組成物の使用を含む。

【0269】

医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、語句「薬学的に許容される担体」は、医薬投与と適合可能な、生理食塩水、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含む。補足の活性な化合物はまた、組成物に取り込まれることができる。

10

【0270】

医薬組成物は、典型的には、その意図される投与経路と適合可能であるよう製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜的、および直腸投与が挙げられる。

【0271】

適当な医薬組成物を製剤する方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005; およびシリーズ Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY) の本を参照のこと。例えば、非経口的、皮内、または皮下適用のため使用される溶液または懸濁液は、以下の成分：注射用水などの無菌の希釈剤、生理食塩水溶液、不揮発油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などのバッファーおよび塩化ナトリウムまたはブドウ糖などの浸透圧の調整のための剤を含み得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの、酸または塩基を用いて調整することができる。非経口的調製物は、ガラスまたはプラスチック製の、アンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量のバイアルにおいて封入することができる。

20

30

【0272】

注射可能な使用に適当な医薬組成物は、無菌の水溶液（水溶性の場合）または無菌の注射可能な溶液もしくは分散液の即時調製のための分散液もしくは無菌の粉末を含み得る。静脈内投与のため、適当な担体は、生理学的生理食塩水、静菌性の水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は、無菌でなければならず、容易なシリンジ適用性が存在する程度まで流動体化されるべきである。それは、製造および保存の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、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）、およびその適当な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。正しい流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合、要求される粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合では、組成物において等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどのポリアルコールを含むことが好ましいだろう。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる剤、例えば、組成物において、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによって、引き起こすことができる。

40

50

【 0 2 7 3 】

無菌の注射可能な溶液は、要求される量の活性な化合物を、上で列挙された成分の1つまたは組み合わせとの適切な溶媒において取り込み、続いて、必要に応じて、濾過無菌によって調製することができる。一般に、分散液は、塩基性分散媒体および要求される、上で列挙されるもの由来の他の成分を含有する、活性な化合物を無菌のビヒクルに取り込むことによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製用の無菌の粉末の場合、好ましい調製方法は、既に無菌濾過されたその溶液から、有効成分および任意のさらなる所望される成分の粉末を得る、真空乾燥および凍結乾燥である。

【 0 2 7 4 】

経口組成物は、一般に、不活性な希釈剤および食用の担体を含む。経口治療投与の目的のため、活性な化合物は、賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセル剤の形態で使用することができる。経口組成物はまた、口腔洗浄薬として使用するための、流体担体を使用して調製することができる。薬学的に適合可能な結合剤、および/またはアジュバント材料は、組成物の一部として含み得る。錠剤、ピル剤、カプセル剤、トローチ錠などは、以下の成分、または類似の性質の化合物：微結晶セルロース、ガムトラガントもしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogel、もしくはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotesなどの潤滑剤；コロイド状2酸化ケイ素などの滑剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジフレーバリングなどの香味料のいずれかを含有することができる。

【 0 2 7 5 】

吸入による投与のため、化合物は、適当な高圧ガス、例えば、炭酸ガスなどのガスを含有する圧縮容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレアの形態で送達することができる。このような方法は、米国特許第6,468,798号明細書に記載されるものを含む。

【 0 2 7 6 】

本明細書に記載される治療化合物の全身投与はまた、経粘膜手段または経皮手段によるものであり得る。経粘膜または経皮投与のため、透過されるべき障壁に適切な浸透剤は、製剤において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該技術分野で知られており、例えば、経粘膜投与のため、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻用スプレーまたは座薬の使用を通じて達成することができる。経皮投与のため、活性な化合物は、当該技術分野において一般的に知られる軟膏、膏薬、ジェル剤、またはクリーム剤に製剤化される。

【 0 2 7 7 】

医薬組成物はまた、直腸送達のため、座薬（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤と共に）または保持浣腸剤の形態で調製することができる。

【 0 2 7 8 】

核酸であるか、または核酸を含む治療化合物は、DNAワクチンなどの、核酸剤の投与に適当な任意の方法によって投与することができる。これらの方法は、遺伝子銃、バイオインジェクター、および皮膚パッチならびに米国特許第6,194,389号明細書において開示される微粒子DNAワクチンテクノロジーなどの針の不要な方法および米国特許第6,168,587号明細書において開示される粉末形態のワクチンを含む哺乳類経皮の針の要らないワクチン接種を含む。加えて、鼻腔内送達が、上記の、Hamajima et al., Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10(1998)において特に記載される通り、可能である。リポソーム（例えば、米国特許第6,472,375号明細書に記載される）およびマイクロカプセル化も使用することができる。生分解性標的化可能な微粒子送達システムもまた使用することができる（例えば、米国特許第6,471,996号明細書に記載される）。

【 0 2 7 9 】

10

20

30

40

50

一実施形態では、治療化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む、徐放性製剤などの、身体からの迅速な除去に対して治療化合物を保護する担体を用いて調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの、生分解性の生体適合可能なポリマーを使用することができる。このような製剤は、標準的な技術を使用して調製することができるが、または市販で、例えば、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Incから得ることができる。リポソーム懸濁剤（細胞の抗原に対するモノクローナル抗体を用いて細胞を選択するよう標的にされたりポソームを含む）はまた、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号明細書に記載される、当業者に公知である方法に従い、調製することができる。

【0280】

医薬組成物は、投与のための指示書と共に、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

【実施例】

【0281】

本発明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を制限しない、以下の実施例においてさらに記載される。

【0282】

材料および方法

以下の材料および方法を、以下の実施例において使用した。

【0283】

細胞培養およびウエスタンブロット分析

肺動脈内皮細胞（PAEC、患者番号593089、Lonza）を、完全培地（Lonza CC-3156番およびCC-4178番）において、12ウェルプレート（Falcon（商標）ポリスチレンマイクロプレート、Corning 353043番）におけるウェル当たり400,000個の細胞で播種した。37、5.0%CO₂での一晚のインキュベート後、細胞を、PBS（GIBCO 14190-144番）を用いて洗浄し、新鮮培地を与え、24時間インキュベートした。PAECを、PBSを用いて2回すすぎ、0.1%FBS（GIBCO A3160402番）を含む基礎培地において24時間、飢餓状態においた。選択したウェルを、それぞれ10ng/mLの、2つの最も有望なバイオチン化scFv組み合わせ（ALK1.8およびBMPR2.12）と共に60分間、次いで、様々な同時処理での1ng/mLのrhBMP9（R&D 3209BP-CF）、1mg/mLのストレプトアビジン（ThermoFisher 21122番）、および10ng/mLのモノクローナルBMP9中和抗体（R&D MAB3209）と共に、1時間プレインキュベートした。ウェルをPBSで洗浄し、80mLの1xNuPAGE LDS試料バッファー（ThermoFisher NP0007番）に回収した。試料を、100で5分間、インキュベートし、次いで、電気泳動によって分離し、ハウスキーピングマーカーとしてトータルSmad1（CST 6944番）およびGAPDH（ThermoFisher MA5-15738-HRP）を使用し、リン酸化形態を認識する特異的な抗体であるSMAD1/3（Abcam 52903）、SMAD1/5/8（Cell Signaling Technology、CST 9516番）、およびSMAD2（CST 3108番）を使用したウエスタンブロットによって分析した。ウエスタンブロットを、SuperSignal（商標）West Femto最高感受性基質（ThermoFisher 34096番）およびKodak CarestreamインピボMS-FXプロマルチスペクトル画像化システムを用いて検出した。

【0284】

野生型およびAcvr11 KOマウス由来の肺毛細血管内皮細胞（PMVEC）を、完全培地（Lonza CC-3156番およびCC-4178番）において、12ウェ

ルプレート (Falcon (商標) ポリスチレンマイクロプレート、Corning 353043番)におけるウェル当たり400,000個の細胞で播種した。37、5.0%CO₂での一晚のインキュベート後、細胞を、PBS (GIBCO 14190-144番)を用いて洗浄し、新鮮培地を与え、24時間インキュベートした。PAECを、PBSを用いて2回すすぎ、0.1%FBS (GIBCO A3160402番)を含む基礎培地において24時間、飢餓状態においた。選択したウェルを、それぞれ10ng/mLの、2つの最も有望なビオチン化scFv組み合わせ (ALK1.8およびBMPR2.12)と共に60分間、次いで、様々な同時処置で、1ng/mLのrhBMP9 (R&D 3209BP-CF)、1ug/mLのストレプトアビジン (ThermoFisher 21122番)、および10ng/mLのモノクローナルBMP9中和抗体 (R&D MAB3209)と共に、1時間プレインキュベートした。ウェルをPBSで洗浄し、80mLの1xNuPAGE LDS試料バッファー (ThermoFisher NP0007番)に回収した。試料を、100 で5分間、インキュベートし、次いで、電気泳動によって分離し、ハウスキーピングマーカーとしてトータルSMAD1 (CST 6944番)およびGAPDH (ThermoFisher MA5-15738-HRP)を使用し、リン酸化形態を認識する特異的な抗体である、SMAD1/3 (Abcam 52903番)、SMAD1/5/8 (CST 9516番)、およびSMAD2 (CST 3108番)を使用したウエスタンブロットによって分析した。ウエスタンブロットを、SuperSignal (商標) West Femto最高感受性基質 (ThermoFisher 34096番)およびKodak CarestreamインビボMS-FXプロマルチスペクトル画像化システムを用いて検出した。

【0285】

ビオチン化手法

最も有望なscFvクローンを、ストレプトアビジンを用いて刺激したとき、受容体を架橋結合するためにビオチン化した。試料を、7KDaのカットオフのZeba (商標) スピン脱塩カラム (ThermoFisher 89889番)を使用して透析し、次いで、DSB-X (商標) ビオチンタンパク質標識キット (ThermoFisher D20655番)を使用してコンジュゲートさせた。

【0286】

ビオチン化手法の有効性を、ストレプトアビジン-HRP (ThermoFisher 21130番)を使用したウエスタンブロットによって示した。結合親和性および特異性の保存を、ビオチン化-scFvタンパク質が、特定の様式で固定化ALK1およびBMPR2受容体に結合する能力を確認するためのバイオレイヤー干渉法 (BLI、Octet Red) 分析によって示した。

【0287】

インセルウエスタン

テロメラーゼ固定化毛細血管内皮 (TIME) 細胞培養物を、完全培地 (ATCC 100-030および100-041番)において、高結合性96ウェルプレート (Corning 3340番)に播種し、コンフルエントまで成長させ、血清を24時間、枯渇させた。TIME細胞を、様々な同時処置で、rhBMP9 (20pM)、scFvタンパク質 (500pg/mL)、およびストレプトアビジン (1mg/mL)を用いて処理した。プレートを、PBSを用いて2回洗浄し、冷メタノール (Fisher 412番)を用いて固定し、洗浄し、透過処理し、洗浄し、TBS (ThermoFisher J75892番)中の2%BSA (Fisher BP1600番)を用いてブロックした。p-SMAD1/5 (CST 9516番)またはp-SMAD2 (CST 8828番)に特異的な一次抗体を加え (1:1000希釈)、続いて二次抗体 (HRP抗ウサギIgG、CST 1:10000)を加えた。洗浄後、アッセイを、BioRx UltraSensitive化学発光基質 (Surmodics)を使用して展開し、0.25秒の積分を用いてSpectraMaxプレートルミノメーター上で展開した。

【0288】

ルシフェラーゼアッセイ

ウシ大動脈内皮細胞 (BAEC、Sigma-Aldrich B304-05番) を、完全培地 (Lonza、CC-3156およびCC-4176番) において、96ウェルプレート (Corning 3340番) 上、ウェル当たり31,000個の細胞濃度で播種した。翌日、細胞を、遺伝子導入試薬プロトコールにおいて記載した通り、ウェル当たり60ng/mLのPolyJet (SignaGen、SL100688) および20ng/mLのBRE-LUCプラスミドを使用して遺伝子導入した。16時間後、細胞をPBSで2回洗浄し、24時間の回復のため、血清低減培地を与えた。翌日、BAECをPBSで洗浄し、6時間飢餓状態にし (FBS 0.1%)、20pM rhBMP9、20nMのALK1-Fc (R&D 370AL番) および20nMの異なるscFvで処理し、次いで、37、5.0% CO₂で一晩インキュベートした。

10

【0289】

翌日、本発明者らは、MTSアッセイ (Promega G3582番) を使用して細胞生存率を試験し、Promegaキット (1500番) によって記載される通り、ルシフェラーゼ活性アッセイを行った。プレートを、0.25秒の積分を用いてSpectraMaxプレートルミノメーター上で読み取った。

【0290】

Octet Red

scFvクローンの組み換えヒトALK1およびBMPR2受容体との生化学的相互作用を特徴付けるために、本発明者らは、バイオレイヤー干渉法 (Octet Red 384、ForteBio) を使用した。IgG Fc融合タンパク質 (すなわち、ALK1-Fc、およびBMPR2-Fc) として発現する受容体を、抗ヒトIgG Fc捕捉センサー (ForteBio、18-0015番) 上に、PBS中のHEPES 20mM (GIBCO 15630番)、0.05% Tween-20 (Promega H5151番)、およびイミダゾール25mM (SIGMA I0250番) の平衡化バッファー中、10μg/mLの濃度で固定した。全てのクローンを、平衡化バッファー中の異なる範囲の濃度: 50nM、100nM、200nM、および400nMで試験した。ForteBioプログラム方法論を、以下の通り設定した: ベースライン平衡化60秒、ロード時間60秒、洗浄時間120秒、結合時間300秒、および解離時間600秒。結合動態を、ForteBioデータ分析ソフトウェアを使用して分析した。

20

30

【0291】

[実施例1]

BMP/TGF 受容体細胞外ドメインの単鎖Fv (scFv) Abは、シグナル伝達を調節し、機能的リガンドを形成することができる。

本発明者らは、内皮の特異的リガンドBMP9についてのシグナル伝達複合体を形成するI型およびII型受容体であるALK1およびBMPR2の細胞外ドメインに結合するヒトscFv Abのパネルを同定するためのスクリーニングを行った^{6、7}。ヒト生殖系列V_HおよびV_L遺伝子由来の単鎖可変領域 (scFv) Abを発現する約10¹²個の別個のファージ粒子のコンビナトリアル多様性ライブラリーを、固定化組み換えALK1またはBMPR2タンパク質の連続的親和性精製、および非特異的クローンの枯渇を使用して、組み換えヒトALK1-FcまたはBMPR2-Fc細胞外ドメイン-IgG Fc融合タンパク質に結合するが、IgG Fc自体には結合しない、ファージクローンについてスクリーニングし、これにより、目的のいくつかのクローンを明らかにした。3ラウンドの富化により、ALK1またはBMPR2に結合するが、両方に結合せず、固有の配列を有するscFvのパネルを得た。これらのファージ配列を、スケールアップおよび大腸菌 (E. coli) における精製のため、scFv発現ベクターにサブクローニングした。それぞれの標的について、いくつかのscFvフラグメントは、Octet Redバイオレイヤー干渉法 (BLI、Fortebio) に基づき、それらの意図される標的について中程度から高い親和性 (K_D約20~200nM) を示し、低い置換比のビオチン化 (分子当たり平均1.5~2部位) 後でさえ、この親和性および特異性を保持し、一

40

50

方の受容体への結合は維持されていたが、他方には結合せず、対照 A C T R I I A - F c タンパク質には結合しなかった。C D R 配列を、P A R A T O M E オンラインツール (Kunik et al., PLoS Comput Biol 8(2): e1002388(2012); Kunik et al., Nucl eic Acids Res. 2012 Jul;40(Web Server issue): W521-4(2012)) を使用して予測した。したがって、それぞれの抗原に結合するいくつかの s c F v 候補を選択し、活性を E L I S A により確認し、配列を発現ベクターにクローニングし、単鎖 F v タンパク質として発現させた。

【0292】

バイオレイヤー干渉法 (B L I) による A L K 1 および B M P R 2 に対する単鎖可変フラグメント陽性クローンについての結合効率のスクリーニング。

10

バイオレイヤー干渉法を使用して、s c F v クローンのヒト B M P R 2 および A L K 1 受容体に対する親和性を決定した。s c F v クローン A L K 1 . 3 (図 1 A) および A L K 1 . 8 (図 1 B) 対固定化 A L K 1 の結合動態、ならびに B M P R 2 に対する B M P R 2 . 1 2 (図 1 C) および B M P R 2 . 2 3 (図 1 D) の結合動態を示す。これらのクローンの固定化 A L K 1 (図 2 A) 対 B M P R 2 (図 2 B) に対する特異性も試験し、これらのクローンのそれぞれが、それらの意図される標的についての親和性を示したが、高い相同性の対照タンパク質であるヒト A C V R 2 A 受容体については親和性を示さなかったことを表している (図 1 および 2 C)。

【0293】

B M P R 2 または A L K 1 に対する s c F v は、インビトロで B M P 9 シグナル伝達を阻害する。

20

選択した単鎖抗体が、ヒト A L K 1 および B M P R 2 受容体の細胞外リガンド結合ドメインを認識する能力を試験するために、本発明者らは、ヒト I D 1 遺伝子からクローニングした B M P 応答エレメントプロモーター配列によって制御されるホタルルシフェラーゼを発現するプラスミドを介して、B M P 応答エレメントルシフェラーゼ (B R E - ルシフェラーゼ) レポーターを使用した B M P - 転写活性の細胞ベースのアッセイを使用した。遺伝子導入した細胞を、様々な濃度の s c F v タンパク質の存在 / 不存在下で r h B M P 9 (1 n g / m L) を用いて一晩刺激した。B M P 9 リガンドトラップ A L K 1 - F c をまた、陽性対照として使用した。s c F v クローン B M P R 2 . 1 2、B M P R 2 . 2 3、A L K 1 . 3、および A L K 1 . 8 は、B R E - ルシフェラーゼ活性の最も効率的な阻害を示し、これらの s c F v タンパク質が、ヒト A L K 1 の領域およびリガンド結合と関連する B M P R 2 受容体に結合することを示唆している (図 3)。

30

【0294】

s c F v タンパク質のビオチン化。

A L K 1 . 3、A L K 1 . 8、B M P R 2 . 1 2、および B M P R 2 . 2 3 s c F v を、材料および方法のセクションに記載した通り、ビオチン化した。得られたビオチン化 s c F v を、ウエスタンブロット分析によって試験して、それらのビオチン化がうまくいったことを示した (図 4 A)。

【0295】

A L K 1 および B M P R 2 に対するビオチン化 s c F v の結合効率および特異性。

40

s c F v のビオチン化が、それらの結合能と干渉しないことを検証するために、陽性ビオチン化および野生型クローンを、バイオレイヤー干渉法を使用して再度スクリーニングした。ビオチン化 A L K 1 . 3 および A L K 1 . 8 s c F v タンパク質 (A L K 1 . 3 - B i o、A L K 1 . 8 - B i o、図 4 B および 4 D) ならびに B M P R 2 . 1 2 s c F v タンパク質 (B M P R 2 . 1 2 - B i o、図 4 C) は、高度に相同性の対照タンパク質に対する親和性の欠如に基づく特異性を維持しながら、それらの意図される標的に対する親和性を保持していた。

【0296】

A L K 1 および B M P R 2 を標的にするビオチン化 s c F v 複合体は、内皮細胞における B M P 9 の活性と同等の S M A D 1 / 5 / 9 活性化を誘導する。

50

インビトロでのBMPR2:ALK1シグナル伝達の特異的な活性化を示すために、ヒトおよびマウス毛細血管内皮細胞株を、異なる組み合わせのビオチン化scFvとプレインキュベートし、ストレプトアビジンで処理した。ストレプトアビジンの存在下、37で30分間の、培養したヒト肺毛細血管内皮細胞(PMVEC)のビオチン化ALK1.8/BMPR2.12 scFv複合体を用いた処理は、SMAD1/5/9のリン酸化を誘導し、一方、個々のビオチン化ALK1.8またはBMPR2.12とのインキュベートは、シグナル伝達を活性化しなかった(図5)。ビオチン化ALK1.8/BMPR2.12ストレプトアビジン複合体を介したシグナル伝達は、組み換えヒトBMP9を用いた処理後に観察されるものと類似したが、rhBMP9と対照的に、ウエスタンブロット(図5)およびインセルウエスタン分析(図6B)によって見られる、BMP9中和抗体(mAb3209)またはBMP9リガンドトラップALK1-Fcに影響しなかった。同様の実験を、野生型(WT)およびAcvr11 KOマウスPMVECを使用して繰り返し、これにより、ヒトPMVECにおける結果と同等の、WTマウス細胞におけるALK1.8/BMPR2.12複合体に対する応答におけるSMAD1/5/9シグナル伝達の活性化を示すが、Acvr11 KO PMVECにおいては示さず(図6A)、これは、二重特異性scFv複合体を介したシグナル伝達についてのALK1の要件と一致した。

10

【0297】

同定したscFV CDRの一部についての例示的な配列を、表1に示す。

【0298】

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 1. 単鎖 Fv BMPRI/BMPRII 抗体 CDR の配列

CDR	配列	配列番号	
クローン ALK1.2 (抗 ACVRL1/ALK1) *			
CDR L1	KLGDKYAS	1.	
CDR L2	LVIYQDSKRPS	2.	
CDR L3	QAWDSSTA	3.	
CDR H1	GSISSDDYYWS	4.	
CDR H2	WIGYIYSGITYY	5.	
CDR H3	REGCNDGVCYNGVFDY	6.	10
クローン ALK1.3 (抗 ACVRL1/ALK1)			
CDR L1	SSDVGTYNYVS	7.	
CDR L2	LMIYDVSKRPS	8.	
CDR L3	YSYTTSSSTW	9.	
CDR H1	DSIGSGDYYS	10.	
CDR H2	WIGYSYHTGSTDY	11.	
CDR H3	RDYYGYLGY	12.	
クローン ALK1.8 (抗 ACVRL1/ALK1)*			
CDR L1	QSISSYLN	13.	
CDR L2	LLIYAASSLQS	14.	
CDR L3	QQSYSTPR	15.	
CDR H1	GSISSDDYYWS	16.	
CDR H2	WIGYIYSGITYY	17.	
CDR H3	REGCNDGVCYNGVFDY	18.	20
クローン ALK1.8b (抗 ACVRL1/ALK1)			
CDR L1	SSNIGGNTVN	19.	
CDR L2	LLIYGDDLRRPS	20.	
CDR L3	AAWDDSLNAY	21.	
CDR H1	FTFSNYAMHS	22.	
CDR H2	WVAVISYDGSNKYY	23.	
CDR H3	RVRYYGSGSPIGY	24.	
クローン BMPR2.12 (抗 BMPR2/BMPRII)			
CDR L1	SSDVGGYKSVS (26-36)	25.	
CDR L2	LMIYDVSNRPS (48-58)	26.	
CDR L3	SSYTSSSSLW (91-100)	27.	
CDR H1	GTFSSYAIS	28.	
CDR H2	WMGRIIPILGIANY	29.	
CDR H3	TDLWGVGAD	30.	30
クローン B15 (抗 BMPR1A/ALK3)			
CDR L1	NTDIGYYNYVS	31.	
CDR L2	LLIFEVDNRPS	32.	
CDR L3	SSYSTYNIL	33.	
CDR H1	YTFTGYMH	34.	
CDR H2	WMGRINPNSGGTNYA	35.	
CDR H3	RDPTYDILTGPY	36.	40

【 0 2 9 9 】

【表 7 - 2】

CDR	配列	配列番号	
クローン B16 (抗 BMPRI1A/ALK3)			
CDR L1	QSVSSNLA	37.	
CDR L2	LLIYGASSRAT	38.	
CDR L3	QQYIYSPY	39.	
CDR H1	YNFAGYYVH	40.	
CDR H2	WMGWINPNSGGTDYA	41.	
CDR H3	RNLQFFRP	42.	
クローン RI-2 (抗 ACVR1/ALK2)			
CDR L1	NIGSKNVH	43.	10
CDR L2	LVIYDDSDRPS	44.	
CDR L3	QAWDSSTAV	45.	
CDR H1	GSISSSYYWG	46.	
CDR H2	WIGSIYYSGSTYY	47.	
CDR H3	RQVGPVLKSVS	48.	
クローン RI-3 (抗 ACVR1/ALK2)			
CDR H1	FTFSSYAMS	49.	
CDR H2	WWSAISGSGGSTYY	50.	
CDR H3	KSASFFDY	51.	
CDR L1	QSVSSSYLA	52.	20
CDR L2	LLIYGASSRAT	53.	
CDR L3	QQHFRWPW	54.	
クローン RI-4 (抗 ACVR1/ALK2)			
CDR L1	SSNIGSNTVN	55.	
CDR L2	LLIYSNNQRPS	56.	
CDR L3	AAWDDSLNGV	57.	
CDR H1	ASISSGGYYWS	58.	
CDR H2	WIGYSYYSGSTYY	59.	
CDR H3	RGGVRFDL	60.	
クローン RI-2-7 (抗 ACVR1/ALK2)			
CDR L1	ALPKKYAY	61.	30
CDR L2	LVIYEDSKRPS	62.	
CDR L3	YSTDSSGNP	63.	
CDR H1	FTFSSYAMS	64.	
CDR H2	WWSAISGSGGSTYY	65.	
CDR H3	KIPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDV	66.	
クローン RI-9 (抗 ACVR1/ALK2)			
CDR L1	SSNIGAGYDVH	67.	
CDR L2	LLIFDSSNRPS	68.	
CDR L3	QSYDFRLSGSM	69.	
CDR H1	FTFRAYPMS	70.	
CDR H2	WVSSITSSGSYY	71.	
CDR H3	RVGVTDYDFDY	72.	40

【 0 3 0 0 】

【表 7 - 3】

CDR	配列	配列番号	
クローン RII-19 (抗 ACVR2A/ACTRIIA)			
CDR L1	SSNIGTNYVY	73.	
CDR L2	LLIYRNNQRPS	74.	
CDR L3	AAWDDSLSGW	75.	
CDR H1	FTFSSYAMS	76.	
CDR H2	WVSAISGSGGSTYYA	77.	
CDR H3	AKSIRTGSGYFDY	78.	
クローン H1-2 (抗 ACVR2A/ACTRIIA)			
CDR L1	SSNIGSNYVY	79.	10
CDR L2	LLIYRNNQRPS	80.	
CDR L3	AAWDDSLSGW	81.	
CDR H1	YTFTSYMH	82.	
CDR H2	WMGIINPSGGSTSYA	83.	
CDR H3	RDLLYGRGGGFQH	84.	
クローン H2-11 (抗 ACVR2B/ACTRIIB)			
CDR L1	SLRSYYAS	85.	
CDR L2	LVIYGKNNRPS	86.	
CDR L3	NSRDNSGKHLW	87.	
CDR H1	FTFDDYGMS	88.	
CDR H2	WVSGINWNGGSTGY	89.	20
CDR H3	RKSTGDY	90.	
クローン H2-15 (抗 ACVR2B/ACTRIIB)			
CDR L1	SSNIGAGYDVH	91.	
CDR L2	LLIYGNSNRPS	92.	
CDR L3	AAWDDSLNGPRM	93.	
CDR H1	FTFSDYYMS	94.	
CDR H2	WVSYISSSSSYTNY	95.	
CDR H3	RVNYYYGMDV	96.	
クローン H5-2 (抗 ACVR1B/ALK4)			
CDR L1	SLRKYYAS	97.	
CDR L2	LVIYGKKNRPS	98.	30
CDR L3	NSWDSSGNHV	99.	
CDR H1	GSISSGGYYWS	100.	
CDR H2	WIGYIYSGSTYY	101.	
CDR H3	REEVGDWFDP	102.	
クローン H3-2 (抗 BMPRI1B/ALK6)			
CDR L1	QGDSLRYKYYAS	109.	
CDR L2	LVIYGKSKRPS	110.	
CDR L3	NSWDSSGNHV	111.	
CDR H1	GGSISSGGYYWS	112.	
CDR H2	WIGYIYSGSTYY	113.	
CDR H3	REEVGDWFDP	114.	40

【 0 3 0 1 】

【表 7 - 4】

CDR	配列	配列番号
クローン BMPR2.23 (抗 BMPR2/BMPRII)		
CDR L1	TLHSGINVATYRIY	115.
CDR L2	YKSDLDKHQGS	116.
CDR L3	LIWHDYVWY	117.
CDR H1	CAASGFTFDDYAMH	118.
CDR H2	WVSGISWNSGSIGY	119.
CDR H3	KGGWGSSTHYYYGMDV	120.
クローン H4-1 (抗 ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	121.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	122.
CDR L3	AAWDDSLSGV	123.
CDR H1	YTFTGYMH	124.
CDR H2	WMGWINPNGGGTKYA	125.
CDR H3	TLSDYSSGGP	126.
クローン H4-4 (抗 ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	127.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	128.
CDR L3	AAWDDSLSGV	129.
CDR H1	YTFTGYHVVH	130.
CDR H2	WMGWINPDSGGTNFA	131.
CDR H3	RRSLDY	132.
クローン H4-7 (抗 ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	133.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	134.
CDR L3	AAWDDSLNGV	135.
CDR H1	FTFSNAWMS	136.
CDR H2	WVGRIKSKTDGGTTDY	137.
CDR H3	ASLVDY	138.
クローン H4-8 (抗 ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	139.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	140.
CDR L3	AAWDDSLSGP	141.
CDR H1	YTFTKYGIS	142.
CDR H2	WMGWISAYNVDTKY	143.
CDR H3	RRGLDY	144.

*Alk1.2 および Alk1.8 は、重鎖 CDR において 98%の同一性を有するが、別個の軽鎖 CDR を有さない。

【 0 3 0 2 】

抗 BMPRI / BMPRII 抗体の配列の例を以下に示す。配列を、V L - リンカー - V H として示し、リンカーは太字である。

【 0 3 0 3 】

クローン ALK 1 . 2 (抗 ALK 1 (ACVRL 1))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 4 5)

【 0 3 0 4 】

10

20

30

40

50

【化 1】

CAGCTGANTACNGNCGACGATGACAAGCTTTCCTATGAGCTGACACAGCCAC
 CCTCAATGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGA
 TAAATTGGGAGATAAATATGCTTCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCC
 CCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGC
 GATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGAC
 CCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACT
 GCGGTATTCGGTGGAGGGACCAAGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCT**
TCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC
 GGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
 CTGGTGGCTCCATCAGCAGTGATGATTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGAC
 CCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGATCACC
 TACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCGA
 AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCCGT
 GTATTACTGTGCCAGAGAGGGGTGTAATGATGGTGTATGCTATAATGGGGTC
 TTTGACTACTGNNGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGTCGACCCATT
 CGTTTCTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATG
 CTGGCGGCGGCTCTGANGGAGGCGGTTCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGA
 TTTTGATTATGAAAAGATGGC

10

20

【 0 3 0 5 】

アミノ酸配列（配列番号 1 4 6）

30

【 0 3 0 6 】

【化 2】

SYELTQPPSMSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS
 GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGEG
KSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTP
 GKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
 REGCNDGVCYNGVFDYWGQGLTVTVSS

40

【 0 3 0 7 】

クローンALK1.3（抗ALK1（ACVRL1））

ヌクレオチド配列（配列番号 1 4 7）

【 0 3 0 8 】

50

【化 3】

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
 CACCATCTCCTGCGCTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTATGTCT
 CCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGATGT
 CAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA
 ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTA
 TTA CTGCTACTCATATAACAACCAGCAGCACTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACC 10
 AAGGTCACCGTCCTAGGAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAAG
 CAAGGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGCTGAAGCC
 TTCGCAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCCGGTGACTCCATCGGCAGTG
 GTGATTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGCCTGGAATG
 GATTGGGTACAGCTATCACACTGGGAGCACCGACTACAACCCGTCCTCAAG
 AGTCGAGTTTCCATATCAGTGGACAGGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTTAAACT
 GAGGTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGATTAT 20
 TATGGATATTTGGGTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCACCGTCTCCTCA

【0309】

アミノ酸配列（配列番号148）

【0310】

【化 4】

QSALTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGTYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVS
 K RPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCYSYTTSSWVFGGGTKVTVL
 GEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLLKPSQTLSTCTVSGDSIGSGDYYSWIR 30
 QPPGKGLEWIGYSYHTGSTDYNPSLKSRVSVDRSKNQFSLKLRVTAADTAVY
 YCARDYYGYLGYWGQGLVTVSS

【0311】

クローンALK1.8（抗ALK1（ACVRL1））

ヌクレオチド配列（配列番号149）

【0312】

10

20

30

40

50

【化 5】

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGG
 TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA
 GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGA
 TTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACT
 GTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCGAACGTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGA
 TATCAAAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCGGAATCCAAAGCTAGCC
 AGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCT
 GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGTGATTACTACT
 GGAGTTGGATCCGCCAGACCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACAT
 CTATTACAGTGGGATCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACC
 ATATCAGTAGACACGTCGAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGA
 CTGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGGGGTGTAATGATGG
 TGTATGCTATAATGGGGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCG
 TCTCCTCA

10

20

【0313】

アミノ酸配列（配列番号150）

【0314】

【化 6】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVDIKEGKSS
GSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKG
 LEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG
 CNDGVCYNGVFDYWGQGLVTVSS

30

【0315】

クローンALK1.8b（抗ALK1（ACVRL1））

ヌクレオチド配列（配列番号151）

【0316】

40

50

【化 7】

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCGGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGTAATACTGTAAAC
 TGGTATCACCAACTCCCAGGATCGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTGATGA
 TCTGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACGT
 CAGCCTCCCTGGCCATCAGTAGGTTCCAGTCTGGGGATGAGGCTGATTATTAC
 TGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCA
 AGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGACTCC**
AAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGGGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT
 GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTA
 TGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
 GTTATATCATATGATGGAAGTAATAAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
 GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
 CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCCGCTAC
 TATGGTTCGGGGAGTCCCATTTGGGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
 TCTCCTCA

10

20

【 0 3 1 7 】

アミノ酸配列 (配列番号 1 5 2)

【 0 3 1 8 】

【化 8】

LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVNWYHQLPGSAPKLLIYGDDLRLP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISRFQSGDEADYYCAAWDDSLNAYVFGTGKLTVL
GEGKSSGSGSDSKASEVQLVGSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVR
 QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARVRYYGSGSPIGYWGQGLVTVSS

30

【 0 3 1 9 】

クローン BMP R 2 . 1 2 (抗 BMP R 2 (BMP R I I))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 5 3)

【 0 3 2 0 】

40

50

【化 9】

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
 CACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAAGTCTGTCT
 CCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGATGT
 CAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA
 ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTA
 TTA
 TACTGCAGCTCTTACACAAGCAGCAGCTCCCTTTGGGTGTTTCGGCGGAGGG
 ACCAAGCTCACCGTCCTAGGAG**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGA**
AAGCAAGGCTAGCCAGGTT**CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA**
 GCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGC
 AGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGA
 TGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAA**ACTACGCACAGAAGTTCCA**
 GGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGA
 GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGAT
 CTGTGGGGAGTGGGAGCAGATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
 CA

10

20

【0 3 2 1】

アミノ酸配列（配列番号 1 5 4）

【0 3 2 2】

【化 1 0】

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMYDVSN
 RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTV
 LGEG**KSSGSGSES**KASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV**SCKASGGTFSSYAISWVR**
 QAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAV
 YYCATDLWGVGADWVGGTGLVTVSS

30

【0 3 2 3】

クローン BMP R 2 . 2 3 （抗 BMP R 2 （BMPRII））

ヌクレオチド配列（配列番号 2 1 1）

【0 3 2 4】

40

50

【化 1 1】

GACGACGATGACAAGCTTCAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTCTTCCCTCTCTGC
 ATCTCCTGGAGCTTCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTACACAGTGGCATCAATG
 TTGCTACCTACAGGATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCTCCCA
 GTATCTGCTGACTTATAAGTCAGACTTAGATAAACATCAGGGGTCTGGAGTC
 CCCAGTCGCTTCTCTGGATCCAAAGATGCGTCGGCCAATGCAGGCATATTGCT
 CATTCTGGACTCCAGTCTGACGACGAGGGTACTATTATTGTTAATCTGGC
 ACGACTACGTCTGGTACTTCGGCGGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTGA
GGGTAAATCGTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGCGAGGTGCAG
 CTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCT
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
 CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTG
 GTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA
 CAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGAC
 ACGGCTCTGTATTATTGTGCAAAGGGCGGGTGGGGCAGCTCGACCCACTACT
 ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGT
 CGACCCATTCGTTTCTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTAACCTC
 CTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGANGGAGGCGGGTNCCGGTGGTGGCTCTG
 GTCCGG

10

20

【0 3 2 5】

アミノ酸配列 (配列番号 2 1 2)

30

【0 3 2 6】

【化 1 2】

DDDDKLQAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLHSGINVATYRIYWYQQKPGSPPQYL
 LTYKSDLDKHQGSGVPSRFSKGDASANAGILLISGLQSDDEGDYYCLIWHDYV
 WYFGGGTKVTVLGE**GKSSGSGSESK**ASEVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF
 TFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLY
 LQMNSLRAEDTALYYCAKGGWGSSTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSVDPFVSEY
 QGQSSDLPQPPVNAGGGSXGGGXRWLWFR

40

【0 3 2 7】

クローン B 1 5 : (抗 A L K 3 (B M P R I A))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 5 5)

【0 3 2 8】

50

【化 1 3】

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
 CACCTTCTCCTGCACTGGAACCAACACTGACATTGGTTATTATAATTATGTCT
 CCTGGTACCAACAACACTCCCAGGCAAAGCCCCAAACTCTTGATTTTTGAGGTC
 GATAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTAGTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAA
 CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTAT
 TACTGCAGCTCATATTCAACCTATAATATTTGCTCTTCGGCGGAGGGACCAA
 GCTCACCGTCCTAGGTGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCGGAATCCA
 AAGCTAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGAGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG
 GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTA
 CTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
 CGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCA
 GGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
 CAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTACTGTGCGAGAGACCCACG
 TATTACGATATTTGACTGGTCCGGAGTACTGGGGCCAGGGAACCGTCACCG
 TCTCCTCA

10

20

【0 3 2 9】

アミノ酸配列（配列番号 1 5 6）

【0 3 3 0】

【化 1 4】

LPVLTQPASVSGSPGQSITFSGTNTDIGYYNYVSWYQQLPGKAPKLLIFEVDN
 RPSGVPSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSTYNILLFGGGTKLTVLG
EGKSSGSGSESKASEVQLLESEAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQ
 APGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTA
 VYYCARDPTYDILTGPEYWGQGTIVTVSS

30

【0 3 3 1】

クローン B 1 6 : (抗 A L K 3 (B M P R I A))

ヌクレオチド配列（配列番号 1 5 7）

【0 3 3 2】

40

50

【化 1 5】

GAAATAGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA
 GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTG
 GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC
 AGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
 ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAGGATTTTGCAGTGTATTAC
 TGTCAGCAATATATTTACTCACCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGG
 ATATCAAAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGC
 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
 TGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGATACAACTTCGCCGGCTACTATGTTTAC
 TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACC
 CTAACAGTGGTGGCACAGACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCCACCAT
 GACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGACCTGAGTAGGCTGAGA
 TCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGGAATCTACAGTTTTTTTCGGCC
 AGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0 3 3 3】

アミノ酸配列 (配列番号 1 5 8)

【0 3 3 4】

【化 1 6】

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYIYSPYTFGQGTKVDIKEGKS
 SSGSSESKASEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYNFAAGYVHWVRQAPG
 QGLEWMGWINPNSGGTDYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMDLSRLRSDDTAVYY
 CARNLQFFRPGTLVTVSS

30

【0 3 3 5】

クローン RI - 2 : (抗ALK2 (ACVR1))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 5 9)

【0 3 3 6】

40

50

【化 1 7】

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACTCTCAGTGTGAGTGGCCCTGGGACAGACGG
 CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAATGTGCACTGGTA
 CCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATAGCGAC
 CGGCCCTCAGGGACCTCCGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAG
 CCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTG
 TCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGCAGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTC
 ACCGTCCTAGGTGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGC
 TAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGA
 GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTT
 ACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGG
 GAGTATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
 GCCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGATGACCT
 CAGTGACCGCCGCAGACACGGCCATATATTACTGTGCGAGACAGGTGGGCCC
 TGTGTAAAGTCGGTATCTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCACCTCA

10

20

【 0 3 3 7】

アミノ酸配列 (配列番号 1 6 0)

【 0 3 3 8】

【化 1 8】

SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRP
 SGTSERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVVFGGGTKLTVLG
 EGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQ
 PPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRAISVDTSKNQFSLKMTSVTAADTAIYYC
 ARQVGPVTKSVSQGTLVTVTS

30

【 0 3 3 9】

クローン R I - 3 : (抗 A L K 2 (A C V R 1)) * 異なるリンカー配列に留意されたい
 ヌクレオチド配列 (配列番号 1 6 1)

【 0 3 4 0】

40

50

【化 1 9】

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGCAGCC
 TCGTCTGAGCTGTGCGGCAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGC
 TGGGTGCGTCAGGCACCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATTAGC
 GGCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCA
 TTAGCCGTGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCG
 TCGGAAGATAACGCGGTGTATTATTGCGCGAAAAGCGCCAGCTTCTTTGATT
 ATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCAGCGGTGGAGGCGGTTCTG
GTGGAGGCGGTTCTGGGTGACGGAAGTTCAGAAATTGTGCTGACCCAGAGC
 CCGGGCACGCTGTCTCTGAGCCCGGGTGAACGTGCGACCCTGAGCTGTCTGTG
 CGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCGG
 GCCAGGCACCGCGTCTGCTGATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCGACCGGCAT
 TCCGGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTA
 GCCGTCTGGAACCGGAAGATTTTGCAGGTGTATTATTGCCAGCAGCATTTCGCT
 TGGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTA

10

20

【0 3 4 1】

アミノ酸配列 (配列番号 1 6 2)

【0 3 4 2】

【化 2 0】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
 GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSASFFDYWG
 QGTLVTVSSGGGGSGGGSGDGSSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS
 SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVY
 YCQQHFRWPWTFGQGTKVEIK

30

【0 3 4 3】

クローン RI - 4 : (抗ALK2 (ACVR1))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 6 3)

【0 3 4 4】

40

50

【化 2 1】

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAAGG
 TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
 TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTA
 CTGTGCAGCGTGGGATGACAGCCTGAATGGTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACC 10
 AAGGTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**
CAAAGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCC
 TTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCCATCAGCAGTG
 GTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTG
 GATTGGGTACAGCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAG
 AGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGTACCT
 GACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTATATCATTGTGCGAGAGGGGGG 20
 GTCAGGTTTGACCTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

【 0 3 4 5】

アミノ酸配列 (配列番号 1 6 4)

【 0 3 4 6】

【化 2 2】

SYELTQPPSASGTPGQKVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKVTVL
GEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLT~~CTVSGASISSGGYYWSWIR 30
 QHPGKGLEWIGYSYYSGSTYYNPSLKS~~RV~~TISVDTSKNQFSLYLTSVTAADTAVY
 HCARGGVRFDLWGQGLVTVSS

【 0 3 4 7】

クローン R I - 2 - 7 (抗 A L K 2 (A C V R 1))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 6 5)

【 0 3 4 8】

10

20

30

40

50

【化 2 3】

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAAACGG
 CCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAAAATATGCTTATTGGTA
 CCAGCAGAAGTCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGAGGACAGCAAA
 CGACCCTCCGGGATCCCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAATGG
 CCACCTTGACTGTCAGTGGGGCCAGGTGGAGGATGAAGCTGACTACTACTG
 TTAACAACAGACAGCAGTGGTAATCCAGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTG
 ACCGTCCTAGGTGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGC
TAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCA
 TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTAT
 TAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC
 ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATTCCTTGGGGTGA
 TTACGATTTTTGGAGTGGTTATTATACCAGGCCCGGTCACTCCGGTATGGACG
 TCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0 3 4 9】

アミノ酸配列（配列番号 1 6 6）

【0 3 5 0】

【化 2 4】

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPS
 GIPERFSGSSSGTMATLTVSGAQVEDEADYYCYSTDSSGNPVFGGGTKLTVLGE
GKSSGSGSESKASEVQLLESGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
 GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CAKIPWGDYDFWSGYTRPGHSGMDVWGQGLTVTVSS

30

【0 3 5 1】

クローン R I - 9 : (抗 A L K 2 (A C V R 1))

ヌクレオチド配列（配列番号 1 6 7）

【0 3 5 2】

40

50

【化 2 5】

CAGGCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCCTGCGCTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGT
 AACTGGTACCAACAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAGCTCCTCATCTTTGAT
 AGCTCCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCCGG
 CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGAT
 TATTACTGCCAGTCCTATGACTTCAGGCTGAGTGGTCTATGGTCTTCGGCGG
 AGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTT
 CCGAATCCAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGG
 TCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC
 AGGGCCTATCCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT
 GGGTCTCATCCATTACTTCTAGTGGCAGTTACTACGCAGACTCAGTGAAGGGT
 CGATTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAGTTCACTGTATCTCCAAATGA
 ACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGTGGGAGT
 TACTGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0 3 5 3】

アミノ酸配列 (配列番号 1 6 8)

【0 3 5 4】

【化 2 6】

QAVLTQPPSVSGAPGQRVTISCAGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIFDSSN
 RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDFRLSGSMVFGGGTKLT
 VLGE**GKSSGSGSESK**ASEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRAYPMSW
 VRQAPGKGLEWVSSITSSGSYYADSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRADDTA
 VYYCARVGVTDYFDYWGQGLVTVSS

30

【0 3 5 5】

クローン R I I - 1 9 (抗 A C T R I I A (A C V R 2 A))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 6 9)

【0 3 5 6】

40

50

【化 2 7】

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAACTAATTATGTATAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAC
 CTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATT
 ACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGAC
 CAAGGTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAT**
CCAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
 CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGC
 TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT
 CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
 CCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
 AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTATCA
 GAACTGGGAGCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGT
 CTCCTCA

10

20

【0 3 5 7】

アミノ酸配列（配列番号 1 7 0）

【0 3 5 8】

【化 2 8】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
 SGAPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKVTVL
GEGKSSSGSESKASEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ
 APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV
 YYCAKSIRTGSGYFDYWGQGLVTVSS

30

【0 3 5 9】

クローン H 1 - 2（抗アクチビン R I I A（A C V R 2 A））

ヌクレオチド配列（配列番号 1 7 1）

【0 3 6 0】

40

50

【化 2 9】

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
 TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
 CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACC
 AAGCTCACCGTCCCTAGGTGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC
 CAAAGCTAGCCAGGTTTCAGCTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
 GGCTCAGTGAAGGTTTCCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACT
 ATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAT
 AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGA
 GTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCA
 GCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTCCTC
 TATGGTCGCGGGGGCGGTTTCCAGCACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCG
 TCTCCTCA

10

20

【0 3 6 1】

アミノ酸配列（配列番号 1 7 2）

【0 3 6 2】

【化 3 0】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVL
 GEGKSSSGSESKASQVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWR
 QAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA
 VYYCARDLLLYGRGGGFQHWGQGLVTVSS

30

【0 3 6 3】

クローン H 2 - 1 1（抗アクチビン R I I B（A C V R 2 B））

ヌクレオチド配列（配列番号 1 7 3）

【0 3 6 4】

40

50

【化 3 1】

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTAGGACAGACAGT
 CAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTAC
 CAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAAACAACC
 GGCCCTCAGGGATCCCAGCCCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC
 TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT
 AACTCCCGGGACAACAGTGGTAAGCATCTTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCA
 AGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCC**
AAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCT
 GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTA
 TGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCT
 GGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCC
 GATTCACCATCTCCANAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAA
 CAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCGAGGAAATCTACA
 GGTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCACCGTCTCTTCA

10

20

【 0 3 6 5】

アミノ酸配列 (配列番号 1 7 4)

【 0 3 6 6】

【化 3 2】

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP
 SGIPARFSGSSSGNTASLTITGAQAEDYCYCNSRDNSGKHLWVFGGGTKLTVL
GEGKSSGSGSESKASEVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVR
 QAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISTDNAKNSLYLQMNSLRAEDT
 ALYYCARKSTGDYWGQGLVTVSS

30

【 0 3 6 7】

クローン H 2 - 1 5 (抗アクチビン R I I B (A C V R 2 B))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 7 5)

【 0 3 6 8】

40

50

【化 3 3】

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGT
 AACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGGT
 AACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTG
 GCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGA
 TTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCCGAGAATGGTATTC
 GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCT**
GGTCCGAATCCAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGG
 CTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA
 CCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTACACAAACTACGCAGAC
 TCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGT
 ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
 GAGAGTAACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTC
 ACCGTCTCTTCA

10

20

【0 3 6 9】

アミノ酸配列（配列番号 1 7 6）

【0 3 7 0】

【化 3 4】

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
 RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPRMVFGGGTK
 LTVLGEG**KSSGSGSESK**ASEVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMS
 WIRQAPGKGLEWVSYISSSSSYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCARVNYYYGMDVWGQGLVTVSS

30

【0 3 7 1】

クローン H 5 - 2（抗 A L K 4（アクチビン R I B））

ヌクレオチド配列（配列番号 1 7 7）

【0 3 7 2】

40

50

【化 3 5】

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGT
 CAGAATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAAATATTATGCAAGCTGGTAC
 CAGCAGAAGGCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAAACAAAC
 GGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC
 TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT
 AACTCCTGGGACAGCAGTGGTAACCACGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGC
 TCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAA**
GCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
 CAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGG
 TTACTIONTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATT
 GGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGGGTC
 GAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
 CTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAAGTG
 GGAGACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCCACCGTCTCCTCA

10

20

【0 3 7 3】

アミノ酸配列 (配列番号 1 7 8)

【0 3 7 4】

【化 3 6】

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLKYYASWYQQKAGQAPVLVIYGKNKR
 PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSWDSSGNHVVFFGGGTKLTVL
GEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIR
 QHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
 YCAREEVGDWFDPPWGQGLVTVSS

30

【0 3 7 5】

クローン H 3 - 2 (抗 A L K 6 (B M P R 1 B))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 7 9)

【0 3 7 6】

40

50

【化 3 7】

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGT
 CAGAATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAAATATTATGCAAGCTGGTAC
 CAGCAGAAGGCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAAGCAAAC
 GGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC
 TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT
 AACTCCTGGGACAGCAGTGGTAACCACGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGC
 TCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAA**
GCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
 CAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGG
 TTACTIONTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATT
 GGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGGGTC
 GAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
 CTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAAGTG
 GGAGACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0 3 7 7】

アミノ酸配列 (配列番号 1 8 0)

【0 3 7 8】

【化 3 8】

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLKYYASWYQQKAGQAPVLVIYGKSKRP
 SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDYCYCNSWDSSGNHVVFVGGGTKLTVLG
EGKSSGSGSESKASQVQLQESGPLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQ
 HPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
 CAREEVGDWFDPPWGQGLVTVSS

30

【0 3 7 9】

クローン H 4 - 1 (抗 A L K 7 (A C V R 1 C))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 8 1)

【0 3 8 0】

40

50

【化 3 9】

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTACGTATAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
 TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
 CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACC
 AAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCCTCCGGATCTGGTTCCGAATC**
CAAAGCTAGCCAGGTTCAGCTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
 GGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACT
 ACATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATG
 GATCAACCCTAACGGTGGTGGCACAAAGTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGG
 GTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCA
 GTCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACGCTTTCTGACTAT
 AGCAGTGGCGGACCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0 3 8 1】

アミノ酸配列（配列番号 1 8 2）

【0 3 8 2】

【化 4 0】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLSGVVFGGGTKLTVL
GEGKSSGSGSESKASQVQLQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVR
 QAPGQGLEWMGWINPNGGGTKYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDT
 AVYYCATLSDYSSGGPWGQGLVTVSS

30

【0 3 8 3】

クローン H 4 - 4（抗 A L K 7（A C V R 1 C））

ヌクレオチド配列（配列番号 1 8 3）

【0 3 8 4】

40

50

【化 4 1】

CAGGCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
 TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
 CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACC
 AAGCTCACCGTCTAGGTGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC
 CAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGACTGAGGTGAAGAGGCC
 TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCT
 ACCATGTGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
 GTGGATCAACCCTGACAGTGGTGGCACAACCTTTGCACAGAAGTTTCAGGGC
 AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAACTTA
 CCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCATTTATTACTGTGCGAGACGTTCACTT
 GACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0385】

アミノ酸配列 (配列番号 184)

【0386】

【化 4 2】

QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQR
 PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVL
 GEGKSSGSGSESKASEVQLVQSGTEVKRPGASVKVSCKASGYTFTGYHVHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNFAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELTSLSRSDDT
 AIYYCARRSLDYWGQGLVTVSS

30

【0387】

クローン H 4 - 7 (抗 A L K 7 (A C V R 1 C))

ヌクレオチド配列 (配列番号 185)

【0388】

40

50

【化 4 3】

TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACC
 TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGCGGATGAGGCTGATTATTA
 CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACC 10
 AAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**
CAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC
 TGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACG
 CCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGG
 CCGTATTA~~AAA~~AGCAA~~AA~~ACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTG
 AAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTC~~AAAA~~ACACGCTGTATCTGC
 AAATGAACAGCCTG~~AAA~~ACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTAGCCT 20
 GGTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

【 0 3 8 9 】

アミノ酸配列 (配列番号 1 8 6)

【 0 3 9 0 】

【化 4 4】

SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
 SGVPDRFSASKSGTSASLAISGLQSADEADYYCAA~~WDD~~SLNGVVFGGGTKLTVL
GEGKSSGSGSESKASEVQLVQSGGGLVQPGSLRLS~~CAAS~~GFTFSNAWMSWVR 30
 QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED
 TAVYYCASLVDYWGQGLVTVSS

【 0 3 9 1 】

クローン H 4 - 8 (抗 A L K 7 (A C V R 1 C))

ヌクレオチド配列 (配列番号 1 8 7)

【 0 3 9 2 】

10

20

30

40

50

【化 4 5】

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
 TCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
 TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATA
 ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
 TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
 CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACC
 AAGGTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**
CAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGTTGTGAAGAAGCC
 TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCAAGT
 ATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGAACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
 ATGGATCAGCGCTTACAATGTTGACACAAAGTATGCACAGAAGTTCAGGGC
 AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAACTGA
 GGAGCCTTAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGAGGGCT
 TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

【0393】

アミノ酸配列（配列番号188）

【0394】

【化 4 6】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKVTVL
GEGKSSGSGSESKASEVQLVQSGAVVKKPGASVKVSKASGYTFTKYGISWVR
 QAPEQGLEWMGWISAYNVDTKYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDT
 AVYYCARRGLDYWGQGLVTVSS

30

【0395】

[実施例 2]

二重特異性コンストラクト

二重特異性コンストラクトのいくつかの例を、ACVRL1（ACVRL1.8）およ
 びBMPR2（BMPR2.12）に結合するscFvクローンから作製した。これらの
 中間複合体を作製して、ALK1/ACVRL1およびBMPR2に対する二重特異性分
 子を得た。これらの複合体を、C末端のHisタグと共に、リンカーによって分けられた
 単一分子として2つのscFvを発現させるか、または代わりに、それぞれのscFvを
 別々に、Fc-融合分子として発現させ、次いで、1つのscFv-Fcヘテロ二量体に
 組み合わせることによって作製した。

40

【0396】

単一分子二重特異性またはヘテロ二量体二重特異性のいずれも、インビトロアッセイに
 おけるそれら自体に対して有意なBMP転写活性を有さなかった。図8を参照のこと。単
 一分子二重特異性として生物学的活性を有するよりむしろ、これらの分子は、Ni⁺⁺、
 またはCa⁺⁺、または抗Hisを使用してHisタグを繋ぎ合わせ、これによりヘテロ

50

四量体を形成させて、四量体として連結されたとき、活性を有していた。これらの結果は、ヘテロ四量体人工リガンドが、この経路におけるシグナル伝達をもたらすことを示し、この知見は、これらのBMP模倣シグナル伝達分子を機能させる鍵となる。

【0397】

クローンACVRL1.8(抗ACVRL1)

アミノ酸配列:

【0398】

【化47】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGKVDIKEGKSS
GSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKG
LEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG
CNDGVCYNGVFDYWGQGTLLVTVSS (配列番号 150)

10

【0399】

クローンBMPR2.12(抗BMPR2)

アミノ酸配列

【0400】

【化48】

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN
RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSLWVFGGGTKLTV
LGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSSYAISWVR
QAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDYAV
YYCATDLWGVDGADWGQGTLLVTVSS (配列番号 154)

20

30

【0401】

二重特異性コンストラクト:

BMPR2.12-Medium-ACVRL1.8-His

アミノ酸配列:

【0402】

40

50

【化49】

GDEMGTGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAP
 KLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWV
 FGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTF
 SSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELS
 SLRSEDVAVYYCATDLWGVGADWGQGLTVTVSSSGGGGSGGGGSSGSGGGG
DGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK
 LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGT
 KVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSISSDDYYW
 SWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT
 AVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGLTVTVSSSGGGGSHHHHHHHH* (配列
 番号 189)

10

【0403】

ACVRL1.8 - Long - BMPR2.12 - His
 アミノ酸配列：

20

【0404】

【化50】

GDEMGTGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL
 IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTK
 VDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSISSDDYYWS
 WIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
 VYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGLTVTVSSSGGGGSGGGGSSGGGGSGGGG
SSGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQ
 QHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYT
 SSSSLWVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC
 KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD
 TAYMELSSLRSEDVAVYYCATDLWGVGADWGQGLTVTVSSSGGGGSHHHHH
 HHH* (配列番号 190)

30

40

【0405】

BMPR2.12 - Long - ACVRL1.8 - His
 アミノ酸配列：

【0406】

50

【化 5 1】

GDEMGTGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAP
 KLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWV
 FGGGKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF
 SSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELS
 SLRSEDVAVYYCATDLWVGADWGQGLVTVSSSGGGGSGGGGSSGGGGSG
 GGGSSGGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNW
 YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS
 YSTPRTFGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPELVKPSQTLSTLCTVS
 GGSISSDDYYWSWIRQTPGKLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFS
 LKLSSVTAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGLVTVSSSGGGGSHH
 HHHHHH* (配列番号 191)

10

【0407】

[実施例 3]

20

4 価のコンストラクト

4 価のコンストラクトを、ACVRL1 (ACVRL1.8) および BMPR2 (BMPR2.12) に結合する scFv クローンから作製した。これらを、単一分子として、特定の変動する長さのスペーサーと共に発現する 4 価の複合体となるよう設計した。あるいは、それらを、IgG-Fc 融合タンパク質として発現する 2 つの二重特異性 scFv によって生成し、次いで、2 つのジスルフィド結合したホモ二量体 Fc 複合体として結合した 4 価の IgG-Fc タンパク質として設計した。

【0408】

これらのコンストラクトは、細胞において強力な BMP シグナル伝達を生じることができた (図 8 を参照のこと)。抗 ACVRL1 および抗 BMPR2 の 4 価の複合体は、内皮細胞において BMP 転写活性を誘発した。TIME 細胞 (ヒトテロメラーゼ不死化毛細血管内皮細胞) を培養し、BMP 応答エレメント (BRE-ルシフェラーゼ) レポーターを発現するプラスミドを用いて一過性に遺伝子導入した。BMP9 (1 ng/mL) は、これらの細胞において BMP 転写活性を誘発し、これは、MTS 比色分析生存率アッセイに基づく細胞相対数によって割った、ルシフェラーゼ活性の検出に基づく (RLU/生存率)。スペーサーによって結合し、C 末端の His タグドメイン (「ACVRL1.8-L-BMPR2.12-His」) を有する、単一抗 ACVRL1-scFv および単一抗 BMPR2-scFv からなる二重特異性コンストラクトは、それ自体、シグナル伝達活性を誘発しないが、モノクローナル抗 His 抗体と組み合わせて、これらの二重特異性分子を 4 価の複合体に複合体化したとき、活性であった。ジスルフィド結合したヘテロ四量体として発現したときの 4 価の複合体のシグナル伝達を示すために、IgG-Fc ドメイン融合タンパク質として発現し、ジスルフィド結合したホモ二量体 (「ACVRL1.8-L-BMPR2.12-Short-Fc」) にアセンブリーした同じ二重特異性分子からなる 4 価の複合体は、強力なシグナル伝達を誘発した。

30

40

【0409】

インビトロのシグナル伝達活性と一致して、生理食塩水 (50 uL)、組み換えヒト BMP9 (rhBMP9、50 uL 中の 150 ug/kg)、または組み換え四量体 Fc 融合タンパク質 ACVRL1.8-L-BMPR2.12-Short-Fc (50 uL 中の 150 ug/kg) の尾静脈注射の 24 時間後の、8 週齢のマウス由来の肺組織全体においてアッセイした Id1 遺伝子転写活性に基づく、インビボでのシグナル伝達 BMPシ

50

グナル伝達活性を示した(図9)。BMP9またはACVRL1.8-L-BMPR2.12-Short-Fcの注射は、肺組織全体における生理食塩水と比較して、BMP転写活性の増加を誘発した。

【0410】

インビボでのこのようなシグナル伝達の実証は、ACVRL1.8-L-BMPR2.12-Short-Fcまたは類似の分子などの組み換えシグナル伝達タンパク質を、マウスまたはラットなどの適当な動物モデルに、静脈内、筋肉内、または皮下注射することによって達成される。30分~24時間後、これらの処置対生理食塩水のBMPシグナル伝達活性に対する影響を、SMAD1/5/9エフェクタータンパク質のリン酸化について、動物組織上で免疫組織化学を行うことによって、またはリン酸化SMAD1/5/9

10

【0411】

例示的な4価のコンストラクトの配列

s c F v クロ ー ン B M P R 2 . 1 2 (抗 B M P R 2) :

【0412】

【化52】

20

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMYDVSN
RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTV
LGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVR
QAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDYAV
YYCATDLWGVGADWGQGLVTVSS (配列番号 154)

【0413】

30

A = s c F v クロ ー ン A C V R L 1 . 8 (抗 A C V R L 1) :

【0414】

【化53】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGGQTKVDIKEGKSS
GSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKG
LEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG
CNDGVCYNGVFDYWGQGLVTVSS (配列番号 150)

40

【0415】

M = 2 価の複合体内の s c F v クロ ー ン 間の中程度のスペーサー : S G G G G S G G G
G S S G S G G G G D G G G G S G (配列番号 1 9 2)

【0416】

L = 2 価の複合体内の S c F v クロ ー ン 間の長いスペーサー : S G G S G G G G S S G
G G G S G G G G S S G G G G D G G G G S G (配列番号 1 9 3)

【0417】

s h o r t = ホモ二量体 F c 分子についての I g G F c ドメイン前の短いスペーサー

50

: G S G G G G D G G G G S G (配列番号 1 9 4)

【 0 4 1 8 】

medium = ホモ二量体 F c 分子についての I g G F c ドメイン前の中程度のスペーサー : G S G G G G D S G G G G S G G G G S S G G G G S G (配列番号 1 9 5)

【 0 4 1 9 】

long = ホモ二量体 F c 分子についての I g G F c ドメイン前の長いスペーサー : G S G G G G D S G G G G S G G S G G S G G S G G G S G G G G S G (配列番号 1 9 6)

【 0 4 2 0 】

F c = I g G F c 定常ドメイン :

10

【 0 4 2 1 】

【 化 5 4 】

DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGS (配列番号 197)

20

【 0 4 2 2 】

short (His) = His タグを有する、2 価のアーム間の短いスペーサー : G G H H H H H H H H G G (配列番号 1 9 8)

【 0 4 2 3 】

medium (His) = His タグを有する、2 価のアーム間の中程度のスペーサー : S G G G G S H H H H H H H H S G G G G S (配列番号 1 9 9)

【 0 4 2 4 】

long (His) = His タグを有する、2 価のアーム間の長いスペーサー : S G G G G S G G H H H H H H H H G G S G G G G S (配列番号 2 0 0)

30

【 0 4 2 5 】

太字 = s c F v の C D R 領域

【 0 4 2 6 】

(1) B M A - s h o r t - F c

【 0 4 2 7 】

40

50

【化 5 5】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGK
 APKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSL
 WVFGGGKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD
 YMELSSLRSEDYAVYYCATDLWGVGADWGQGLTVTVSSSGGGGSGGGGSSGS
 GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRT
 FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSD
 DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGLTVTVSSSGGGGGDGGGGSG
 DKTHTCPPELPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGS* (配列番号 201)

10

20

【0 4 2 8】

(2) B M A - m e d i u m - F c

【0 4 2 9】

30

40

50

【化 5 6】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGK
 APKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSL
 WVFSGGKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 GTFSSYAISWVRQAPGQGLEW**MGRIPILGIANYA**QKFQGRVTMTEDTSTDYAY
 MELSSLRSEDYAVYYCAT**DWLVGAD**WGQGTLLTVSSSGGGGSGGGGSSGSG
 GGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGK
 APKLLIYA**ASSLQ**SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY**CQSYSTPR**TF
 GQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSD**
DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGC**NDGVCYNGVFDY**WGQGTLLTVSSSGGGGGDSGGGGGS
 GGGGSSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (配列番号 202)

10

20

【0 4 3 0】

(3) B M A - l o n g - F c

【0 4 3 1】

30

40

50

【化 5 7】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGK
 APKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSL
 WVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 GTFSSYAISWVRQAPGQGLEW**MGRIPILGIANYA**QKFQGRVTMTEDTSTDYAY
 MELSSLRSEDYAVYYCAT**DLWGVGAD**WGQGTLLTVSSSGGGGSGGGGSSGSG
 GGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGK
 APKLLIYA**ASSLQSG**VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY**CQQSYSTPR**TF
 GQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSD**
DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGC**NDGVCYNGVFDY**WGQGTLLTVSSSGGGGGDSGGGGGS
 GSGSGSGSGGGSGGGGGSGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQV
 SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (配列番号 203)

10

20

【0 4 3 2】

(4) A L B - s h o r t - F c

【0 4 3 3】

30

40

50

【化 5 8】

GDEMGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP
 KLLIYAASS**LQSGVPSRFS**SGSGSGTDFTLTISS**LQPEDFATYYCQ**QSYSTPRTFGQ
 GTKVDIKEGKSSSGSGSESKASQVQLQESG**PGLVKPSQTL**SLTCTVSG**GSISSDDY**
 YWSWIRQTPGK**GLEWIGYIYYSGITYYN**PSLKS**RV**TISVDTSKNQFSLKLSSVTA
 ADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQ**GLVTVSSSGSGGGGSSGGGGSS**
 GGGGSSGGGGDGGGGSGGTQ**SALTQPASVSGSPG**QSITISCTGT**SSDVGGYKSVS** 10
 WYQQHPGKAPK**LMYDVSNRPSG**VSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
 S**SYTSSSSLWVFGGGTKLTVL**GEGKSSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSV
 KV**SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILG**IANYAQKFQGRVTMTE
 DTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ATDLWGVGAD**WGQ**GLVTVSSSGSGGGGD**
 GGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**SHE**
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD**WLNGKEYKC**
 KVS**NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKN**QVSLTCLVKGFYPSDI 20
 AVEWESNGQPENNYK**TPPVLDSDGSFFLY**SKLTVDKSRWQQGNV**FSCSVMHE**
 ALHNHYTQKSLSLSPGS* (配列番号 204)

【0 4 3 4】

(5) A L B - m e d i u m - F c

【0 4 3 5】

10

20

30

40

50

【化 5 9】

GDEMGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLNWYQQKPGKAP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPR**TFGQ**
 GTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSDDY**
YWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
 ADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGT**LVTVSSSGSGGGGSSGGGGSS**
 GGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS** 10
 WYQQHPGKAP**KLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**
SSYTSSSSLWVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSV
 KV**SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILG**IANYAQKFQGRVTMT
 EDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT**DLWGVGAD**WGQGT**LVTVSSSGSGGGG**
 DSGGGGSGGGGSSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLN**NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQV** 20
 SLTCLVKG**FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW**
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (配列番号 205)

【0 4 3 6】

(6) A L B - l o n g - F c

【0 4 3 7】

10

20

30

40

50

【化 6 0】

GDEMGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRAS**Q**SISSYLNWYQQKPGKAP
 KLLIYAASSL**Q**SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**Q**QSYSTPRTFGQ
 GTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG**S**ISSDDY
 YWSWIRQTPGKGLEWIGYIYY**S**GITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
 ADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSSSGSGGGGSSGGGGG
 GGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD**V**GGYKSVS 10
 WYQQHPGKAPKLM**I**YDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
 S**S**YTS**S**SSLWVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSV
 KVSCKASG**G**TFSSYAISWVRQAPGQGLEW**M**GRIIPILGIANYAQKFQGRVTMT
 EDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT**D**LW**V**G**A**DWGQGTLVTVSSSGSGGGG
 DSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 20
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (配列番号 206)

【0 4 3 8】

(7) B M A - ' s h o r t (H i s) ' - A L B

【0 4 3 9】

10

20

30

40

50

【化 6 1】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS**SDVGGYKSV**SWYQQHPGK
 APK**LMYDVS**NRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL**
 WVF**GGG**TKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV**SCKASG**
GFSSYAISWVRQAPGQGLEW**MGRIPILG**IANYAQKFQGRVTMTEDTSTD**TA**
 Y**MELSSL**RSEDTAVYYC**ATDLWGVGAD**WGQGT**LVTVSSSGGGGSGGGGSSGS**
 GGGGDGGGGSGGTD**IQMTQSPSSLSAS**VGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG
 KAP**KLLIYA**A**SSLQ**SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS**LQPEDFATYYCQ**QSY**STPRT**
 FGQGT**KVDIKEG**KSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSD**
DYYWSWIRQTPGK**GLEWIGYIY**SGITYYNPSL**KSRVTIS**VDT**SKNQFSLKLSSV**
 TAADTAVYYC**CAREGCNDGVCYNGV**FDYWGQGT**LVTVSSGGHHHHHHHHGG**
 GTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP**KLLIYA**A**SS**
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS**LQPEDFATYYCQ**QSY**STPRT**FGQGT**KVDIKEG**
 KSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTL**SLTCTVSGGSISSD****DYYWS**WIRQTP
 GK**GLEWIGYIY**SGITYYNPSL**KSRVTIS**VDT**SKNQFSLKLSSV**TAADTAVYYC**A**
REGCNDGVCYNGVFDYWGQGT**LVTVSSSGGGGGGGSSGGGGSSGGGG**
 DGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS**SDVGGYKSV**SWYQQHPG**KA**
 PK**LMYDVS**NRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSLW**
 VF**GGG**TKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV**SCKASGGT**
FSSYAISWVRQAPGQGLEW**MGRIPILG**IANYAQKFQGRVTMTEDTSTD**TAYM**
 EL**SSLR**SEDTAVYYC**ATDLWGVGAD**WGQGT**LVTVSS*** (配列番号 207)

10

20

30

【 0 4 4 0 】

(8) B M A - ' m e d i u m (H i s) ' - A L B

【 0 4 4 1 】

40

50

【化 6 2】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGK
 APKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSL
 WVFGGGKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASG
 GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTA
 YMELSSLRSEDТАVYYCATDLWGVGADWGQGTЛTVSSSGGGGSGGGGSSGS
 GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRT
 FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLCTVSGGSISSD
 DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTЛTVSSSGGGGSHHHHHHH
 HSGGGGSGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL
 LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGT
 KVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLCTVSGGSISSDDYYW
 SWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD
 TAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTЛTVSSSGGSGGGGSSGGGGSGG
 GGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSW
 YQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS
 SYTSSSSLWVFGGGKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVK
 VSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMT
 EDTSTDTAYMELSSLRSEDТАVYYCATDLWGVGADWGQGTЛTVSS* (配列
 番号 208)

10

20

30

【0 4 4 2】

(9) BMA - 'long(His)' - ALB

【0 4 4 3】

40

50

【化 6 3】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGK
 APKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSL
 WVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD
 TAYMELSSLRSED
 TAVYYCATDLWGVGADWGQGT
 LVTVSSSGGGGSGGGGSSGS
 GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRT
 FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSD
 DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGT
 LVTVSSSGGGGSGGHHHHH
 HHHGGSGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRT
 FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSD
 DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGT
 LVTVSSSGGGSGGGGSSGGG
 GSGGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKS
 VSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY
 YCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGS
 SVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVT
 MTEDTSTD
 TAYMELSSLRSED
 TAVYYCATDLWGVGADWGQGT
 LVTVSS* (配列
 番号 209)

10

20

30

【 0 4 4 4】

(1 0) B M A - ' s h o r t (H i s) ' - A M B

【 0 4 4 5】

40

50

【化 6 4】

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGK
 APKLMYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSL
 WVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD
 TAYMELSSLRSED
 TAVYYCATDLWGVGADWGQGLTVTVSSSGGGGSGGGGSSGS
 GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRT
 FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSD
 DYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
 TAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGLTVTVSSGGHHHHHHHHGG
 GTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS
 LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVDIKEG
 KSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTP
 GKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
 REGCNDGVCYNGVFDYWGQGLTVTVSSSGGGGSGGGGSGGGGDGGGGSSG
 TQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMYDVS
 NRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKL
 TVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISW
 VRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD
 TAYMELSSLRSED
 TAVYYCATDLWGVGADWGQGLTVTVSS* (配列番号 210)

10

20

30

【0 4 4 6】

参考文献

【0 4 4 7】

40

50

【表 8 - 1】

1. Agarwal, S., et al. Strategic Targeting of Multiple BMP Receptors Prevents Trauma-Induced Heterotopic Ossification. *Mol Ther* 25, 1974-1987 (2017).
2. Dey, D., Goldhamer, D.J. & Yu, P.B. Contributions of Muscle-Resident Progenitor Cells to Homeostasis and Disease. *Curr Mol Bio Rep*, 1-14 (2015).
3. Dey, D., et al. Two tissue-resident progenitor lineages drive distinct phenotypes of heterotopic ossification. *Sci Transl Med* 8, 366ra163 (2016).
4. Shen, H., Gelberman, R.H., Silva, M.J., Sakiyama-Elbert, S.E. & Thomopoulos, S. BMP12 induces tenogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *PLoS One* 8, e77613 (2013). 10
5. Lin, S., Svoboda, K.K., Feng, J.Q. & Jiang, X. The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. *Bone Res* 4, 16005 (2016).
6. David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.J. & Bailly, S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109, 1953-1961 (2007).
7. Long, L., et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nature medicine* 21, 777-785 (2015). 20
8. Dinter, T., Bocobo, G.A. & Yu, P.B. Pharmacologic Strategies for Assaying BMP Signaling Function. *Methods Mol Biol* 1891, 221-233 (2019).
9. Choi, E.J., et al. Enhanced responses to angiogenic cues underlie the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *PLoS One* 8, e63138 (2013).
10. Luu, H.H., et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25, 665-677 (2007). 30
11. Leblanc, E., et al. BMP9-Induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *J Bone Miner Res* (2010).
12. Luo, J., et al. TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 285, 29588-29598 (2010).
13. Salingcarnboriboon, R., et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287, 289-300 (2003). 40

【 0 4 4 8 】

【表 8 - 2】

- 14. Lejard, V., et al. Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. J Biol Chem 282, 17665-17675 (2007).
- 15. Berasi, S.P., et al. Divergent activities of osteogenic BMP2, and tenogenic BMP12 and BMP13 independent of receptor binding affinities. Growth Factors 29, 128-139 (2011).
- 16. Andersson, O., Korach-Andre, M., Reissmann, E., Ibanez, C.F. & Bertolino, P. Growth/differentiation factor 3 signals through ALK7 and regulates accumulation of adipose tissue and diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 7252-7256 (2008).

10

【0449】

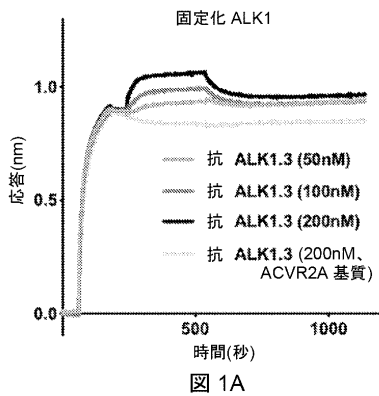
他の実施形態

本発明は、その詳細な記載と合わせて記載されている一方、前述の記載は、説明することを意図しており、添付の特許請求の範囲によって定義される、本発明の範囲を制限しないことは理解されるべきである。他の態様、利点、および修飾は、以下の請求の範囲内にある。

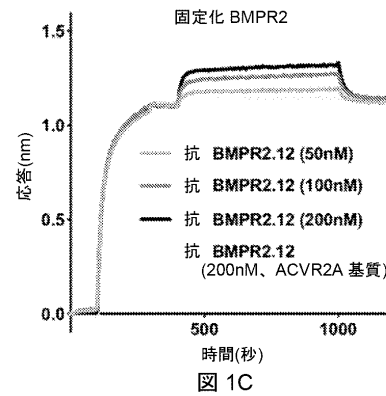
20

【図面】

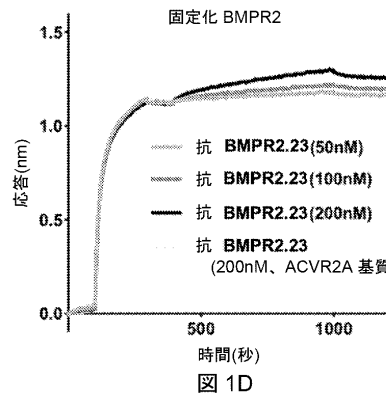
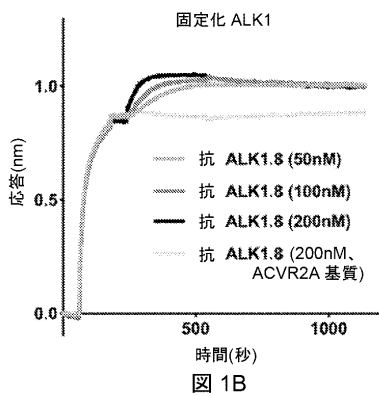
【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



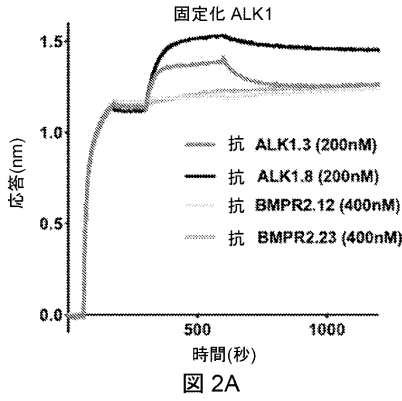
30



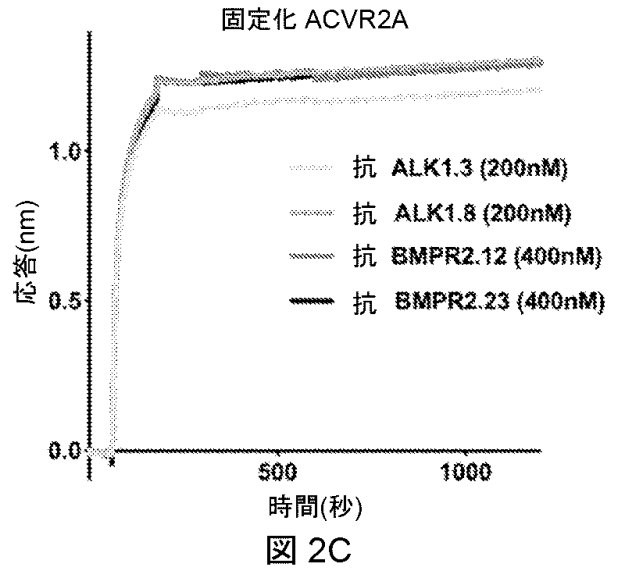
40

50

【 図 2 - 1 】

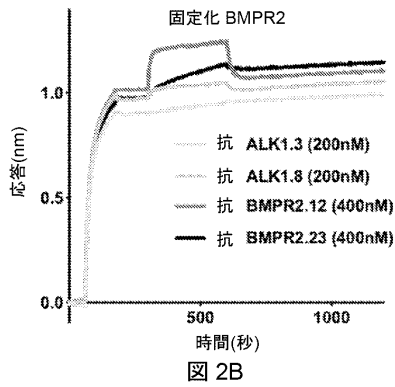


【 図 2 - 2 】

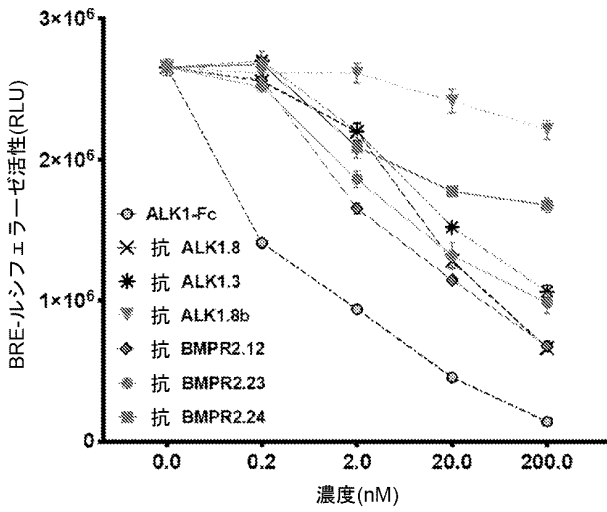


10

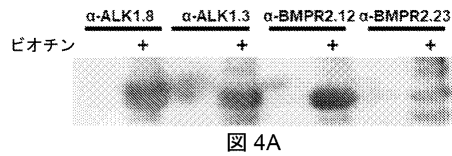
20



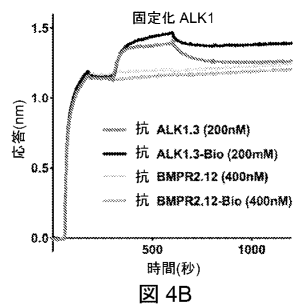
【 図 3 】



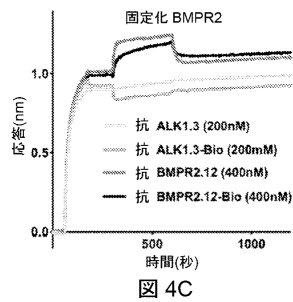
【 図 4 - 1 】



30



40



50

【 図 7 - 2 】

図 7、続き

(VH-リカ- -VH)	Chothia	Abm	Kabat	IMGT
重鎖 CDR1	GYNFAGY---	GYNFAGYVH	---GYYVH	GYNFAGY--
重鎖 CDR2	NPNSSG--	WINPNSGGTD-	WINPNSGGTDYAQK	INPNSGGT---
重鎖 CDR3	---NLQF	---NLQF	---NLQF	ARNLQF
軽鎖 CDR1	RASQSVSNL	RASQSVSNLA	RASQSVSNLA--	---QSVSN--
軽鎖 CDR2	---GASSRAT	---GASSRAT	---GASSRAT	---GA----
軽鎖 CDR3	QQYIYSPYT	QQYIYSPYT	QQYIYSPY-	QQYIYSPYT

重鎖:
EVQLVDSGAEVKKPGASVKYSCKASGYNFAGYVHWRQAPGGLEWVWGWINPNSGGTDYAQKFGQGRVTMTTRDTSISAVMDSLRL
RSDDITAVYCARNLQFRFGTLTVSS

軽鎖:
EIVMTQSPATLSVPERATLSCRASQSVSNLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLISRLEPEDFAVYYCCQYY
SPYTFGGGTKVDIK

【 図 7 - 3 】

図 7、続き

(VL-リカ- -VH)	Chothia	Abm	Kabat	IMGT
重鎖 CDR1	Y---	YWG	---SSYYWG	SSSSYYWG
重鎖 CDR2	YSSG---	SIYSSGTY	SIYSSGTYNP	WTGSIYSSGTY
重鎖 CDR3	---NLQF	---NLQF	---NLQF	---NLQF
軽鎖 CDR1	QVGFVLS	QVGFVLS	QVGFVLS	ARQVGFVLS
軽鎖 CDR2	GGNIIGSK	GGNIIGSKN	GGNIIGSKNVH-	---NIGSKN--
軽鎖 CDR3	DDSDRPS	DDSDRPS	DDSDRPS	---DD----

重鎖:
QVQLQESGPGLVKPSQTLISLCTVSGSGISSYWGWIROPKGLWIGSIYSSGTYNPISLKRATISVDTSKNQFSLK
MTSVAADTAIYCARQVGPVLSVSGQTLTVTS

軽鎖:
SYELTQPLSVSLGQARITCGGNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLYVDDSDRPSGTSERFSGSNNGNTATLISGTOAM
DEADYCAAWDDSLNGVVFGGGTKVTLVIG

【 図 7 - 4 】

図 7、続き

(VH-リカ- -VH)	Chothia	Abm	Kabat	Contact	IMGT
重鎖 CDR1	GFTFSSY-	GFTFSSYAM	---SYAMS	---SSYAMS	GFTFSSYA-
重鎖 CDR2	SGSGS--	AISGGSGST	AISGGSGTYA	WVSAISGGSGS	ISGGSGST-
重鎖 CDR3	---SASFFDY	---SASFFDY	---SASFFDY	AKSASFFD-	AKSASFFDY
軽鎖 CDR1	RASQSVSS	RASQSVSS	RASQSVSSYLA	---SSYLA	QSVSSY--
軽鎖 CDR2	---GASSRAT	---GASSRAT	---GASSRAT	LLIYGASSRA-	---GA----
軽鎖 CDR3	QQHFRWEPW	QQHFRWEPW	QQHFRWEPW	QQHFRWEPW-	QQHFRWEPWT

重鎖:
EVQLLEGGGLVQPGGSLRLCAASGFTFSSYAMSWWRQAPGKGLWVWVAISGGSGTYAVDSVKGRTISRDNKNT
LYLQMNLSRAEDTAIYCARQVAKSASFFDYWGQGLTVSS

軽鎖:
EIVLTQSPGTLISLPERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLISRLEPE
DFAVYYCQHFRWEPWTFGGGTKVEIK

【 図 7 - 5 】

図 7、続き

(VH-リカ- -VH)	Chothia	Abm	Kabat	Contact	IMGT
重鎖 CDR1	GASISGGY	GASISGGYWS	---SGGYWS	---SSGGYWS	GASISGGYY
重鎖 CDR2	YSSG---	YSYSSGTY-	YSYSSGTYNP	WIGYSYSSGTY	SYSSGST---
重鎖 CDR3	---GGVRFDL	---GGVRFDL	---GGVRFDL	ARGGVRFDL	ARGGVRFDL
軽鎖 CDR1	SGSSNIGS	SGSSNIGSN	SGSSNIGSNTV	---SSNIGSNTV	---SSNIGSNTV
軽鎖 CDR2	SNNORPS	SNNORPS	SNNORPS	LLIYNNORP-	---SN----
軽鎖 CDR3	AAWDDSLNGV	AAWDDSLNGV	AAWDDSLNGV	AAWDDSLNGV-	AAWDDSLNGV

重鎖:
QVQLQESGPGLVKPSQTLISLCTVSGASISGGYWSWIROPKGLWIGYSYSSGTYNPISLKRATISVDTSKNQFSLYL
SVTAADTAIYHRCARGGVRFDLWGQGLTVSS

軽鎖:
SYELTQPPASGTPGOKYTICSGSSNIGSNTVWYQQKPGQAPVLYVDDSDRPSGTSERFSGSNNGNTATLISGTOAM
DYCAAWDDSLNGVVFGGGTKVTLVIG

【 図 7 - 6 】

図 7、続き

クローン RI-2-7 (抗 ALK2 (ACVR1))					
(VL-リカ- VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重鎖 CDR1	GFTFSY---	GFTFSYAMS	----SYAMS	----SSYAMS	GFTFSYA--
重鎖 CDR2	----SGSGS--	---AISGSGGTY-	AISGSGGTYADS	WWSAISGSGGTY-	----ISGSGGT---
重鎖 CDR3	IPWGDYDFW SGYTRPGHGS GMDV	IPWGDYDFWS GYTRPGHSG MDV	TRPGHSGMDV	AKIPWGDYDFWS GYTRPGHSGMD-	AKIPWGDYDF WSGYTRPGHGS GMDV
軽鎖 CDR1	SGDALPKKYA-	SGDALPKKYA-	SGDALPKKYA-	----KKYAVWY	---ALPKY----
軽鎖 CDR2	Y--	---	---	----EDSKRPS-	---ED----
軽鎖 CDR3	YSTDSSGNPV	YSTDSSGNPV	YSTDSSGNPV	YSTDSSGNPV-	YSTDSSGNPV
重鎖: EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSVWRQAPGKLEWWSAISGSGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ					
軽鎖: MNSLRAEDTAVYYCAKIPWGDYDFWSGYTRPGHSGMDVWGGGTLTVSS					
SYELTQPPSVSPGQRTARITCSGDALPKKYAWYQQKSGQAPLVLYVEDSKRPSGIPERFSGSSGTMATLTVSGAQVEDEAD YYCYTSDSSGNPVFGGGLKTLTVLG					

【 図 7 - 7 】

図 7、続き

クローン RI-9 (抗 ALK2 (ACVR1))					
(VL-リカ- VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重鎖 CDR1	GFTFRAY---	GFTFRAYPMS	----AYPMS	----RAYPMS	GFTFRAYP---
重鎖 CDR2	----TSSG--	SITSSGSY---	SITSSGSYADS	WYSSITSSGSY--	----ITSSGS-
重鎖 CDR3	---VGYTDFD-	---VGYTDFD-	---VGYTDFD-	ARVGYTDFD-	ARVGYTDFD-
軽鎖 CDR1	AGSSSNIGAGY DVH--	AGSSSNIGAGY DVH--	AGSSSNIGAGY VH--	IGAGYDVHY	--- SSNIGAGYD-- ---
軽鎖 CDR2	----DSSNRPS	----DSSNRPS	----DSSNRPS	LLIFDSSNRP-	---DS----
軽鎖 CDR3	QSYDFRLSGM	QSYDFRLSGM	QSYDFRLSGM	QSYDFRLSGM-	QSYDFRLSGM
重鎖: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRAYPMSVWRQAPGKLEWWSITSSGSYADSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNLSL					
軽鎖: RAEDTAVYYCARVGYTDFDVFVWGGGTLTVSS					
QAVLTQPPSVSPGQRTVISCAGSSNIGAGYDVHYYQQKPGTAPKLLIFDSSNRPSGVPDRFSGSKGTSASLAIITGLQAEDE ADYYCYSDYFRLSGMVFVGGGTLTVLG					

【 図 7 - 8 】

図 7、続き

クローン RI-19 (抗 ACTRIA (ACVR2A))					
重鎖 CDR1	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重鎖 CDR1	GFTFSY---	GFTFSYAMS	----SYAMS	----SSYAMS	GFTFSYA--
重鎖 CDR2	----SGSGS--	AISGSGGTY---	AISGSGGTYADS	WWSAISGSGGTY-	----ISGSGGT---
重鎖 CDR3	SIRTGSYFDY	SIRTGSYFDY	--SIRTGSYFDY	AKSIRTGSYFD-	AKSIRTGSYFD
軽鎖 CDR1	SGSSNIGTNY	SGSSNIGTNY	SGSSNIGTNYVY--	----IGTNYVYVY	Y --SSNIGTNY----
軽鎖 CDR2	YV--	YV--	YV--	LLIYRNNQRP-	---RN----
軽鎖 CDR3	AAWDDSLG	AAWDDSLG	AAWDDSLG	AAWDDSLG	AAWDDSLG
重鎖: EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSVWRQAPGKLEWWSAISGSGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL					
軽鎖: RAEDTAVYYCAKIRTSYFDYVWGGGTLTVSS					
QSVLTQPPSVSPGQRTVISCAGSSNIGTNYVYVYQQKPGTAPKLLIYRNNQRPSPDRFSGSKGTSASLAI5GLRSEADYY CAAWDDSLGWFVGGGTVLVLG					

【 図 7 - 9 】

図 7、続き

クローン H1-2 (抗 IGF1R (ACVR2A))					
重鎖 CDR1	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重鎖 CDR1	GYFTFSY---	GYFTFSYMH	----SYMH	----TSYMH	GYFTFSY--
重鎖 CDR2	----NPSGS--	---INPSGGTS---	WMGIINPSGGST	WMGIINPSGGSTS	----INPSGGT---
重鎖 CDR3	DLLLYGRGG FQH	DLLLYGRGGFQ H	DLLLYGRGGFQ H	ARDLLLYGRGGF Q-	ARDLLYGRGG GFQH
軽鎖 CDR1	SGSSNIGSNY	SGSSNIGSNVY	SGSSNIGSNVY	----IGSNVYVY	---SSNIGSNY----
軽鎖 CDR2	YV--	YV--	YV--	LLIYRNNQRP-	---RN----
軽鎖 CDR3	AAWDDSLG	AAWDDSLG	AAWDDSLG	AAWDDSLG	AAWDDSLG
重鎖: QVQLQSGAEVKKPGASVKASGTYFTFSYMHVWRQAPGQGLEWVWGIINPSGGSTYAKQFQGRVMTTRDTSTVYME					
軽鎖: LSSLRAEDTAVYYCARDLLYGRGGFQHWGGGTLTVSS					
QSVLTQPPSVSPGQRTVISCAGSSNIGSNVYVYVYQQKPGTAPKLLIYRNNQRPSPDRFSGSKGTSASLAI5GLRSEAD YYCAAWDDSLGWFVGGGTLTVLG					

10

20

30

40

50

【 図 100 - 1 】

IgG Fc4 価の分子

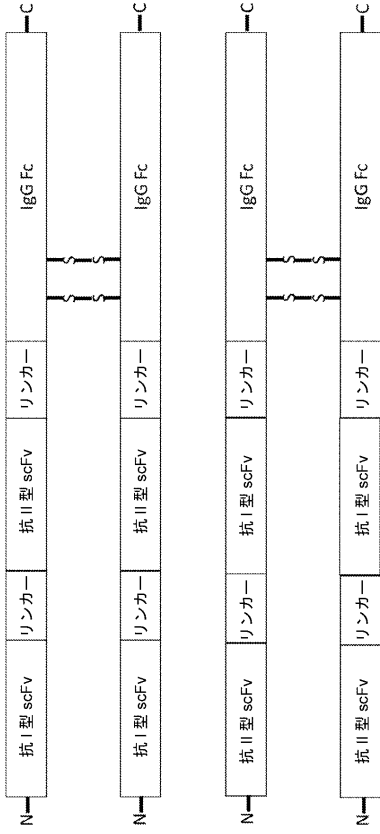


図 10A

【 図 100 - 2 】

IgG Fc4 価の分子

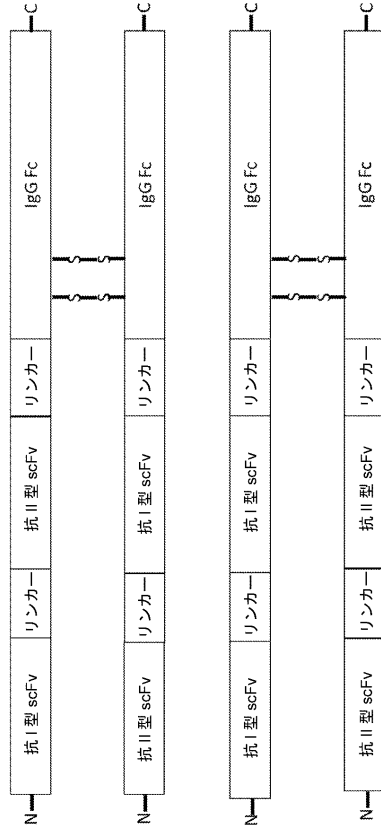


図 10B

【 図 100 - 3 】

IgG Fc 多価の分子

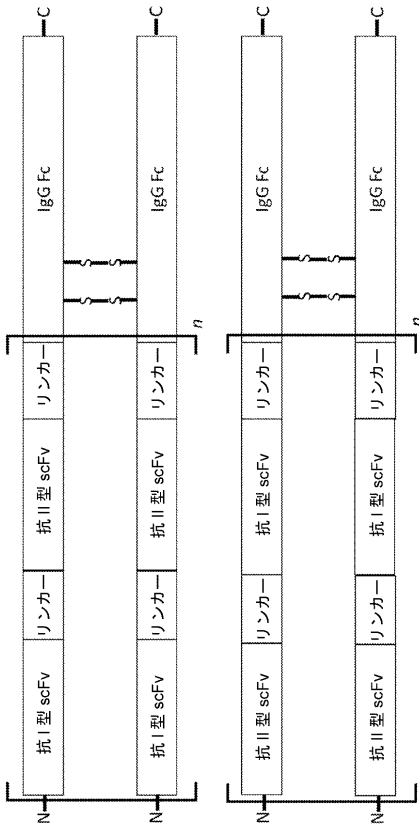


図 10C

【 図 100 - 4 】

IgG Fc4 価の分子

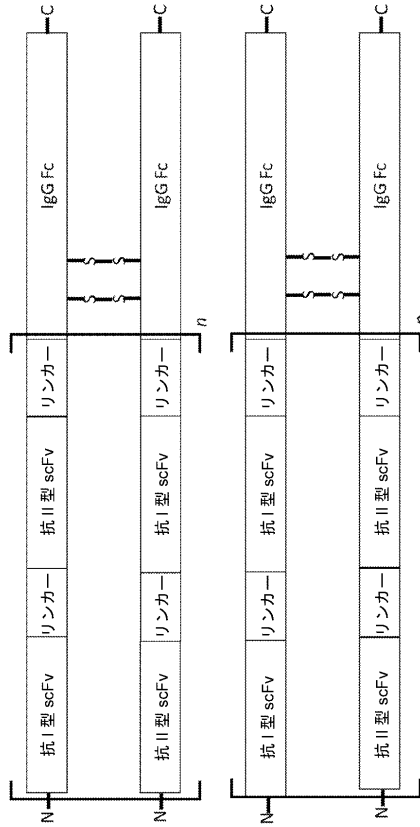


図 10D

【 図 10 - 5 】

単鎖の4価および多価の分子

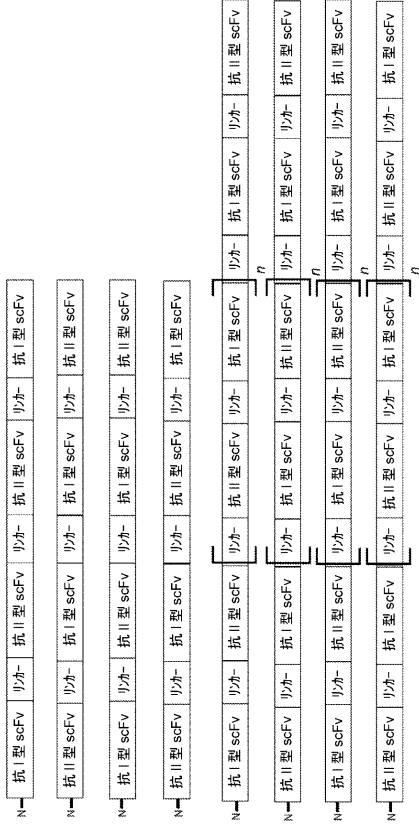


図 10E

【 図 10 - 6 】

単鎖の4価および多価のIgG Fc融合分子

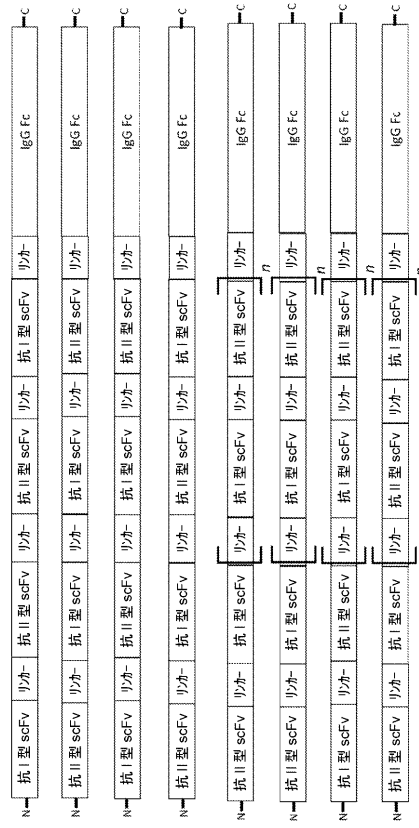


図 10F

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/020291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/28 (2021.01)
 CPC - A61K 2039/505; C07K 16/2863; C07K 2317/31; C07K 2317/75 (2021.05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2019/086331 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 09 May 2019 (09.05.2019) entire document	1-4, 10, 15, 24-27, 29, 30 5, 7, 9, 11, 14, 31, 32
X -- Y	US 2013/0089560 A1 (CHARTIER-COURTAUD et al) 11 April 2013 (11.04.2013) entire document	1, 3, 6, 8, 10 12, 13
X	US 2018/0118835 A1 (SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY et al) 03 May 2018 (03.05.2018) entire document	16
X	US 2011/0182904 A1 (ZIMMERMAN et al) 28 July 2011 (28.07.2011) entire document	17, 19
X -- Y	US 2012/0201746 A1 (LIU et al) 09 August 2012 (09.08.2012) entire document	18 31
X -- Y	US 2018/0022813 A1 (GENENTECH, INC.) 25 January 2018 (25.01.2018) entire document	20 9
X -- Y	US 2014/0294841 A1 (SCHEINBERG et al) 02 October 2014 (02.10.2014) entire document	21-23 11-13

20

30

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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent 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

40

Date of the actual completion of the international search 02 June 2021	Date of mailing of the international search report JUL 01 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/020291

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 2017/0313786 A1 (ABBVIE INC.) 02 November 2017 (02.11.2017) entire document	5, 7
Y	US 20140/364340 A1 (ADIMAB, LLC) 11 December 2014 (11.12.2014) entire document	14
Y	US 2017/0218091 A1 (ABBVIE INC.) 03 August 2017 (03.08.2017) entire document	32

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/020291

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, and 212 were searched.

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/020291

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 47/68	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 4 , ボストン , コーズウェイ ストリート 2 3 4
1 0 1 2

(72)発明者 トロンコーネ, ルカ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 6 , ブルックライン, モンマス ストリート 1 0 1
3 0 5

(72)発明者 キム, ステファニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 6 , ブルックライン, モンマス ストリート 1 0 1
3 0 5

F ターム (参考) 4B065 AB01 AC14 BA01 CA25 CA44
4C076 AA95 CC11 CC16 CC41 EE41 EE59
4C085 AA13 AA14 BB44 CC22 CC23 EE01 GG02 GG04 GG05 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 EA20 EA23 EA28
FA74