明　細　書

発明の名称 ： ＣＤＲ改変抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体

技術分野

[0001] 本発明は、骨代謝異常の治療及び／又は予防薬として有用な物質、並びに骨代謝異常の治療及び／又は予防方法に関する。

背景技術

[0002] 骨は、自らの形態変化や血中カルシウム濃度の維持のために、常に形成と吸収を繰り返して再構築を行う動的な器官として知られている。正常な骨では骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収とは平衡関係にあり、骨量は一定に保たれている。一方、骨形成と骨吸収との平衡関係が崩れると、骨粗鬆症などの骨代謝異常になる（例えば、非特許文献１及び２を参照）。

[0003] 骨代謝を調節する因子としては、全身性のホルモンや局所性のサイトカインが数多く報告されており、それらの因子の共同作用により骨の形成と維持が営まれている（例えば、非特許文献１及び３を参照）。加齢による骨組織の変化としては、骨粗鬆症の発症が広く知られているが、その発症機構は性ホルモンの分泌低下やそのレセプター異常、骨局所におけるサイトカイン発現の変動、老化遺伝子の発現、破骨細胞や骨芽細胞の分化あるいは機能不全など多岐にわたっており、加齢による単純な生理現象として理解するのは困難である。原発性骨粗鬆症はエストロゲンの分泌低下による閉経後骨粗鬆症と加齢による老人性骨粗鬆症に大別されているが、その発症機構の解明と治療薬開発の為には、骨吸収と骨形成の調節機構についての基礎的研究の進展が必須である。

[0004] 破骨細胞は、造血幹細胞に由来する多核の細胞であり、骨との接着面に塩素イオンと水素イオンを放出することによって、細胞と骨の接着面の間隙を酸性化すると共に酸性プロテアーゼであるカテプシンＫなどを分泌する（例えば、非特許文献４を参照）。この結果、リン酸カルシウムの分解、酸性プロテアーゼの活性化と骨基質蛋白質の分解が引き起こされ、骨吸収が進行す

る。

[0005] 破骨細胞の前駆細胞は骨表面の骨芽細胞／ストローマ細胞の細胞膜上に発現するＲＡＮＫＬ（Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ＮＦ－κＢ ｌｉｇａｎｄ）の刺激を受けて、破骨細胞へ分化することが明らかにされた（例えば、非特許文献５及び６を参照）。ＲＡＮＫＬは骨芽細胞／ストローマ細胞が産生する膜蛋白質であり、その発現は骨吸収因子により調節されること、及びＲＡＮＫＬは破骨細胞前駆細胞から成熟多核破骨細胞への分化を誘導することなどが明らかにされた（例えば、非特許文献５及び７を参照）。さらに、ＲＡＮＫＬをノックアウトしたマウスが、大理石骨病様の病態を発症することが見出され、ＲＡＮＫＬが生理的な破骨細胞分化誘導因子であることが証明された（例えば、非特許文献８を参照）。

[0006] 骨代謝疾患の治療や治療期間の短縮を図る医薬品として、ビスホスホネート、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｓｔｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、ＰＴＨ及びカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらの薬剤は、治療結果において必ずしも満足できるものではなく、より治療効果の高い薬剤の開発が望まれていた。

[0007] 免疫系細胞の細胞膜上はシアル酸含有糖鎖などの多様な糖鎖によって高度に覆われており、様々な糖鎖結合蛋白質によって認識されている。シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン（Ｓｉａｌｉｃ－ａｃｉｄ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｌｅｃｔｉｎｓ、以下、「Ｓｉｇｌｅｃｓ」という。）は、シアル酸含有糖鎖を認識して結合するＩ型膜蛋白質ファミリーである。Ｓｉｇｌｅｃｓは免疫系細胞の細胞膜上で多く発現しており、同じく免疫系細胞の細胞膜上に存在するシアル酸を認識して細胞間相互作用や細胞機能を調節し、免疫応答に関与していると考えられている（例えば、非特許文献９を参照）が、生理的機能が明らかとなっていないＳｉｇｌｅｃｓ分子も多い。Ｓｉｇｌｅｃ－１５（Ｓｉａｌｉｃ－ａｃｉｄ

ｂｉｎｄｉｎｇ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｌｅｃｔｉｎ １５）は、Ｓｉｇｌｅｃｓに属することが新たに報告された分子で（例えば、非特許文献１０を参照）、ＣＤ３３Ｌ３（ＣＤ３３ ｍｏｌｅｃｕｌｅ－ｌｉｋｅ ３）と呼ばれる分子と同一である。この分子は魚類からヒトまで進化的な保存度が高く、ヒト脾臓及びリンパ節において、樹状細胞／マクロファージ系の細胞に強く発現することが明らかにされた。またシアル酸プローブを用いた結合試験の結果、ヒトＳｉｇｌｅｃ－１５はＮｅｕ５Ａｃα２－６ＧａｌＮＡｃと、マウスＳｉｇｌｅｃ－１５はさらにＮｅｕ５Ａｃα２－３Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃと結合することなども明らかにされた（例えば、非特許文献１０を参照）。最近まで、Ｓｉｇｌｅｃ－１５の生理的役割は明らかではなかったが、破骨細胞の分化、成熟に伴ってＳｉｇｌｅｃ－１５の発現が亢進し、ＲＮＡ干渉によってＳｉｇｌｅｃ－１５の発現を低下させると破骨細胞の分化が抑制されることが報告された（例えば、特許文献１を参照）。さらに、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体が破骨細胞分化におよぼす作用について、特許文献２（２００９年４月１６日公開）及び特許文献３（２０１０年１０月１４日公開）において初めて明らかにされた。さらに特許文献４においても破骨細胞の分化を抑制する抗体が開示されたが、より強力な作用を示す抗体の探索が続けられている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第ＷＯ０７／０９３０４２号パンフレット

特許文献2：国際公開第ＷＯ０９／０４８０７２号パンフレット

特許文献3：国際公開第ＷＯ１０／１１７０１１号パンフレット

特許文献4：国際公開第ＷＯ１１／０４１８９４号パンフレット

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ，（１９９２）１３，ｐ６６－８０

非特許文献2：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｂｏｎｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ，

Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, (１９９６) ｐ８７－１０２

非特許文献3：Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ, (１９９６) １７, ｐ３０８－３３２

非特許文献4：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ, (１９９１) ２６０, Ｃ１３１５－Ｃ１３２４

非特許文献5：Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ, (１９９８) ９５, ｐ３５９７－３６０２、

非特許文献6：Ｃｅｌｌ, (１９９８) ９３, ｐ１６５－１７６

非特許文献7：Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｍｉｎｅｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ, (１９９８) ２３, Ｓ２２２

非特許文献8：Ｎａｔｕｒｅ, (１９９９) ３９７, ｐ３１５－３２３

非特許文献9：Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ, (２００７) ７, ｐ２５５－２６６

非特許文献10：Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ, (２００７) １７, ｐ８３８－８４６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の目的は、骨粗鬆症、関節リウマチ、癌の骨転移等に見られる種々の骨代謝異常の際に特異的に発現する遺伝子、破骨細胞の分化成熟と活性を阻害する物質、及び骨代謝異常の治療及び／又は予防剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、骨代謝異常の治療及び／又は予防効果を有する物質を探索する目的で、破骨細胞の分化、成熟及び活性化の機構（メカニズム）の解明を目指した研究を行った結果、破骨細胞の分化、成熟に伴いＳｉｇｌｅｃ－

１５遺伝子の発現が上昇することを見出した。また、本発明者らは、Ｓｉｇｌｅｃ－１５と特異的に結合する抗体により、破骨細胞の分化が抑制されることを見出した。さらに発明者らは、得られたラット抗マウスＳｉｇｌｅｃ－１５抗体をヒト化し、さらに当該ヒト化抗体のＣＤＲを改変して本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

[0012]

（１）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号９に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする抗体又は該抗体の抗原結合断片。

（２）配列番号６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３３番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

（３）配列番号６に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３８番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

（４）配列番号６に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３８番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

（５）Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される、（１）又は（２）に記載の抗体の抗原結合断片。

（６）ｓｃＦｖであることを特徴とする、（１）又は（２）に記載の抗体。

（７）（１）乃至（６）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

（８）骨代謝異常の治療及び／又は予防剤であることを特徴とする、（７）に記載の医薬組成物。

（９）（１）乃至（６）に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ビスホスホネート、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｓｔｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、カルシウム製剤、ＰＴＨ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ）、非ステロイド性抗炎症剤、可溶性ＴＮＦレセプター、抗ＴＮＦα抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＰＴＨｒＰ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ）抗体又は該抗体の抗原結合断片、ＩＬ－１レセプターアンタゴニスト、抗ＩＬ－６レセプター抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＲＡＮＫＬ抗体又は該抗体の抗原結合断片、及びＯＣＩＦ（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ）からなる群から選択される少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、骨代謝異常の治療及び／又は予防用医薬組成物。

（１０）骨代謝異常が、骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、癌性高カルシウム血症、多発性骨髄腫や癌の骨転移に伴う骨破壊、巨細胞腫、骨減少症、歯根膜炎による歯の喪失、人工関節周囲の骨融解、慢性骨髄炎における骨破壊、骨ページェット病、腎性骨異栄養症、及び骨形成不全症からなる群から選択される、（８）又は（９）に記載の医薬組成物。

（１１）骨代謝異常が、骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、又は癌の骨転移に伴う骨破壊であることを特徴とする、（１０）に記載の医薬組成物。

（１２）骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、（１１）に記載の医薬組成物。

（１３）骨粗鬆症が、閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイドや免疫抑制剤等の治療用薬剤の使用による続発性骨粗鬆症、又は関節リウマチに伴う骨粗鬆症であることを特徴とする（１２）に記載の医薬組成物。

（１４）（１）乃至（６）に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は（８）若しくは（９）に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つを投与することを特徴とする、骨代謝異常の治療及び／又は予防方法。

（１５）（１）乃至（６）に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は（８）に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つ、並びに、ビスホスホネート、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｓｔｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、カルシウム製剤、ＰＴＨ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ）、非ステロイド性抗炎症剤、可溶性ＴＮＦレセプター、抗ＴＮＦα抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＰＴＨｒＰ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ）抗体又は該抗体の抗原結合断片、ＩＬ－１レセプターアンタゴニスト、抗ＩＬ－６レセプター抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＲＡＮＫＬ抗体又は該抗体の抗原結合断片、及びＯＣＩＦ（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ）からなる群から選択される少なくともいずれか一つを同時又は連続して投与することを特徴とする、骨代謝異常の治療及び／又は予防方法。

（１６）骨代謝異常が、骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、又は癌の骨転移に伴う骨破壊であることを特徴とする（１４）又は（１５）に記載の治療及び／又は予防方法。

（１７）骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、（１６）に記載の治療及び／又は予防方法。

（１８）骨粗鬆症が、閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイドや免疫抑制剤等の治療用薬剤の使用による続発性骨粗鬆症、又は関節リウマチに伴う骨粗鬆症であることを特徴とする（１７）に記載の治療及び／又は予防方法。

（１９）（１）乃至（６）のいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

（２０）配列番号５に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号３に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（１９）に記載のポリヌクレオチド。

（２１）配列番号５に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１３９８番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号３に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする（１９）に記載のポリヌクレオチド。

（２２）（１９）乃至（２１）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

（２３）（１９）乃至（２１）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

（２４）（２２）に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

（２５）（２３）又は（２４）に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む（１）乃至（６）のいずれか一つに記載の抗体の生産方法。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、破骨細胞の分化成熟、及び骨吸収活性の阻害を作用機序とする、骨代謝異常の治療剤及び／又は予防剤を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0014]

[図1]Ｋ３－１１１５抗体重鎖のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図2]Ｋ３－１１１５抗体軽鎖のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。

[図3]Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体重鎖のヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示した図である。なお、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３抗体の軽鎖は、Ｋ３－１１１５抗体の軽鎖と共通である。

[図4]＃３２Ａ１抗体及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の各ＣＤＲのアミノ酸配列を示した図である。

[図5]Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の添加による、正常ヒト破骨細胞の骨吸収活性の抑制を示したグラフである（Ｎ＝６）。

発明を実施するための形態

[0015] 本明細書中において、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びｃＲＮＡも含まれるものとする。

[0016] 本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。

[0017] 本明細中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

[0018] 本明細書中において、「ＲＮＡ画分」とは、ＲＮＡを含んでいる画分をいう。

[0019] 本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

[0020] 本明細書中において、「Ｓｉｇｌｅｃ－１５」は、Ｓｉｇｌｅｃ－１５蛋白質と同じ意味で用いている。

[0021] 本明細書中において、「破骨細胞の形成」は、「破骨細胞の分化」又は「破骨細胞の成熟」と同じ意味で用いている。

[0022] 本明細書中における「抗体の抗原結合断片」とは、「抗体の機能性断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0023] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所の相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0024] 本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社製）中、６８℃でハイブリダイズすること、又は、ＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７－１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１－２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０ ｍＭ ＮａＣｌ、１５ ｍＭ クエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することにより同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイ

ズすることをいう。

[0025]

１．Ｓｉｇｌｅｃ－１５

本発明者らによって、Ｓｉｇｌｅｃ－１５遺伝子は巨細胞腫において特異的に発現していることが見出された。また、本発明者らによってＳｉｇｌｅｃ－１５遺伝子は単球由来細胞株が破骨細胞に分化する際に発現量が増加することも見出された。

[0026] 本発明で用いるＳｉｇｌｅｃ－１５は、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）あるいはニワトリの単球細胞あるいは骨髄細胞から直接精製して使用するか、あるいは上記の細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、Ｓｉｇｌｅｃ－１５をｉｎ ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、Ｓｉｇｌｅｃ－１５ ｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＳｉｇｌｅｃ－１５を発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。

[0027] ヒトＳｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡのヌクレオチド配列は、ＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号：ＮＭ＿２１３６０２で登録されている。マウスＳｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡのヌクレオチド配列は、ＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号：ＸＭ＿８８４６３６で登録されている。なお、Ｓｉｇｌｅｃ－１５は、ＣＤ３３ ａｎｔｉｇｅｎ－ｌｉｋｅ ３、ＣＤ３３ ｍｏｌｅｃｕｌｅ－ｌｉｋｅ ３、ＣＤ３３－ｌｉｋｅ ３又はＣＤ３３Ｌ３と呼ばれることがあり、これらは全て同じ分子を示している。

[0028] Ｓｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡは例えば、Ｓｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡを発現しているｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｓｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以

下「ＰＣＲ」という）（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．　Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，（１９８８）２３９，４８７－４９）を行なう、いわゆるＰＣＲ法により取得することができる。

[0029] なお、ヒト又はマウスのＳｉｇｌｅｃ－１５をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、Ｓｉｇｌｅｃ－１５と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもＳｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡに含まれる。さらに、ヒト若しくはマウスＳｉｇｌｅｃ－１５遺伝子座から転写されるスプライシングバリアント又はこれにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ、Ｓｉｇｌｅｃ－１５と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもＳｉｇｌｅｃ－１５のｃＤＮＡに含まれる。

[0030] また、ヒト又はマウスのＳｉｇｌｅｃ－１５のアミノ酸配列、又はこれらの配列からシグナル配列が除かれたアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、Ｓｉｇｌｅｃ－１５と同等の生物活性を有する蛋白質もＳｉｇｌｅｃ－１５に含まれる。さらに、ヒト若しくはマウスＳｉｇｌｅｃ－１５遺伝子座から転写されるスプライシングバリアントにコードされるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、Ｓｉｇｌｅｃ－１５と同等の生物活性を有する蛋白質もＳｉｇｌｅｃ－１５に含まれる。

[0031]

２．骨代謝異常の検出

Ｓｉｇｌｅｃ－１５遺伝子は、ヒト各種骨組織検体群における遺伝子の発現量の解析をすると、破骨細胞様の多核巨細胞が多数出現する骨腫瘍であり、臨床的所見として骨溶解性の骨破壊を特徴とする（Ｂｕｌｌｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｔｌａｓ　ｏｆ　Ｏｒｔｈｏｐｅｄｉｃ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ，　ｐｐ１７．６－１７．８，Ｌｉｐｐｉｎｃ

ｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ（１９９２））巨細胞腫（Ｇｉａｎｔ ｃｅｌｌ ｔｕｍｏｒ；ＧＣＴ）において有意に発現量が増加していることが見出された。

[0032] また、Ｓｉｇｌｅｃ－１５遺伝子は単球由来細胞株が破骨細胞に分化する際に発現量が増加することも見出された。

[0033] したがって、Ｓｉｇｌｅｃ－１５はＧＣＴのような骨吸収が亢進するヒトの病態に関与していると考えられる。すなわち、Ｓｉｇｌｅｃ－１５遺伝子及び／又はＳｉｇｌｅｃ－１５の各細胞、及び／又は各組織における発現量を測定することでＳｉｇｌｅｃ－１５の過剰発現を伴う骨代謝異常の状態を判定することができる。なお、本明細書における骨代謝異常とは、正味の骨喪失によって特徴付けられる障害であり、具体的には骨粗鬆症（閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイドや免疫抑制剤等の治療用薬剤の使用による続発性骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨粗鬆症）、関節リウマチに伴う骨破壊、癌性高カルシウム血症、多発性骨髄腫や癌の骨転移に伴う骨破壊、巨細胞腫、骨減少症、歯根膜炎による歯の喪失、人工関節周囲の骨融解、慢性骨髄炎における骨破壊、骨ページェット病、腎性骨異栄養症、骨形成不全症等を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0034] 本発明においてＳｉｇｌｅｃ－１５遺伝子及び／又はＳｉｇｌｅｃ－１５の発現量を調べる対象となる「検体」とは、被験者や臨床検体等から得られた、骨髄、骨、前立腺、精巣、陰茎、膀胱、腎臓、口腔、咽頭、口唇、舌、歯肉、鼻咽頭、食道、胃、小腸、大腸、結腸、肝臓、胆嚢、膵臓、鼻、肺、軟部組織、皮膚、乳房、子宮、卵巣、脳、甲状腺、リンパ節、筋肉、脂肪組織等の組織、血液、体液又は排泄物等の試料を意味するが、本発明においては血液又は骨髄がより好ましい。

[0035] 破骨細胞の分化に関連することが知られているＲＡＮＫＬについては、ノックアウトマウスが作製されており、ＲＡＮＫＬの機能が失われた場合の表現型について解析がなされている（Ｙｏｕｎｇ－Ｙｕｎ Ｋｏｎｇ，ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９９）３９７，ｐ．３１５－３２３）。Ｓｉｇ

ｌｅｃ－１５についても同様にノックアウトマウスを作製することによって，Ｓｉｇｌｅｃ－１５の機能が失われた場合の表現型の解析を行うことができる。

[0036]

３．抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の製造

本発明のＳｉｇｌｅｃ－１５に対する抗体は、常法を用いて、Ｓｉｇｌｅｃ－１５又はＳｉｇｌｅｃ－１５のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるＳｉｇｌｅｃ－１５の生物種はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するＳｉｇｌｅｃ－１５を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種Ｓｉｇｌｅｃ－１５に結合する抗体とヒトＳｉｇｌｅｃ－１５との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

[0037] また、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ （１９７５）２５６，ｐ．４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ，Ｒ．ｅｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｐ．３６５－３６７，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、Ｓｉｇｌｅｃ－１５に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。このような方法の具体的な例は、国際公開第ＷＯ０９／４８０７２号パンフレット（２００９年４月１６日公開）及び第ＷＯ１０／１１７０１１号（２０１０年１０月１４日公開）パンフレットに記載されている。

[0038] なお、抗原となるＳｉｇｌｅｃ－１５はＳｉｇｌｅｃ－１５遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、Ｓｉｇｌｅｃ－１５遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したＳｉｇｌｅｃ－１５を精製すればよい。

[0039] このようにして樹立されたされたハイブリドーマ株の例としては、国際公開ＷＯ０９／４８０７２号パンフレットに記載のハイブリドーマ＃３２Ａ１を挙げることができる。ハイブリドーマ＃３２Ａ１は、日本国独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（所在地：郵便番号３０５－８５６６　日本国　茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に２００８年８月２８日付けで寄託され、ａｎｔｉ－Ｓｉｇｌｅｃ－１５　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　＃３２Ａ１の名称で受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－１０９９９が付与されている。なお、本明細書中においては、ハイブリドーマ＃３２Ａ１が産生する抗体を、「＃３２Ａ１抗体」又は単に「＃３２Ａ１」と記載する。＃３２Ａ１抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む部分断片は、国際公開第ＷＯ２０１０／１１７０１１号パンフレットに記載されている。

[0040] 上記Ｓｉｇｌｅｃ－１５に対するモノクローナル抗体の配列を、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変して、遺伝子組換え型抗体であるヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体を作製することができる。本発明の抗体には、前記ヒト化抗体のＣＤＲを改変した抗体が含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0041] ヒト化抗体としては、相補性決定領域（ＣＤＲ；ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照）、ＣＤＲ移植法によって、ＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第ＷＯ９０／０７８６１号パンフレット）を挙げることができる。ラット抗体＃３２Ａ１のヒト化抗体の実例としては、配列番号２の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号４の２１乃至１３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖の組合せを挙げることができる。

[0042] さらに好適な抗体としては、配列番号２の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号４の２１乃至２３８番

目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。本明細書においては、前記の抗体を「Ｋ３－１１１５」あるいは「Ｋ３－１１１５抗体」と呼称する。

[0043] 但し、＃３２Ａ１抗体由来のヒト化抗体としては、＃３２Ａ１の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、破骨細胞の形成を抑制する活性を持つ限り、上記のヒト化抗体に限定されない。なお、＃３２Ａ１抗体の重鎖可変領域は、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＤＹＦＭＮ）、配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＱＩＲＮＫＩＹＴＹＡＴＦＹＡＥＳＬＥＧ）又は配列番号９に示されるＣＤＲＨ２（ＱＩＲＮＫＩＹＴＹＡＴＦＹＡ）のいずれか一つ、及び配列番号１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＳＬＴＧＧＤＹＦＤＹ）を保有している。配列番号８に示されるＣＤＲＨ２は、Ｋａｂａｔの定義（ＳＥＱＵＥＮＣＥＳ ＯＦ ＰＲＯＴＥＩＮＳ ＯＦ ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＩＣＡＬ ＩＮＴＥＲＥＳＴ ＶＯＬ．Ｉ，ＦＩＦＴＨ ＥＤＴＩＯＮ（１９９１））によるものである。配列番号９に示されるＣＤＲＨ２では、Ｃ末端がＫａｂａｔの定義より５残基短縮されている。このＣＤＲＨ２を含む重鎖配列においては、ラット由来のＣＤＲ配列を減らしてヒトフレームワーク配列をより多く取り入れているために、ヒトに投与した際に異種抗原としてより一層認識されにくい。また、＃３２Ａ１抗体の軽鎖可変領域は、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＡＳＱＳＶＴＩＳＧＹＳＦＩＨ）、配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＲＡＳＮＬＡＳ）、及び配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＱＱＳＲＫＳＰＷＴ）を保有している。なお、上記の配列番号７乃至１０、及び１２乃至１４のＣＤＲのアミノ酸配列は、図４にも記載されている。

[0044] ＃３２Ａ１抗体由来のヒト化抗体のＣＤＲ改変体の一例としては、配列番号１０のＣＤＲＨ３の３番目のスレオニン残基をグルタミン酸残基に置換した抗体を挙げることができる。Ｓｉｇｌｅｃ－１５は塩基性の蛋白質であり、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸残基の抗体配列への導

入により、抗原－抗体間のイオン結合が形成されて結合能が向上することが期待される。抗体の認識部位で最も重要と考えられるＣＤＲＨ３ループの中央に位置し、Ｘ線結晶構造解析により抗原側に向いていると予想されるスレオニン残基に酸性アミノ酸で側鎖の長いグルタミン酸残基を導入する置換体を設計した。前記の置換を有するＣＤＲＨ３（ＳＬＥＧＧＤＹＦＤＹ）は、配列表の配列番号１１のアミノ酸配列に相当する。なお、配列番号１１のＣＤＲＨ３のアミノ酸配列は、図４にも記載されている。

[0045] 上記のＣＤＲ改変体として好適な抗体としては、配列番号６の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号４の２１乃至１３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖の組合せを挙げることができる。

[0046] さらに好適な抗体としては、配列番号６の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号４の２１乃至２３８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。本明細書においては、前記の抗体を「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ」あるいは「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体」と呼称する。なお、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体重鎖は、配列番号２に記載のＫ３－１１１５重鎖配列からシグナル配列を除いたアミノ酸配列の１０３番目のスレオニン残基がグルタミン酸残基に置換された配列である。

[0047] 但し、本発明のヒト化＃３２Ａ１のＣＤＲ改変体は、配列番号１１のＣＤＲＨ３配列を保有する限り、上記のＣＤＲ改変体に限定されない。また、本発明のヒト化＃３２Ａ１のＣＤＲ改変体のＣＤＲＨ２配列は、配列番号８又は配列番号９に示されるＣＤＲＨ２のいずれであっても良い。

[0048] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが

知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用など）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組み合わせたものであっても良い。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0049] 以上の方法によって得られた抗体は、実施例３に示された方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性の良い指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる方法である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ　Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．　ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ａｎｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量

の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0050] また、抗体の重鎖及び軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）を取得する方法も知られている（Ｌｅｅ，Ｈ－Ｓ，ｅｔ．ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９９）３６，ｐ．６１－７１；Ｓｈｉｒｒｍａｎｎ，Ｔ．ｅｔ．ａｌ．，ｍＡｂｓ（２０１０），２，（１）ｐ．１－４）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持することが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であっても良い。このような抗体は、単一ドメイン抗体（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ：ｓｄＡｂ）またはナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）と呼ばれており、実際にラクダ又はラマで観察され、抗原結合能が保持されていることが報告されている（Ｍｕｙｌｄｅｍａｎｓ Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．（１９９４）７（９），１１２９－３５，Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ Ｃ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）３６３（６４２８）４４６－８）。上記の抗体は、本発明における抗体の抗原結合断片の一種と解釈することも可能である。

[0051] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節することによって、抗体依存性細胞障害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、ＷＯ９９／５４３４２、ＷＯ００／６１７３９、ＷＯ０２／３１１４０等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0052] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げ

ることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。動物細胞としては、（１）哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）を挙げることができる。また、原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することにより抗体が得られる。以上の培養法においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。

[0053] 本発明の抗体のアイソタイプとしての制限はなく、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ（ＩｇＡ１，ＩｇＡ２）、ＩｇＤあるいはＩｇＥ等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧ又はＩｇＭ、さらに好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ２を挙げることができる。

[0054] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の抗原結合断片又はその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体全長分子の持つ機能の全て又は一部を保持している断片を抗体の抗原結合断片と呼ぶことができる。抗体の機

能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞障害活性、補体依存性細胞傷害活性及び補体依存性細胞性細胞傷害活性を挙げることができる。本発明における抗体の抗原結合断片が保持する機能は、Ｓｉｇｌｅｃ－１５に対する結合活性であり、好ましくは破骨細胞の形成を抑制する活性であり、より好ましくは破骨細胞の細胞融合の過程を抑制する活性である。

[0055] 例えば、抗体の断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又は重鎖及び軽鎖のＦｖを適当なリンカーで連結させたシングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｉａｂｏｄｙ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の断片に含まれる。

[0056] さらに、本発明の抗体は少なくとも２種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。通常このような分子は２種類の抗原に結合するものであるが（即ち、二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ））、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、３種類）の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0057] 本発明の多特異性抗体は、全長からなる抗体、又はそのような抗体の断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）２二重特異性抗体）でもよい。二重特異性抗体は２種類の抗体の重鎖と軽鎖（ＨＬ対）を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８３）３０５，ｐ．５３７－５３９）。

[0058] 本発明の抗体は一本鎖抗体（ｓｃＦｖとも記載する）でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，１１３

（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ及びＭｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ｐ．２６９－３１５（１９９４）、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，ｐ．１１２６－１１３６）。また、２つのｓｃＦｖをポリペプチドリンカーで結合させて作製されるＢｉｓｃＦｖ断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0059] 一本鎖抗体を作製する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、米国特許第５，２６０，２０３号、米国特許第５，０９１，５１３号、米国特許第５，４５５，０３０号等を参照）。このｓｃＦｖにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結される（Ｈｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８８），８５，ｐ．５８７９－５８８３）。ｓｃＦｖにおける重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。可変領域を連結するポリペプチドリンカーとしては、例えば１２～１９残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0060] ｓｃＦｖをコードするＤＮＡは、前記抗体の重鎖又は重鎖可変領域をコードするＤＮＡ、及び軽鎖又は軽鎖可変領域をコードするＤＮＡのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてＰＣＲ法により増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードするＤＮＡ、及びその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

[0061] また、一旦ｓｃＦｖをコードするＤＮＡが作製されると、それらを含有する発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってｓｃＦｖを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。

[0062] 本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよい。多量化する抗体としては、１種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、ＩｇＧ ＣＨ３ドメインと２つのｓｃＦｖとの結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスーターン－ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

[0063] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、ＣＤＲが異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることが出来る（ＷＯ２００４／０６１１０４号参照）。

[0064] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0065] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成しているもの（Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができる（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３，ｐ．１１３７－１１４６）。

[0066] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１

９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

[0067] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。また、抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0068]

４．抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を含有する医薬

上述の「３．抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の中から、Ｓｉｇｌｅｃ－１５の生物活性を中和する抗体を得ることができる。これらＳｉｇｌｅｃ－１５の生物活性を中和する抗体は、生体内でのＳｉｇｌｅｃ－１５の生物活性、即ち、破骨細胞の分化及び／又は成熟を阻害することから、医薬として、破骨細胞の分化及び／又は成熟異常に起因する骨代謝異常に対する治療及び／又は予防剤として用いることができる。骨代謝異常は正味の骨喪失（骨減少症又は骨溶解症）によって特徴付けられるいずれの障害であってもよい。一般に、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体による治療及び／又は予防は、骨吸収を抑制する必要がある場合に適用される。抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体で治療及び／又は予防可能な骨代謝異常としては、骨粗鬆症（閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイドや免疫抑制剤等の治療用薬剤の使用による続発性骨粗鬆症、関

節リウマチに伴う骨粗鬆症）、関節リウマチに伴う骨破壊、癌性高カルシウム血症、多発性骨髄腫や癌の骨転移に伴う骨破壊、巨細胞腫、骨減少症、歯根膜炎による歯の喪失、人工関節周囲の骨融解、慢性骨髄炎における骨破壊、骨ページェット病、腎性骨異栄養症、骨形成不全症などを挙げることができるが、破骨細胞による正味の骨喪失を伴う疾患であれば、これらに限定されない。上記の医薬としての抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の例として、＃３２Ａ１抗体から作製されたヒト化抗体およびこれのＣＤＲ改変体を挙げることができる。

[0069] ｉｎ ｖｉｔｒｏでの抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体によるＳｉｇｌｅｃ－１５の生物活性の中和活性は例えば、Ｓｉｇｌｅｃ－１５を過剰発現している細胞の破骨細胞への分化の抑制活性で測定することができる。例えば、マウス単球由来細胞株ＲＡＷ２６４．７細胞又はＲＡＷ２６４細胞に種々の濃度で抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を添加し、ＲＡＮＫＬあるいはＴＮＦ－α刺激による、破骨細胞への分化の抑制活性を測定することができる。また、骨髄由来の初代培養細胞に種々の濃度で抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を添加し、ＲＡＮＫＬ、ＴＮＦ－αあるいは活性型ビタミン$Ｄ_3$刺激による、破骨細胞への分化の抑制活性を測定することができる。さらに、正常ヒト破骨前駆細胞（Ｎｏｒｍａｌ Ｈｕｍａｎ Ｎａｔｕｒａｌ Ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ Ｃｅｌｌｓ、三光純薬より購入可能、カタログ番号２Ｔ－１１０）に種々の濃度で抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を添加し、ＲＡＮＫＬ及びＭ－ＣＳＦ刺激による、破骨細胞への分化の抑制活性を測定することができる。このような破骨細胞の分化抑制効果は、破骨細胞の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（ＴＲＡＰ）活性の抑制を指標として測定できる。また、ＴＲＡＰ陽性多核破骨細胞の形成の抑制、すなわち破骨細胞の細胞融合の抑制を指標としても、破骨細胞の分化抑制効果を測定することができる。さらに、大腿骨及び／又は脛骨由来の細胞を用いたピットアッセイ（Ｔａｋａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｍｉｎｅｒａｌ，（１９９２）１７，３４７－３５９）実験において、大腿骨及び／又は脛骨由来の細胞に種々の

濃度で抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を添加して象牙切片上のピットの形成を観察することによって、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける破骨細胞による骨吸収の抑制活性を測定することができる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける破骨細胞による骨吸収の抑制活性の測定系としては、ユーロピウムが結合したヒトコラーゲンをコーティングしたプレートを使用することも可能である。ｉｎ　ｖｉｖｏでの実験動物を利用した抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の骨代謝異常に対する治療又は予防効果は、例えば、骨粗鬆症モデル動物又はＳｉｇｌｅｃ－１５を過剰に発現しているトランスジェニック動物に抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を投与し、破骨細胞の変化を測定することで確認することができる。前記の骨粗鬆症モデル動物として、卵巣摘出ラット又は卵巣摘出サルを挙げることができる。これらの実験動物に抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を投与した後に骨密度又は骨代謝マーカーを測定することによって、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体による骨吸収活性の抑制効果を測定することができる。骨代謝マーカーとしては、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン、尿中Ｎ－ｔｅｌｏｐｅｐｔｉｄｅ　ｏｆ　ｔｙｐｅ　Ｉ　ｃｏｌｌａｇｅｎ（ＮＴＸ）、尿中Ｃ－ｔｅｌｏｐｅｐｔｉｄｅ　ｏｆ　ｔｙｐｅ　Ｉ　ｃｏｌｌａｇｅｎ（ＣＴＸ）、血中ＮＴＸ、血中ＣＴＸ、血中Ｔａｒｔｒａｔｅ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ　ａｃｉｄ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（ＴＲＡＰ５ｂ）等や、骨形成マーカーである血中骨型アルカリホスファターゼ（ＢＡＰ）、血中オステオカルシン（ＢＧＰ）、Ｐｒｏｃｏｌｌａｇｅｎ　ｔｙｐｅ　Ｉ　Ｃ-ｐｅｐｔｉｄｅ（Ｐ１ＮＰ）等を挙げることができるが、これらの骨代謝マーカーに限定されるものではない。

[0070] このようにして得られたＳｉｇｌｅｃ－１５の生物活性を中和する抗体は、医薬として、特に骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、癌の骨転移に伴う骨破壊等の骨代謝異常の治療又は予防を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。

[0071] 関節リウマチ（ＲＡ）の治療において、疾患の発症に伴って発生する骨喪失が大きな課題になっている。ＲＡに伴うこの骨喪失においては、破骨細胞

が中心的な役割を果たしていることが報告されている。ＲＡにおける破骨細胞の誘導（分化、成熟）、活性化、及び骨破壊の原因として最も重要と考えられているサイトカインはＲＡＮＫＬとＴＮＦ－αである（Ｒｏｍａｓ　Ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｏｎｅ　３０，　ｐ３４０－３４６，　２００２）。ＲＡＮＫＬのデコイレセプターであるＯＣＩＦ／ＯＰＧではＲＡＮＫＬで誘導される破骨細胞形成は抑制できるが、ＴＮＦ－αで誘導される破骨細胞形成は抑制されない。その一方で、本発明における抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体によって、ＲＡＮＫＬで誘導される破骨細胞形成とＴＮＦ－αで誘導される破骨細胞形成の両方が効果的に抑制された。したがって、本発明の抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体によって、ＲＡなどにおけるＴＮＦ－αで誘導される骨喪失と骨破壊が、ＲＡＮＫＬブロッカー（ＯＣＩＦ／ＯＰＧ、抗ＲＡＮＫＬ抗体など）以上に強力に抑制できることが期待される。

[0072] 抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体は、一つの例としては、骨代謝異常の治療又は予防に対しては該抗体単独で、あるいは少なくとも一つの他の骨疾患治療剤と併用して投与することができる。また一つの例として、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体は治療上有効な量の抗骨代謝異常治療薬剤と併用して投与することができる。抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体と併用して投与できる他の治療剤としては、ビスホスホネート（例えば、ａｌｅｎｄｒｏｎａｔｅ、ｅｔｉｄｒｏｎａｔｅ、ｉｂａｎｄｒｏｎａｔｅ、ｉｎｃａｄｒｏｎａｔｅ、ｐａｍｉｄｒｏｎａｔｅ、ｒｉｓｅｄｒｏｎａｔｅ、又はｚｏｌｅｄｒｏｎａｔｅ）、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ　ｅｓｔｒｏｇｅｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、カルシウム製剤、ＰＴＨ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ　ｈｏｒｍｏｎｅ）、非ステロイド性抗炎症剤（例えば、ｃｅｌｅｃｏｘｉｂ又はｒｏｆｅｃｏｘｉｂ）、可溶性ＴＮＦレセプター（例えば、ｅｔａｎｅｒｃｅｐｔ）、抗ＴＮＦα抗体又は該抗体の抗原結合断片（例えば、ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、抗ＰＴＨｒＰ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ　ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌ

ａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）抗体又は該抗体の抗原結合断片、ＩＬ－１レセプターアンタゴニスト（例えばａｎａｋｉｎｒａ）、抗ＩＬ－６レセプター抗体又は該抗体の抗原結合断片（例えば、ｔｏｃｉｌｉｚｕｍａｂ）、抗ＲＡＮＫＬ抗体又は該抗体の抗原結合断片（例えば、ｄｅｎｏｓｕｍａｂ）、及びＯＣＩＦ（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ　ｆａｃｔｏｒ）等を挙げることができるがこれらに限定されない。骨代謝異常の状態やどの程度の治療及び／又は予防を目指すかによって、２、３あるいはそれ以上の種類の他の治療剤を投与することもできるし、それらの他の治療剤は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することができる。他の治療剤と抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することもできる。また、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体と他の治療剤を別々の製剤に封入して同時に投与することもできる。さらに、他の治療剤と抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を相前後して別々に投与することもできる。すなわち、他の治療剤を投与した後に抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与するか、あるいは抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与した後に他の治療剤を投与しても良い。遺伝子治療において投与する場合には、蛋白質性の骨疾患治療剤の遺伝子と抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の遺伝子は、別々のあるいは同じプロモーター領域の下流に挿入することができ、別々のあるいは、同じベクターに導入することができる。

[0073] 抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体、あるいはそのフラグメントに対し骨疾患治療剤を結合させることにより、Ｍ．Ｃ．Ｇａｒｎｅｔ「Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｄｒｕｇ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　ｐｒｏｇｒｅｓｓ」，Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ，（２００１）５３，１７１－２１６記載の標的型薬物複合体を製造することができる。この目的には、抗体分子のほか、破骨細胞の認識性を完全消失していない限り、いずれの抗体フラグメントも適用可能であるが、例

えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ等のフラグメントを例として挙げることができ、本発明においても同様に、抗体及び該フラグメントを使用することができる。抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体又は該抗体のフラグメントと骨疾患治療剤との結合様式は、Ｍ．Ｃ．Ｇａｒｎｅｔ「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒｏｇｒｅｓｓ」，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，（２００１）５３，１７１－２１６、Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ「Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（１９９６）、Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ．Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３等に記載される種々の形態があり得る。すなわち、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体と骨疾患治療剤が化学的に直接あるいはオリゴペプチド等のスペーサーを介在して結合される様式や、適当な薬物担体を介在して結合される様式を挙げることができる。薬物担体の例としては、リポソームや水溶性高分子を挙げることができる。これら薬物担体が介在される様式としては、より具体的には、抗体と骨疾患治療剤とがリポソームに包含され、該リポソームと抗体とが結合した様式、及び、骨疾患治療剤が水溶性高分子（分子量１０００乃至１０万程度の化合物）に化学的に直接あるいはオリゴペプチド等のスペーサーを介在させて結合され、該水溶性高分子に抗体が結合した様式、を例として挙げることができる。抗体（又は該フラグメント）と骨疾患治療剤、リポソーム及び水溶性高分子等の薬物担体との結合は、Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ「Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（１９９６）、Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ．Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３に記載

の方法等の当業者周知の方法により実施することができる。骨疾患治療剤のリポソームへの包含は、Ｄ．Ｄ．Ｌａｓｉｃ「Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｐｈｙｓｉｃｓ ｔｏ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｂ．Ｖ．，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ（１９９３）等に記載の方法等の当業者周知の方法により実施することができる。骨疾患治療剤の水溶性高分子への結合は、Ｄ．Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３記載の方法等の当業者周知の方法により、実施することができる。抗体（又は該フラグメント）と蛋白質性の骨疾患治療剤（又は該フラグメント）との複合体は、上記の方法のほか、遺伝子工学的に、当業者周知の方法により作製することができる。

[0074] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。

[0075] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体と治療及び／又は予防に有効な量の少なくとも一つの骨疾患治療剤と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。骨疾患治療剤としては、ビスホスホネート（例えば、ａｌｅｎｄｒｏｎａｔｅ、ｅｔｉｄｒｏｎａｔｅ、ｉｂａｎｄｒｏｎａｔｅ、ｉｎｃａｄｒｏｎａｔｅ、ｐａｍｉｄｒｏｎａｔｅ、ｒｉｓｅｄｒｏｎａｔｅ、又はｚｏｌｅｄｒｏｎａｔｅ）、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｓｔｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、カルシウム製剤、ＰＴＨ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ）、非ステロイド性抗炎症剤（例えば、ｃｅｌｅｃｏｘｉｂ又はｒｏｆｅｃｏｘｉｂ）、可溶性ＴＮＦレ

セプター（例えば、ｅｔａｎｅｒｃｅｐｔ）、抗ＴＮＦα抗体又は該抗体の抗原結合断片（例えば、ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、抗ＰＴＨｒＰ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ　ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）抗体又は該抗体の抗原結合断片、ＩＬ－１レセプターアンタゴニスト（例えばａｎａｋｉｎｒａ）、抗ＩＬ－６レセプター抗体又は該抗体の抗原結合断片（例えば、ｔｏｃｉｌｉｚｕｍａｂ）、抗ＲＡＮＫＬ抗体又は該抗体の抗原結合断片（例えば、ｄｅｎｏｓｕｍａｂ）、及びＯＣＩＦ（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ　ｆａｃｔｏｒ）等を挙げることができるがこれらに限定されない。

[0076] 本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好ましくは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

[0077] 本発明の医薬組成物は、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリス－塩酸（Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン

・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０やポリソルベート８０等のポリソルベート、トリトン（ｔｒｉｔｏｎ）、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体の重量に対して０．０１～１００倍、特に０．１～１０倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0078] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓバッファー、ｐＨ４．０－５．５の酢酸バッファー、ｐＨ３．０－６．２のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物には抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を含む医薬組成物並びに、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体及び少なくとも一つの骨疾患治療剤を含む医薬組成物を挙げることができ、本発明の医薬組成物は選択された組成と必要な純度を持つ薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を含む医薬組成物並びに、抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体及び少なくとも一つの骨代謝異常治療薬剤を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0079] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗Ｓｉｇ

ｌｅｃ－１５抗体のＳｉｇｌｅｃ－１５に対する親和性、即ち、Ｓｉｇｌｅｃ－１５に対する解離定数（Ｋｄ値）に対し、親和性が高い（Ｋｄ値が低い）ほど、ヒトへの投与量を少なくしても薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。投与量は、ヒト型抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体をヒトに対して投与する際には、約０．１～１００ｍｇ／ｋｇを１～１８０日間に１回投与すればよい。

[0080] 本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などを挙げることができる。

[0081]

実施例

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．及びＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓより１９８９年に発刊）に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

参考例１

[0082] ヒト化＃３２Ａ１抗体Ｋ３－１１１５の遺伝子の作製

本明細書では、比較試験の対照となる抗体として国際公開第ＷＯ２０１０／１１７０１１号パンフレットに記載のｈ＃３２Ａ１－Ｈ１－１／Ｌ２－１５を使用した。抗体遺伝子は、国際公開第ＷＯ２０１０／１１７０１１号パンフレットに従って作製することが可能である。なお、本明細書においては前記のｈ＃３２Ａ１－Ｈ１－１／Ｌ２－１５抗体を「Ｋ３－１１１５」あるいは「Ｋ３－１１１５抗体」と呼称している。

Ｋ３－１１１５重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号２に記載されてい

る。配列番号２のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号２のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号１に記載されている。配列番号１のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１３９８番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号１のヌクレオチド配列及び配列番号２のアミノ酸配列は、図１にも記載されている。

Ｋ３－１１１５軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４に記載されている。配列番号４のアミノ酸配列の１乃至２０番目のアミノ残基からなる配列、２１乃至１３３番目のアミノ酸残基からなる配列、１３４乃至２３８番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号４のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３に記載されている。配列番号３のヌクレオチド配列の１乃至６０番目のヌクレオチドからなる配列、６１乃至３９９番目のヌクレオチドからなる配列、４００乃至７１４番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号３のヌクレオチド配列及び配列番号４のアミノ酸配列は、図２にも記載されている。

実施例 1

[0083] Ｋ３－１１１５の遺伝子へのＴ１０３Ｅ変異の導入（発現コンストラクトの作製）

Ｓｉｇｌｅｃ－１５は塩基性の蛋白質であり、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸残基の抗体配列への導入により、抗原－抗体間でイオン結合が形成されて結合能が向上することが期待される。抗体の認識部位で最も重要と考えられるＣＤＲＨ３ループの中央に位置し、Ｘ線結晶構造解析

により抗原側に向いていると予想されるスレオニン残基に酸性アミノ酸で側鎖の長いグルタミン酸残基を導入する置換体を設計した。置換を導入する重鎖配列としてＫ３－１１１５重鎖を選択し、Ｋ３－１１１５重鎖配列のＣＤＲＨ３配列の３番目のアミノ酸残基であるスレオニン残基をグルタミン酸残基に置換した重鎖配列を「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ重鎖」と命名した。アミノ酸残基の置換の位置は、シグナル配列を除いたＫ３－１１１５重鎖配列の１０３番目に相当する。なお、「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ重鎖」は「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体重鎖」と呼称されることもある。

国際公開第ＷＯ２０１０／１１７０１１号パンフレットの実施例２８に記載のｐＥＧ２／ｈ＃３２Ａ１－Ｈ１－１をテンプレートとして、例えば、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）と下記のプライマーセットを用いて、キットのマニュアルにしたがって塩基置換を行うことにより、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ重鎖発現ベクターを構築することができる。得られた発現ベクターを「ｐＥＧ２／Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ」と命名した。

塩基置換導入用プライマーセット

５’－ＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＧＣＣＡＧＧＴＣＣＴＴＧＧＡＧＧＧＣＧＧＣＧＡＣ－３’（３２Ａ１＿ＨＴ１０３ＥＦｗ：配列表の配列番号１５）

５’－ＧＴＣＧＣＣＧＣＣＣＴＣＣＡＡＧＧＡＣＣＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧＴＡＧ－３’（３２Ａ１＿ＨＴ１０３ＥＲｖ：配列表の配列番号１６）

Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６に記載されている。配列番号６のアミノ酸配列の１乃至１９番目のアミノ残基からなる配列、２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる配列、１４１乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号６のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５に記載されている。配列番号５

のヌクレオチド配列の１乃至５７番目のヌクレオチドからなる配列、５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなる配列、４２１乃至１３９８番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号５のヌクレオチド配列及び配列番号６のアミノ酸配列は、図３にも記載されている。

実施例 2

[0084] Ｋ３－１１１５抗体及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の調製

２－１）Ｋ３－１１１５抗体及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の生産

以下の方法あるいはこれに準じた方法によって、抗体の生産を行った。ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の１．２×10^9個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を３Ｌ Ｆｅｒｎｂａｃｈ Ｅｒｌｅｎｍｅｙｅｒ Ｆｌａｓｋ（ＣＯＲＮＩＮＧ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ （Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で希釈して１．０×10^6細胞／ｍｌに調製したのちに、３７℃、８％CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ ＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）２０ｍｌに溶解し、次にＮｕｃｌｅｏＢｏｎｄ Ｘｔｒａ（ＴａＫａＲａ社）を用いて調製した重鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）及び軽鎖発現ベクター（０．８ｍｇ）を２０ｍｌのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ ＳＦＭ混合液２０ｍｌを加え穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ Ｃａｐｓｕｌｅ Ｆｉｌｔｅｒ （Ａｄｖａｎｔｅｃ ＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。

[0085] 上記の培養において、国際公開第ＷＯ２０１０／１１７０１１号パンフレットに記載の重鎖発現ベクターｐＥＧ２／ｈ＃３２Ａ１－Ｈ１－１及び軽鎖発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈ＃３２Ａ１－Ｌ２－１５を組み合わせることによって、Ｋ３－１１１５抗体を作製することが可能である。

また、実施例１で作製された重鎖発現ベクターｐＥＧ２／Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ及び国際公開第ＷＯ２０１０／１１７０１１号パンフレットに記載の軽鎖発現ベクターｐＥＦ６ＫＣＬ／ｈ＃３２Ａ１－Ｌ２－１５を組み合わせることによって、ラット抗ヒトＳｉｇｌｅｃ－１５モノクローナル抗体＃３２Ａ１のヒト化抗体の１アミノ酸残基置換体を作製することが可能である。前記の１アミノ酸残基置換体を「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ」と命名した。本明細書では「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ」は、「Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体」と呼称されることもある。上記の抗体の調製法で述べたように、Ｋ３－１１１５抗体及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の軽鎖配列は同一である。すなわち、Ｋ３－１１１５抗体及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の間では、重鎖のＣＤＲＨ３中の１アミノ酸残基のみ異なっている。

[0086]

２－２）Ｋ３－１１１５及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の精製

Ｋ３－１１１５及びＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体は、以下の方法あるいはこれに準じた方法によって精製された。

[0087] 上記２－１）で得られた培養上清を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー（４－６℃下）とセラミックハイドロキシアパタイト（室温下）の２段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックヒドロキシルアパタイト精製後のバッファー置換工程は室温下で実施した。最初に、培養上清１１００－１２００ｍｌを、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐカラム：容積１ｍｌ×２連結）にアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、ＰＢＳ１５

－３０ｍｌでカラムを洗浄した。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を脱塩カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌ×２連結）で５ｍＭ リン酸ナトリウム／５０ｍＭ ＭＥＳ／２０ｍＭ ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーへ置換を行った。さらにその置換した抗体溶液を、５ｍＭ ＮａＰｉ／５０ｍＭ ＭＥＳ／２０ｍＭ ＮａＣｌ／ｐＨ６．５のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシルアパタイトカラム（日本バイオラッド、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ ＣＨＴ２－１ Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ Ｃｏｌｕｍｎ：容積２ｍｌ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を脱塩カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製、ＨｉＴｒａｐ Ｄｅｓａｌｔｉｎｇカラム：容積５ｍｌｘ２連結）でＣＢＳ（１０ｍＭクエン酸緩衝液／１４０ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ６．０）への液置換を行った。最後にＣｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ ＵＦ Ｆｉｌｔｅｒ Ｄｅｖｉｃｅ ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量３０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を１．０ｍｇ／ｍｌ以上に調製し精製サンプルとした。

実施例 3

[0088] Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体のヒトＳｉｇｌｅｃ－１５蛋白質に対する結合性評価

３－１）ヒトＳｉｇｌｅｃ－１５ Ｖ－ｓｅｔドメインの発現精製

ヒトＳｉｇｌｅｃ－１５ Ｖ－ｓｅｔドメイン（ＮＣＢＩの蛋白データベースのＡＣＣＥＳＳＩＯＮ番号ＮＰ＿９９８７６７のアミノ酸配列の３９乃至１６５番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド）のＮ末端側にＨｉｓタグ、および、ＦａｃｔｏｒＸａ認識配列を連結させた蛋白をコードするＤＮＡをベクターｐＤＥＳＴ１４（インビトロジェン社、カタログ番号：１１８０１－０１６）に組み込んだ。このプラスミドを用いて、大腸菌Ｒｏｓｅｔｔａ－ｇａｍｉＢ（ＤＥ３）（ノバジェン社、カタログ番号：７１１３６－

４）を形質転換し、ＴＢ培地（インビトロジェン社、カタログ番号：２２７１１－０２２）で培養した。培養後、超音波破砕した菌体を遠心分離し、上清をＨｉｓＴｒａｐ　ＨＰカラム（ＧＥヘルスケア社、カタログ番号：１７－５２４７－０１）で精製した。その後、ＦａｃｔｏｒＸａ（ＮＥＷ　ＥＮＧＬＡＮＤ　ＢｉｏＬａｂｓ社、カタログ番号Ｐ８０１０Ｌ）でＨｉｓタグを切断後、Ｍｏｎｏ　Ｓ５／５０　ＧＬカラム（ＧＥヘルスケア社、カタログ番号：１７－５１６８－０１）、さらに、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００カラム（ＧＥヘルスケア社、カタログ番号：１７－５１７４－０１）を用いて、電気泳動で分子量１４ｋＤａの単一バンドになるまでヒトＳｉｇｌｅｃ－１５　Ｖ－ｓｅｔドメインを精製した。

[0089]

３－２）Ｋ３－１１１５又はＫ３－１１１５／Ｔ１０３ＥのヒトＳｉｇｌｅｃ－１５　Ｖ－ｓｅｔドメインとの解離定数の測定

Ｋ３－１１１５又はＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体とｈＳｉｇｌｅｃ－１５（３９－１６５）Ｖ－ｓｅｔドメインの解離定数測定は、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を使用し、抗体をリガンドとして固定化し、抗原をアナライトとして測定した。Ｋ３－１１１５又はＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体は、アミンカップリング法にてセンサーチップＣＭ５（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））へ固定化した抗ヒトＩｇＧ抗体（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス（株））を介し、約５０ＲＵを結合させた。ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰ＋（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ，３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　Ｐ２０）を用いた。抗体を結合したチップ上に、抗原の希釈系列溶液（０．００３-７ｎＭ）を流速９０μｌ／分で２３３秒間添加し、引き続き２０００～３６００秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、３Ｍ　ＭｇＣｌ２を流速１０μｌ／分で３０秒間添加した。データの解析には、分析ソフトウェア（Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，　ｖｅｒｓｉｏｎ　１．０）の１：

１結合モデルを用いて、結合速度定数ｋｏｎ、解離速度定数ｋｏｆｆ及び解離定数（ＫＤ；ＫＤ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎ）を算出した。その結果、Ｋ３－１１１５のＫＤ値は２．６Ｅ－１０［Ｍ］、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３ＥのＫＤ値は４．１Ｅ－１２［Ｍ］であり、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅにおける１アミノ酸残基の置換によって、Ｋ３－１１１５と比較して親和性が約６０倍増強されることが明らかとなった。なお、Ｋ３－１１１５の１アミノ酸置換体として１２１種の抗体が実施例２の方法又はこれに準じた方法によって作製され、実施例３の方法又はこれに準じた方法に従ってヒトＳｉｇｌｅｃ－１５蛋白質に対する結合性評価が行われた。これらの１２１種の置換体において、ヒトＳｉｇｌｅｃ－１５蛋白質に対してＫ３－１１１５より強い親和性を示す抗体は６種類存在し、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅは最も高い親和性を示した。

実施例 4

[0090] Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体によるマウス破骨細胞形成に対する影響

５～８週齢の雄ｄｄＹマウスより大腿骨と脛骨を摘出し、軟組織を除去する。この大腿骨あるいは脛骨の両端を切り落とし、２５ゲージの注射針付きシリンジによりＤ－ＰＢＳを注入して骨髄細胞を押し出して、遠心チューブに回収する。室温で１００ｇ、５分間遠心して上清を捨てた後に、細胞のペレットにＨｅｍｏｌｙｔｉｃ Ｂｕｆｆｅｒ １ｍｌ（ＲＥＤ ＢＬＯＯＤ ＣＥＬＬ ＬＹＳＩＮＧ ＢＵＦＦＥＲ、シグマ社製）を加えて懸濁し、室温で５分間放置する。２０ｍｌのＤ－ＰＢＳを加えて室温で１００ｇ，５分間遠心し、上清を捨てた後に細胞のペレットに５ｎｇ／ｍｌ Ｍ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）、１０％ ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有するＭＥＭ－α培地（インビトロジェン社製）１０ｍｌを加えて懸濁し、セルストレイナー（４０μｍ Ｎｙｌｏｎ、ＢＤファルコン社製）を通して凝集物を除く。この細胞を７５ｃｍ^2－Ｔ フラスコ（付着細胞用）に移して、CO_2インキュベーター中で１晩培養する。１晩培養後、Ｔ－フラスコに付着していない細胞を回収して、マウス骨髄非付着細胞として使用する。上記の方

法で調製されるマウス骨髄非付着細胞を１０％　ＦＢＳと１０ｎｇ／ｍｌＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を含むα－ＭＥＭ培地で１．５×１０^{5}細胞／ｍｌに調製したものを９６穴プレートの各ウェルに２００μｌ播種して、CO_2インキュベーター中で２日間培養する。９６穴プレート中の古い培養液を除去して、ヒトＲＡＮＫＬ（ＲＡＮＫＬ、ペプロテック社製）を終濃度２０ｎｇ／ｍｌ、Ｍ－ＣＳＦを１０ｎｇ／ｍｌになるように添加した１０％　ＦＢＳ含有ＭＥＭ－α培地１００μｌを添加する。この細胞培養液に、実施例２で調製したＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体を３～１００ｎｇ／ｍｌの濃度になるように添加して、更に３日間CO_2インキュベーター中で培養する。培養終了後に、形成された破骨細胞の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（ＴＲＡＰ）活性を以下の操作で測定する。９６穴プレートの各ウェルの培養液を吸引除去して、１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含有する５０ｍＭクエン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．１）５０μｌを各ウェルに加え、プレート振とう機で５分間振とうして細胞を可溶化する。これらの各ウェルに基質溶液（５ｍｇ／ｍｌ　ｐ－ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌ　ｐｈｏｓｐｈａｔｅ及び０．４６％　酒石酸ナトリウムを含有する５０ｍＭクエン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．１））５０μｌを加えて室温で１０分間インキュベートする。インキュベート後に９６穴プレートの各ウェルに１Ｎ水酸化ナトリウム溶液５０μｌを加えて酵素反応を停止させる。酵素反応停止後に各ウェルの４０５ｎｍの吸光度を測定してＴＲＡＰ活性の指標とする。抗体非添加時とのＴＲＡＰ活性の比較により、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体のマウス破骨細胞形成抑制効果を評価することができる。

実施例 5

[0091] Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体によるヒト正常破骨細胞の骨吸収活性に対する影響（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ生物活性評価）

破骨細胞はカテプシンＫなどのプロテアーゼを放出することにより、骨組織の構成成分であるＩ型コラーゲンを分解することが知られている。ＯｓｔｅｏＬｙｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｌｏｎｚａ社製、カタログ番号　ＰＡ

－１５００）は、ユーロピウムが結合したヒトコラーゲンをコーティングした９６穴プレート（９６－ｗｅｌｌ　ＯｓｔｅｏＬｙｓｅ　ｃｅｌｌ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ｐｌａｔｅ）を提供しており、同プレート上で破骨細胞を培養した際に上清に遊離される蛍光コラーゲン断片量を測定することにより、破骨細胞の骨吸収活性をｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価することが可能である。

[0092] 正常ヒト破骨前駆細胞（Ｎｏｒｍａｌ　Ｈｕｍａｎ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔ　Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ　Ｃｅｌｌｓ、三光純薬より購入、カタログ番号２Ｔ－１１０）を、細胞に添付のプロトコールに従い９６－ｗｅｌｌ　ＯｓｔｅｏＬｙｓｅ　ｃｅｌｌ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ｐｌａｔｅに１×１０^{4}細胞／穴となるように播種した。なお培地は、ウシ胎児血清（終濃度１０％）、ヒトＲＡＮＫＬ（終濃度６３．８ｎｇ／ｍｌ）及びヒトＭ－ＣＳＦ（終濃度３３ｎｇ／ｍｌ）等を含むＯＰＧＭ添加因子セット（三光純薬より購入、カタログ番号ＰＴ－９５０１）を添加した破骨前駆細胞用基礎培地（ＯＰＢＭ、三光純薬より購入、カタログ番号ＰＴ－８２０１）を用いた。この培養上清中に、実施例２で調製したＫ３－１１１５抗体およびＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体を終濃度０．８、４、２０、１００ｎｇ／ｍｌとなるように添加して、CO_2インキュベーター中で５日間培養した。培養上清１０μｌを採取し、ＯｓｔｅｏＬｙｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔに付属のＦｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ　Ｒｅｌｅａｓｉｎｇ　Ｒｅａｇｅｎｔを２００μｌ添加して、蛍光プレートリーダー（ＡＲＶＯ　ＭＸ、パーキンエルマー社製）を用いて蛍光強度を測定（Ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ：３４０ｎｍ、Ｅｍｉｓｓｉｏｎ：６１５ｎｍ）することにより、培養上清中に放出された遊離蛍光コラーゲン断片量を定量した（図５）。その結果、遊離コラーゲン断片量が、Ｋ３－１１１５抗体によって、２０ｎｇ／ｍｌから１００ｎｇ／ｍｌの範囲で濃度依存的に抑制された。一方、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体添加では、４ｎｇ／ｍｌから１００ｎｇ／ｍｌの範囲で濃度依存的に抑制された。このことから、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体はＫ３－１１１５抗体よりもより低濃度からヒト破骨細胞の骨吸収活性を強く抑制することが明らかと

なった。

実施例 6

[0093] Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の卵巣摘出ラットを用いた生物学的評価

ａ）動物実験のプロトコール

１２週齢雌性Ｆ３４４ラット（日本チャールス・リバー社より入手）に両側卵巣摘除を施術し、溶媒投与群、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体投与群の２群に分ける。また偽手術群についても１群設定する。抗体を投与する群については、実施例２で調製したＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体を、各１ｍｇ／ｋｇの用量で腹腔内に週３回、手術翌日から４週間反復投与する。溶媒投与群及び偽手術群には、溶媒として０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳを腹腔内に投与する。投与開始４週後に絶食下で２４時間採尿を行い、尿検体は測定まで－８０℃で保存する。採尿終了後にラットを安楽死させ、腰椎を摘出する。

[0094]

ｂ）腰椎骨密度の測定

摘出した腰椎に付着している軟組織を除去し、第４～６腰椎を切り出す。エタノール中で振とう後に風乾することにより脱脂及び脱水し、骨密度測定装置（ＤＣＳ－６００ＥＸ、アロカ社製）を用いて骨密度を測定する。偽手術群に対し、卵巣摘除群では有意な腰椎骨密度の減少が認められるが、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体投与群では卵巣摘除による骨密度の減少が有意に抑制される。ａ）に記載のプロトコールにＫ３－１１１５を投与する１群を追加すれば、Ｋ３－１１１５とＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅによる骨密度現象に対する抑制効果を比較することができる。

[0095]

ｃ）尿中デオキシピリジノリン排泄量の測定

Ｉ型コラーゲン架橋の各種代謝産物は骨の代謝回転、特に骨吸収を鋭敏に反映し、なかでもデオキシピリジノリンは主として骨のコラーゲンに局在することから骨吸収の指標として信頼性が高いとされている。

[0096] 凍結保存していた尿検体を融解し、遠心操作により不溶物質を沈殿させて上清を得る。この上清中に含まれるデオキシピリジノリン量を、オステオリンクス「ＤＰＤ」（ＤＳファーマバイオメディカル社製）を用いて測定する。また、クレアチニンーテストワコー（和光純薬工業社製）を用いて上清中のクレアチニン含量も測定し、クレアチニン補正を行ったデオキシピリジノリン量を算出する。偽手術群に対し、卵巣摘除群では尿中デオキシピリジノリン排泄量が有意に増加することから、卵巣摘除ラットでは破骨細胞による骨吸収が亢進していることが示唆される。一方Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体投与群では、卵巣摘除によるデオキシピリジノリン排泄量の増加が偽手術群と同程度まで抑制される。このことから、Ｓｉｇｌｅｃ－１５に特異的に結合するモノクローナル抗体が破骨細胞の骨吸収を抑制することが動物モデルでも確認され、この骨吸収抑制作用により卵巣摘除ラットの腰椎骨密度減少を抑制したことが強く示唆される。ａ）に記載のプロトコールにＫ３－１１１５を投与する１群を追加すれば、Ｋ３－１１１５とＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅによる骨密度現象に対する抑制効果を比較することができる。

実施例 7

[0097] Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の卵巣摘出サル用いた生物学的評価

Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体の卵巣摘出サルにおける骨吸収活性の抑制効果は、以下に示す方法により評価が可能である。

[0098] ７～１５才雌性カニクイザルに両側卵巣摘除を施術し、１ヵ月後に溶媒投与群、Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体投与群に分ける。抗体を投与する群については、実施例２で調製したＫ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体を、０．１～３０ｍｇ／ｋｇの用量で皮下に単回投与する。投与後２ヶ月程度まで経時的に採尿、採血し、尿中および血中における骨代謝マーカーを測定することにより抗体の骨吸収抑制活性を評価する。骨吸収マーカーである尿中Ｎ－ｔｅｌｏｐｅｐｔｉｄｅ ｏｆ ｔｙｐｅ Ｉ ｃｏｌｌａｇｅｎ（ＮＴＸ）、尿中Ｃ－ｔｅｌｏｐｅｐｔｉｄｅ ｏｆ ｔｙｐｅ Ｉ ｃｏｌｌａｇｅｎ（ＣＴＸ）、血中ＮＴＸ、血中ＣＴＸ、血中Ｔａｒｔｒａｔｅ－ｒｅｓ

ｉｓｔａｎｔ ａｃｉｄ ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（ＴＲＡＰ５ｂ）等や、骨形成マーカーである血中骨型アルカリホスファターゼ（ＢＡＰ）、血中オステオカルシン（ＢＧＰ）、Ｐｒｏｃｏｌｌａｇｅｎ ｔｙｐｅ Ｉ Ｃ-ｐｅｐｔｉｄｅ（Ｐ１ＮＰ）等を骨代謝マーカーとして挙げることができる。

産業上の利用可能性

[0099] 本発明のヒト化抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体のＣＤＲ改変体は、公知の抗体より強力な破骨細胞の分化又は骨吸収活性の抑制能を有し、該抗Ｓｉｇｌｅｃ－１５抗体を含む医薬組成物は骨代謝異常疾患の治療又は予防剤となり得る。

配列表フリーテキスト

[0100] 配列番号１：Ｋ３－１１１５抗体重鎖のヌクレオチド配列

配列番号２：Ｋ３－１１１５抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号３：Ｋ３－１１１５抗体軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号４：Ｋ３－１１１５抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号５：Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体重鎖のヌクレオチド配列

配列番号６：Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号７：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列

配列番号８：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＨ２のアミノ酸配列（１９アミノ酸残基からなる）

配列番号９：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＨ２のアミノ酸配列（１４アミノ酸残基からなる）

配列番号１０：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＨ３のアミノ酸配列

配列番号１１：Ｋ３－１１１５／Ｔ１０３Ｅ抗体のＣＤＲＨ３のアミノ酸配列

配列番号１２：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＬ１のアミノ酸配列

配列番号１３：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＬ２のアミノ酸配列

配列番号１４：＃３２Ａ１抗体のＣＤＲＬ３のアミノ酸配列

配列番号１５：ＰＣＲプライマー３２Ａ１＿ＨＴ１０３ＥＦｗ

配列番号１６：ＰＣＲプライマー３２Ａ１＿ＨＴ１０３ＥＲｖ

請求の範囲

［請求項1］ 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号９に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなること；及び

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする抗体又は該抗体の抗原結合断片。

［請求項2］ 配列番号６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３３番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

［請求項3］ 配列番号６に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３８番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

［請求項4］ 配列番号６に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号４に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３８番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片。

［請求項5］ Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’及びＦｖからなる群から選択される、請求項１又は２に記載の抗体の抗原結合断片。

［請求項6］ ｓｃＦｖであることを特徴とする、請求項１又は２に記載の抗体。

［請求項7］ 請求項１乃至６に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

［請求項8］ 骨代謝異常の治療及び／又は予防剤であることを特徴とする、請求項７に記載の医薬組成物。

［請求項9］ 請求項１乃至６に記載の抗体又は該抗体の抗原結合断片の少なくともいずれか一つ、並びに、ビスホスホネート、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｓｔｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、カルシウム製剤、ＰＴＨ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ）、非ステロイド性抗炎症剤、可溶性ＴＮＦレセプター、抗ＴＮＦα抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＰＴＨｒＰ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ）抗体又は該抗体の抗原結合断片、ＩＬ－１レセプターアンタゴニスト、抗ＩＬ－６レセプター抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＲＡＮＫＬ抗体又は該抗体の抗原結合断片、及びＯＣＩＦ（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ）からなる群から選択される少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、骨代謝異常の治療及び／又は予防用医薬組成物。

［請求項10］ 骨代謝異常が、骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、癌性高カルシウム血症、多発性骨髄腫や癌の骨転移に伴う骨破壊、巨細胞腫、骨減少症、歯根膜炎による歯の喪失、人工関節周囲の骨融解、慢性骨髄炎における骨破壊、骨ページェット病、腎性骨異栄養症、及び骨形成不全症からなる群から選択される、請求項８又は９に記載の医薬組成物。

［請求項11］ 骨代謝異常が、骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、又は癌の骨転移に伴う骨破壊であることを特徴とする、請求項１０に記載の医薬組成物。

[請求項12] 骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、請求項１１に記載の医薬組成物。

[請求項13] 骨粗鬆症が、閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイドや免疫抑制剤等の治療用薬剤の使用による続発性骨粗鬆症、又は関節リウマチに伴う骨粗鬆症であることを特徴とする請求項１２に記載の医薬組成物。

[請求項14] 請求項１乃至６に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は請求項８若しくは９に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つを投与することを特徴とする、骨代謝異常の治療及び／又は予防方法。

[請求項15] 請求項１乃至６に記載の抗体、該抗体の抗原結合断片、又は請求項８に記載の医薬組成物の少なくともいずれか一つ、並びに、ビスホスホネート、活性型ビタミンD_3、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン、ＳＥＲＭｓ（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｅｓｔｒｏｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ）、イプリフラボン、ビタミンK_2（メナテトレノン）、カルシウム製剤、ＰＴＨ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ）、非ステロイド性抗炎症剤、可溶性ＴＮＦレセプター、抗ＴＮＦα抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＰＴＨｒＰ（ｐａｒａｔｈｙｒｏｉｄ ｈｏｒｍｏｎｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ）抗体又は該抗体の抗原結合断片、ＩＬ－１レセプターアンタゴニスト、抗ＩＬ－６レセプター抗体又は該抗体の抗原結合断片、抗ＲＡＮＫＬ抗体又は該抗体の抗原結合断片、及びＯＣＩＦ（ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ）からなる群から選択される少なくともいずれか一つを同時又は相前後してして投与することを特徴とする、骨代謝異常の治療及び／又は予防方法。

[請求項16] 骨代謝異常が、骨粗鬆症、関節リウマチに伴う骨破壊、又は癌の骨転移に伴う骨破壊であることを特徴とする、請求項１４又は１５に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項17] 骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、請求項１６に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項18] 骨粗鬆症が、閉経後骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイドや免疫抑制剤等の治療用薬剤の使用による続発性骨粗鬆症、又は関節リウマチに伴う骨粗鬆症であることを特徴とする請求項１７に記載の治療及び／又は予防方法。

[請求項19] 請求項１乃至６のいずれか一つに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[請求項20] 配列番号５に示されるヌクレオチド配列の５８乃至４２０番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号３に示されるヌクレオチド配列の６１乃至３９９番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項１９に記載のポリヌクレオチド。

[請求項21] 配列番号５に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１３９８番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号３に示されるヌクレオチド配列の６１乃至７１４番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項１９に記載のポリヌクレオチド。

[請求項22] 請求項１９乃至２１に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項23] 請求項１９乃至２１に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

[請求項24] 請求項２２に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

[請求項25] 請求項２３又は２４に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む請求項１乃至６のいずれか一つに記載の抗体の生産方法。