

明 細 書

発明の名称：抗 S i g l e c - 1 5 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（国際公開第WO07/093042号、及びEndocrinological Review, (1992) 13, p66-80）。

[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（国際公開第WO07/093042号、及びEndocrinological Review, (1996) 17, p308-332）。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 (American Journal of Physiology, (1991) 260, C1315-C1324)。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- κ B 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 (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, (1998) 95, p3597-3602、及びCell, (1998) 93, p165-176)。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 (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, (1998) 95, p3597-3602、及びJournal of Bone and Mineral Research, (1998) 23, S222)。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 (Nature, (1999) 397, p315-323)。

[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D₃、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K₂ (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

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 (Nature Reviews Immunology, (2007) 7, p255-266) 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 Neu5Ac α 2-6GalNAc と、マウス Siglec-15 はさらに Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc と結合することなども明らかにされた (例えば、Glycobiology, (2007) 17, p838-846 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、国際公開第 WO 07/093042 号を参照)。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

て、国際公開第WO 09/48072号（2009年4月16日公開）において初めて明らかにされたが、ヒトに投与可能な抗体配列については、これまで明らかにされていなかった。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 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

[0009] 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S i g l e c－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、S i g l e c－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S i g l e c－15抗体をヒト化して、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。

（１）配列番号2に示されるアミノ酸配列の39乃至165番目のアミノ酸残基からなるポリペプチドに結合し、破骨細胞の形成及び／又は破骨細胞による骨吸収を抑制する抗体又は該抗体の機能性断片。

（２）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44に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号45又は配列番号97に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号46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47に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号48に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号49に示されるアミノ酸

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機能性断片。

（３）配列番号４１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４３に示されるアミノ酸配列の２１乃至１３２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（２）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（４）F a b、F（a b'）₂、F a b' 及びF vからなる群から選択される、（１）乃至（３）のいずれか一つに記載の抗体の機能性断片。

（５）s c F vであることを特徴とする、（１）乃至（３）のいずれか一つに記載の抗体。

（６）キメラ抗体であることを特徴とする、（１）乃至（４）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（７）配列番号４１に示されるアミノ酸配列の２０乃至４７０番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号４３に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３７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（６）に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（８）ヒト化されていることを特徴とする、（１）乃至（４）又は（６）のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

（９）重鎖がヒト免疫グロブリンG 2重鎖の定常領域を含み、軽鎖がヒト免疫グロブリンκ軽鎖の定常領域を含む、（７）又は（８）に記載の抗体。

（１０）破骨細胞の形成及び／又は破骨細胞による骨吸収を抑制する抗体又は該抗体の機能性断片であって、

（a）以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域：

a 1）配列番号５１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アミノ酸配列；

a 2）配列番号５３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アミノ酸配列；

a 3）配列番号５５に示されるアミノ酸配列の２０乃至１４０番目のアミ

ノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 4) 配列番号 57 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アミノ酸配列；

a 5) 配列番号 59 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アミノ酸配列；

a 6) 配列番号 99 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アミノ酸配列；

a 7) 配列番号 101 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アミノ酸配列；

a 8) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 95% の相同性を持つアミノ酸配列；

a 9) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 99% の相同性を持つアミノ酸配列；

a 10) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；及び

(b) 以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域；

b 1) 配列番号 61 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アミノ酸配列；

b 2) 配列番号 63 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アミノ酸配列；

b 3) 配列番号 65 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アミノ酸配列；

b 4) 配列番号 67 に示されるアミノ酸配列の 21 乃至 132 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 5) 配列番号 69 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アミノ酸配列；

b 6) 配列番号 71 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アミノ酸配列；

b 7) 配列番号 1 0 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 8) 配列番号 1 0 5 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 9) b 1) 乃至 a 8) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の相同性を持つアミノ酸配列；

b 1 0) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を持つアミノ酸配列；

b 1 1) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；

を含むことを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

(1 1) 配列番号 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 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配列及び配列番号 6 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 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配列を含むことを特徴とする (1 0) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(1 2) 配列番号 5 3 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 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配列及び配列番号 6 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 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配列を含むことを特徴とする (1 0) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(1 3) 配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 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配列及び配列番号 6 5 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 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配列を含むことを特徴とする (1 0) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(1 4) 配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 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配列及び配

列番号 67 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする (10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(15) 配列番号 57 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 69 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする (10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(16) 配列番号 59 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 71 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする (10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(17) 配列番号 99 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 69 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする (10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(18) 配列番号 101 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 69 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする (10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(19) 配列番号 99 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 103 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする (10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(20) 配列番号99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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号105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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする(10)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(21) 配列番号51に示されるアミノ酸配列の20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号61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を含むことを特徴とする(10)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(22) 配列番号53に示されるアミノ酸配列の20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号63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を含むことを特徴とする(10)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(23) 配列番号55に示されるアミノ酸配列の20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号65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を含むことを特徴とする(10)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(24) 配列番号55のアミノ酸配列に示される20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号67に示されるアミノ酸配列の21乃至237番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列を含むことを特徴とする(10)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(25) 配列番号57に示されるアミノ酸配列の20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号69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を含むことを特徴とする(10)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(26) 配列番号59に示されるアミノ酸配列の20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号71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を含むことを特徴とする(

10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(27) 配列番号99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69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を含むことを特徴とする(10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(28) 配列番号101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69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を含むことを特徴とする(10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(29) 配列番号99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103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を含むことを特徴とする(10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(30) 配列番号99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105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を含むことを特徴とする(10) に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

(31) (1) 乃至(30) に記載の抗体又は該抗体の機能性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。

(32) 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、(31) に記載の医薬組成物。

(33) (1) 乃至(30) に記載の抗体又は該抗体の機能性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D₃、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K₂ (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TNF α 抗体又は該抗体の機能性断片

、抗PTHrP (parathyroid hormone-related protein) 抗体又は該抗体の機能性断片、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機能性断片、抗RANKL抗体又は該抗体の機能性断片、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。

(34) 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জেット病、腎性骨異常栄養症、及び骨形成不全症からなる群から選択される、(32) 又は(33)に記載の医薬組成物。

(35) 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、(34)に記載の医薬組成物。

(36) 骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、(35)に記載の医薬組成物。

(37) 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(36)に記載の医薬組成物。

(38) (1) 乃至(30)に記載の抗体又は該抗体の機能性断片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。

(39) (1) 乃至(30)に記載の抗体又は該抗体の機能性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D₃、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K₂ (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TNF α 抗体又は該抗体の機能性断片、抗PTHrP (parathyroid hormone-related protein) 抗体又は該抗体の機能性断片、IL-1レセプター、抗IL-6レセプター抗体又は該抗体の機能性断片、抗RA α 抗体又は該抗体の機能性断片、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。

(40) 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、(38) 又は(39)に記載の治療及び／又は予防方法。

(41) 骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、(40)に記載の治療及び／又は予防方法。

(42) 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(41)に記載の治療及び／又は予防方法。

(43) (3)、(7) 又は(10) 乃至(30) 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。

(44) (43) に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号40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配列の61乃至396番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

(45) 配列番号40に示されるヌクレオチド配列の58乃至1410番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列及び配列番号42に示されるヌクレオチド配列の61乃至711番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする(44)に記載のポリヌクレオチド。

(46) (43)に記載のポリヌクレオチドであって、

(a) 以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド

:

a 1) 配列番号50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;

a 2) 配列番号52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;

a 3) 配列番号54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;

a 4) 配列番号56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;

a 5) 配列番号58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;

a 6) 配列番号98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;

a 7) 配列番号100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;

a 8) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つの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するポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列;

a 9) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に1乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列;
及び

(b) 以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド

:

b 1) 配列番号60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;

b 2) 配列番号 6 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 3) 配列番号 6 4 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 4) 配列番号 6 6 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 6 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 5) 配列番号 6 8 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 6) 配列番号 7 0 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 7) 配列番号 1 0 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 8) 配列番号 1 0 4 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 9) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つの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するポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

b 1 0) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に 1 乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

(4 7) 配列番号 5 0 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 6 0 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 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 (4 6) に記載のポリヌクレオチド。

(4 8) 配列番号 5 2 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 62 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(49) 配列番号 54 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 64 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(50) 配列番号 54 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 66 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(51) 配列番号 56 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 68 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(52) 配列番号 58 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 70 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(53) 配列番号 98 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 68 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

る（４６）に記載のポリヌクレオチド。

（５４）配列番号１００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６８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（４６）に記載のポリヌクレオチド。

（５５）配列番号９８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１０２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（４６）に記載のポリヌクレオチド。

（５６）配列番号９８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１０４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（４６）に記載のポリヌクレオチド。

（５７）配列番号５０に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１０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６０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（４６）に記載のポリヌクレオチド。

（５８）配列番号５２に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１０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６２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（４６）に記載のポリヌクレオチド。

（５９）配列番号５４に示されるヌクレオチド配列の５８乃至１４１０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 64 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(60) 配列番号 54 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 66 に示されるヌクレオチド配列の 61 乃至 711 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(61) 配列番号 56 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 68 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(62) 配列番号 58 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 70 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(63) 配列番号 98 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 68 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(64) 配列番号 100 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 68 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(65) 配列番号 98 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 102 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(66) 配列番号 98 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 104 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 (46) に記載のポリヌクレオチド。

(67) (43) 乃至 (66) 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。

(68) (43) 乃至 (66) 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。

(69) (67) に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

(70) (68) 又は (69) 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 (3)、(7) 又は (10) 乃至 (30) に記載の抗体の生産方法。

発明の効果

[0010] 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

[0011] [図1] H1s Trap HPカラムクロマトと Resource Qカラムクロマトで精製したマウス H1s-15-H1s の挙動を SDS-ポリ

[図2] H1s Trap HPカラムクロマトと Resource Qカラムクロマトで精製したマウス H1s-15-H1s の挙動を、SDS-ポリ

リブアクリルアミド電気泳動と抗 V5-HRP 抗体を用いたウェスタンブロット

ティングで検出した結果である。

[図3] HiTrap protein A カラムクロマトで精製したマウス S i g l e c - 1 5 - F c の純度を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色で評価した結果である。

[図4] マウス S i g l e c - 1 5 - F c 固相化プレートに対するラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体の結合を ELISA 法で試験した結果である。シンボル (◆) は # 1 A 1 抗体を、シンボル (■) は # 3 A 1 抗体を、シンボル (▲) は # 8 A 1 抗体を、シンボル (×) は # 2 4 A 1 抗体を、シンボル (●) は # 3 2 A 1 抗体を、シンボル (○) は # 3 4 A 1 抗体を、シンボル (+) は # 3 9 A 1 抗体を、シンボル (-) は # 4 0 A 1 抗体を、シンボル (ー) は # 4 1 B 1 抗体を、シンボル (◇) は # 6 1 A 1 抗体を、シンボル (□) はコントロール I g G をそれぞれ表している。

[図5] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 (# 3 A 1、# 8 A 1 又は # 3 2 A 1) の添加による、マウス骨髄非付着細胞の破骨細胞分化 (RANKL 刺激) への影響を試験した結果である。なお、図中のラットコントロール I g G は、図 5 及び 6 で共通の陰性コントロールである。

[図6] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 (# 3 4 A 1、# 3 9 A 1 又は # 4 0 A 1) の添加による、マウス骨髄非付着細胞の破骨細胞分化 (RANKL 刺激) への影響を試験した結果である。なお、図中のウサギ抗マウス S i g l e c - 1 5 ポリクローナル抗体 No. 3 は、図 5 及び 6 で共通の陽性コントロールである。

[図7] HiTrap HP カラムクロマトと Resource Q カラムクロマトで精製したヒト S i g l e c - 1 5 - H i s の純度を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色で評価した結果である。

[図8] Protein A カラムクロマトで精製したヒト S i g l e c - 1 5 - F c の純度を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で評価した結果である。

[図9] ヒト S i g l e c - 1 5 - F c 固相化プレートに対するラット抗マウス

S i g l e c - 1 5モノクローナル抗体の結合をE L I S A法で試験した結果である。シンボル（◆）は# 1 A 1抗体を、シンボル（■）は# 3 A 1抗体を、シンボル（▲）は# 8 A 1抗体を、シンボル（×）は# 2 4 A 1抗体を、シンボル（●）は# 3 2 A 1抗体を、シンボル（○）は# 3 4 A 1抗体を、シンボル（+）は# 3 9 A 1抗体を、シンボル（-）は# 4 0 A 1抗体を、シンボル（-）は# 4 1 B 1抗体を、シンボル（◇）は# 6 1 A 1抗体を、シンボル（□）はコントロール I g Gをそれぞれ表している。

[図10]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体の添加による、正常ヒト破骨前駆細胞からの巨大破骨細胞形成の抑制をT R A P染色で示した顕微鏡写真である。

[図11]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体（# 3 2 A 1抗体）の添加による、正常ヒト破骨前駆細胞からの巨大破骨細胞形成の抑制をT R A P染色で示した顕微鏡写真である。

[図12]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体（# 3 2 A 1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）。

[図13]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体を卵巣摘除ラットに4週間投与した際の腰椎骨密度の増加作用（A）及び尿中デオキシピリジノリン排泄量の低下作用（B）を示したグラフである。

[図14]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1がヒトS i g l e c - 1 5のV - s e tドメインに結合することを競合E L I S Aによって示した図である。

[図15]ラット# 3 2 A 1抗体とこれのヒトキメラ抗体が、マウスS i g l e c - 1 5 - F cに対してほぼ同等の親和性を持つことを競合E L I S Aによって示した図である。

[図16]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体（# 3 2 A 1抗体）及びそのキメラ抗体の添加による、マウス破骨細胞形成の抑制をT R A P酵素活性で示したグラフである（N = 3）。

[図17]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1のヒトキメラ抗体の添加による、正常ヒト破骨前駆細胞からの巨大破骨細胞形成の抑制をT R A P染色で示した顕微鏡写真である。

[図18]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5ヒト化抗体6種が、抗体の濃度に依存してマウスS i g l e c - 1 5蛋白質に結合することを、マウスS i g l e c - 1 5 - F c固相化プレートを用いたE L I S A法によって確認した図である。

[図19]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5ヒト化抗体6種が、抗体の濃度に依存してヒトS i g l e c - 1 5蛋白質に結合することを、ヒトS i g l e c - 1 5 - F c固相化プレートを用いたE L I S A法によって確認した図である。

[図20]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体（# 3 2 A 1抗体）及びそのキメラ抗体の添加による、T N F α 刺激下でのマウス巨大破骨細胞形成の抑制をT R A P染色で示した顕微鏡写真である。

[図21]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体（# 3 2 A 1抗体）及びそのキメラ抗体の添加による、T N F α 刺激下でのマウス破骨細胞形成の抑制をT R A P酵素活性で示したグラフである（N = 3）。

[図22]ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体（# 8 A 1及び# 3 2 A 1抗体）の添加による、ラット破骨細胞形成の抑制をT R A P酵素活性で示したグラフである（N = 3）。

[図23]クローニングしたラット# 3 2 A 1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24]クローニングしたラット# 3 2 A 1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25]# 3 2 A 1ヒトキメラ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26]# 3 2 A 1ヒトキメラ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27] h # 3 2 A 1 - T 1 H 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28] h # 3 2 A 1 - T 2 H 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29] h # 3 2 A 1 - T 3 H 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30] h # 3 2 A 1 - T 5 H 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31] h # 3 2 A 1 - T 6 H 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32] h # 3 2 A 1 - T 1 L 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33] h # 3 2 A 1 - T 2 L 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34] h # 3 2 A 1 - T 3 L 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35] h # 3 2 A 1 - T 4 L 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36] h # 3 2 A 1 - T 5 L 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37] h # 3 2 A 1 - T 6 L 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38] h # 3 2 A 1 - T 7 H、h # 3 2 A 1 - T 8 H、及びh # 3 2 A 1 - T 9 H のアミノ酸配列を示した図である。

[図39] h # 3 2 A 1 - T 1 0 H、h # 3 2 A 1 - T 1 1 H、及びh # 3 2 A 1 - T 1 2 H のアミノ酸配列を示した図である。

[図40] h # 3 2 A 1 - T 7 L、h # 3 2 A 1 - T 8 L、h # 3 2 A 1 - T 9 L、h # 3 2 A 1 - T 1 0 L、及びh # 3 2 A 1 - T 1 1 L のアミノ酸配列

を示した図である。

[図41] h # 3 2 A 1 - T 1 2 L、h # 3 2 A 1 - T 1 3 L、h # 3 2 A 1 - T 1 4 L、h # 3 2 A 1 - T 1 5 L、及びh # 3 2 A 1 - T 1 6 Lのアミノ酸配列を示した図である。

[図42] h # 3 2 A 1 - T 1 7 L、h # 3 2 A 1 - T 1 8 L、h # 3 2 A 1 - T 1 9 L、h # 3 2 A 1 - T 2 0 L、及びh # 3 2 A 1 - T 2 1 Lのアミノ酸配列を示した図である。

[図43] h # 3 2 A 1 - T 2 2 L、h # 3 2 A 1 - T 2 3 L、h # 3 2 A 1 - T 2 4 L、及びh # 3 2 A 1 - T 2 5 Lのアミノ酸配列を示した図である。

[図44] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 ヒト化抗体 (h # 3 2 A 1 - T 1、h # 3 2 A 1 - T 2、h # 3 2 A 1 - T 3) の添加による、マウス破骨細胞形成の抑制を T R A P 酵素活性で示したグラフである。なお、図中のラット # 3 2 A 1 抗体は、図 4 4 及び図 4 5 で共通の陽性コントロールである。

[図45] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 ヒト化抗体 (h # 3 2 A 1 - T 4、h # 3 2 A 1 - T 5、h # 3 2 A 1 - T 6) の添加による、マウス破骨細胞形成の抑制を T R A P 酵素活性で示したグラフである。

[図46] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 ヒト化抗体 (h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 5、h # 3 2 A 1 - H 5 / L 5) の添加による、マウス破骨細胞形成の抑制を T R A P 酵素活性で示したグラフである。なお、図中のラット # 3 2 A 1 抗体及び # 3 2 A 1 ヒトキメラ抗体は、図 4 6 及び図 4 7 で共通の陽性コントロールである。

[図47] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 ヒト化抗体 (h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 6、h # 3 2 A 1 - H - 1 / L 2 - 1 5) の添加による、マウス破骨細胞形成の抑制を T R A P 酵素活性で示したグラフである。

[図48] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 ヒト化抗体 (h # 3 2 A 1 - T 1、h # 3 2 A 1 - T 2、h # 3 2 A 1 - T 3、h # 3 2 A 1 - T 4、h # 3 2 A 1 - T 5、h # 3 2 A 1 - T 6) 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。なお、図中のラット # 3 2 A 1 抗体

及び#32A1ヒトキメラ抗体は、図48及び図49で共通の陽性コントロールである。

[図49] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 ヒト化抗体 (h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 5、h # 3 2 A 1 - H 5 / L 5、h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 6、h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 1 2 - 5) 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。

[図50] h # 3 2 A 1 - H 5 / L 5 抗体の熱安定性を測定したサーモグラムである。

[図51] h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 5 抗体の熱安定性を測定したサーモグラムである。

[図52] h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 1 2 - 5 抗体の熱安定性を測定したサーモグラムである。

[図53] h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 6 抗体の熱安定性を測定したサーモグラムである。

[図54] h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 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55] h # 3 2 A 1 - H 5 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56] h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 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57] h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 6 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。

発明を実施するための形態

[0012] 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。

[0013] 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。

- [0014] 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。
- [0015] 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。
- [0016] 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。
- [0017] 本明細書中において、「S i g l e c - 1 5」は、S i g l e c - 1 5 蛋白質と同じ意味で用いている。
- [0018] 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。
- [0019] 本明細書中における「抗体の機能性断片」とは、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、F a b、F (a b ') 2、F v、s c F v、d i a b o d y、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 (a b ') 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F a b ' も抗体の機能性断片に含まれる。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、これらの機能性断片には、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。
- [0020] 本明細書における、「エピトープ」とは、特定の抗S i g l e c - 1 5 抗体の結合するS i g l e c - 1 5 の部分ペプチドまたは部分立体構造を意味する。前記のS i g l e c - 1 5 の部分ペプチドであるエピトープは、免疫アッセイ法等当業者によく知られている方法によって決定することができるが、例えば以下の方法によって行うことが出来る。S i g l e c - 1 5 の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いることが出来る。例えば、S i g l e c - 1 5 のC末端あるいはN末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反

応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、さらに短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。又、特定の S i g l e c - 1 5 抗体の結合する S i g l e c - 1 5 の部分立体構造であるエピトープは、X線構造解析によって前記の抗体と隣接する S i g l e c - 1 5 のアミノ酸残基を特定することによって決定することができる。第一の抗 S i g l e c - 1 5 抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に第二の抗 S i g l e c - 1 5 抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープを有すると判定することができる。また、第一の抗 S i g l e c - 1 5 抗体の S i g l e c - 1 5 に対する結合に対して第二の抗 S i g l e c - 1 5 抗体が競合する（すなわち、第二の抗体が第一の抗体と S i g l e c - 1 5 の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープを有すると判定することができる。さらに、第一の抗体と第二の抗体が共通のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗原の中和活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様な活性を有することが期待できる。

[0021] 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（C D R : C o m p l e m e t a r i t y d e t e r r i n g r e g i o n）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（h y p e r v a r i a b l e d o m a i n）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 C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3 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 C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3 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。

[0022] 本発明において、「ストリンジেন্ট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。

[0023] 1. *Singlec-15*

本発明者らによって、*Singlec-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 *Singlec-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。

[0024] 本発明で用いる *Singlec-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髓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、*Singlec-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、*Singlec-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 *Singlec-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。

[0025] ヒト *Singlec-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、配列表の配列番号1にも示されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号2に示されている。マウス *Singlec-15* のcDNAのヌクレオチド配列は、Gen

B a n k にアクセスション番号：X M _ 8 8 4 6 3 6 で登録され、配列表の配列番号 3 にも示されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号 4 に示されている。シグナル配列が除かれた成熟ヒト S i g l e c - 1 5 は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 2 1 番目から 3 2 8 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。また、シグナル配列が除かれたマウス S i g l e c - 1 5 は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の 2 1 番目から 3 4 1 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。なお、S i g l e c - 1 5 は、C D 3 3 a n t i g e n - l i k e 3、C D 3 3 m o l e c u l e - l i k e 3、C D 3 3 - l i k e 3 又は C D 3 3 L 3 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。

[0026] S i g l e c - 1 5 の c D N A は例えば、S i g l e c - 1 5 の c D N A を発現している c D N A ライブラリーを鋳型として、S i g l e c - 1 5 の c D N A 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「P C R」という）（S a i k i , R . K . , e t a l . , S c i e n c e , (1 9 8 8) 2 3 9 , 4 8 7 - 4 9）を行なう、いわゆる P C R 法により取得することができる。

[0027] なお、配列表の配列番号 1 及び 3 から選択される少なくともいずれか一つに示され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、S i g l e c - 1 5 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 S i g l e c - 1 5 の c D N A に含まれる。さらに、ヒト若しくはマウス S i g l e c - 1 5 遺伝子座から転写されるスプライシングバリエーション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、S i g l e c - 1 5 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 S i g l e c - 1 5 の c D N A に含まれる。

[0028] また、配列表の配列番号 2 及び 4 から選択される少なくともいずれか一つに示されるアミノ酸配列、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、S i g l e c - 1 5 と同等の生物活性を有する蛋白質も S i g l e c - 1 5 に含まれる。さらに、ヒト若しくはマウス S i g l e c - 1 5 遺伝子座から転写されるスプライシングバリエーション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、S i g l e c - 1 5 と同等の生物活性を有する蛋白質も S i g l e c - 1 5 に含まれる。

[0029] 2. 骨代謝異常の検出

S i g l e c - 1 5 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 (B u l l o u g h e t a l . , A t l a s o f O r t h o p e d i c P a t h o l o g y 2 n d e d i t i o n , p p 1 7 . 6 - 1 7 . 8 , L i p p i n c o t t W i l l i a m s & W i l k i n s P u b l i s h e r s (1 9 9 2)) 巨細胞腫 (G i a n t c e l l t u m o r ; G C T) 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。

[0030] また、S i g l e c - 1 5 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。

[0031] したがって、S i g l e c - 1 5 は G C T 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、S i g l e c - 1 5 遺伝子及び／又は S i g l e c - 1 5 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 S i g l e c - 1 5 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、腎性骨異常栄養症、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。

[0032] 本発明においてS i g l e c - 1 5 遺伝子及び／又はS i g l e c - 1 5 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、脾臓、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。

[0033] 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（Y o u n g - Y u n K o n g , e t . a l . , N a t u r e (1 9 9 9) 3 9 7 , p . 3 1 5 - 3 2 3）。S i g l e c - 1 5 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、S i g l e c - 1 5 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。

[0034] 3. 抗S i g l e c - 1 5 抗体の製造

本発明のS i g l e c - 1 5 に対する抗体は、常法を用いて、S i g l e c - 1 5 又はS i g l e c - 1 5 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S i g l e c - 1 5 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S i g l e c - 1 5 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S i g l e c - 1 5 に結合する抗体とヒトS i g l e c - 1 5 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。

[0035] また、公知の方法（例えば、K o h l e r a n d M i l s t e i n , N a t u r e (1 9 7 5) 2 5 6 , p . 4 9 5 - 4 9 7、Kennet, R. ed., M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , p . 3 6 5 -

367, Plenum Press, N. Y. (1980)) に従って、S i g l e c - 1 5 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。

[0036] なお、抗原となる S i g l e c - 1 5 は S i g l e c - 1 5 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。

[0037] 具体的には、S i g l e c - 1 5 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 S i g l e c - 1 5 を精製すればよい。以下、具体的に S i g l e c - 1 5 に対する抗体の取得方法を説明する

(1) 抗原の調製

抗 S i g l e c - 1 5 抗体を作製するための抗原としては、S i g l e c - 1 5 又はその少なくとも 6 個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

[0038] S i g l e c - 1 5 は、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、S i g l e c - 1 5 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。

[0039] 遺伝子操作では、具体的には、S i g l e c - 1 5 の c D N A 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 S i g l e c - 1 5 を発現させることにより、抗原を得ることが出来る。

[0040] また、膜蛋白質である S i g l e c - 1 5 の細胞外領域と抗体の定常領域とを連結した融合蛋白質を適切な宿主・ベクター系において発現させることによって、分泌蛋白質として抗原を得ることも可能である。

[0041] S i g l e c - 1 5 の c D N A は例えば、S i g l e c - 1 5 の c D N A

を発現しているcDNAライブラリーを鋳型として、S i g l e c - 1 5 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）（S a i k i , R . K . , e t a l . S c i e n c e (1 9 8 8) 2 3 9 , p . 4 8 7 - 4 8 9 参照）を行なう、いわゆるPCR法により取得することができる。

[0042] ポリペプチドのイン・ビトロ（i n v i t r o）合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム（RTS）を挙げることができるが、これに限定されない。

[0043] 原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i）や枯草菌（B a c i l l u s s u b t i l i s）などを挙げることができる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

[0044] 真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（G l u z m a n , Y . C e l l (1 9 8 1) 2 3 , p . 1 7 5 - 1 8 2、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（U r l a u b , G . a n d C h a s i n , L . A . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 8 0) 7 7 , p . 4 1 2 6 - 4 2 2 0）等がよく用いられているが、これらに限定されない。

[0045] 上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。

[0046] 該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、大腸菌であれば、例えば、LB培地に必要に応

じて、アンピシリン等の抗生物質や I P M G を添加して用いることができる。

[0047] 上記培養により、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。

[0048] 該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。

[0049] また、発現させる組換え蛋白質に 6 残基からなるヒスチジンタグを繋げることにより、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。あるいは、発現させる組換え蛋白質に I g G の F c 領域を繋げることにより、プロテイン A カラムで効率的に精製することができる。

上記方法を組合せることにより容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

[0050] (2) 抗 S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体の製造

S i g l e c - 1 5 と特異的に結合する抗体の例として、S i g l e c - 1 5 と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

[0051] モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。

すなわち、

(a) 抗原として使用する生体高分子の精製、

(b) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、

(c) 骨髓腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、

(d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
(e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
(f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
(g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、
(h) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

[0052] 以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

[0053] (a) 抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製した S i g l e c - 1 5 又はその一部を使用することができる。

[0054] また、S i g l e c - 1 5 発現組換え体細胞より調製した膜画分、又は S i g l e c - 1 5 発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

[0055] (b) 抗体産生細胞の調製

工程 (a) で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

[0056] また、実際に使用するマウス及びラットの系統には特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH

、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R I I I、S J L、SWR、W B、129等が、またラットの場合には、たとえば、W i s t a r、L o w、L e w i s、S p r a g u e、D a w l e y、A C I、B N、F i s c h e r等を用いることができる。

[0057] これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー、等実験動物飼育販売業者より入手することができる。

[0058] このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは B A L B / c 系統が、ラットではW i s t a r及びL o w系統が被免疫動物として特に好ましい。

[0059] また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。

[0060] なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは5～12週齢、さらに好ましくは6～8週齢である。

[0061] S i g l e c - 1 5又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、W e i r, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。

[0062] これらの免疫法のうち、本発明において好適な方法を具体的に示せば、たとえば以下のとおりである。

[0063] すなわち、まず、抗原である膜蛋白質画分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。

[0064] ただし、免疫効率を高めるためには投与方法の併用が好ましく、前半は皮

内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。

[0065] 抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数 3～6 回、投与間隔 2～6 週間が好ましく、投与回数 3～4 回、投与間隔 2～4 週間がさらに好ましい。

[0066] また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等により異なるが、一般には 0.05～5mg、好ましくは 0.1～0.5mg 程度とする。

[0067] 追加免疫は、以上の通りの抗原投与の 1～6 週間後、好ましくは 2～4 週間後、さらに好ましくは 2～3 週間後に行う。

[0068] なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等により異なるが、一般に、例えばマウスの場合には 0.05～5mg、好ましくは 0.1～0.5mg、さらに好ましくは 0.1～0.2mg 程度とする。

[0069] 上記追加免疫から 1～10 日後、好ましくは 2～5 日後、さらに好ましくは 2～3 日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。

[0070] なお、その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

[0071] ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、R1A 法又は ELISA 法を挙げることもできるがこれらの方法に制限されない。

[0072] 本発明における抗体価の測定は、例えば ELISA 法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。

[0073] まず、精製又は部分精製した抗原を ELISA 用 96 ウェルプレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

[0074] さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色に

よる吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

[0075] これらの脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法（例えば、Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495, ; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, p. 511, ; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550, ; Walsh, Nature, (1977) 266, p. 495,) に従って行うことができる。

[0076] 例えば、脾臓細胞の場合には、脾臓を細切して細胞をステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地（MEM）に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的方法を採用することができる。

[0077] （c）骨髓腫細胞（以下、「ミエローマ」という）の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT（Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase）欠損株を用いるのが好ましい。

[0078] すなわち、マウス由来のX63-Ag8（X63）、NS1-ANS/1（NS1）、P3X63-Ag8. U1（P3U1）、X63-Ag8. 653（X63. 653）、SP2/O-Ag14（SP2/O）、MPC11-45. 6TG1. 7（45. 6TG）、FO、S149/5XXO、BU. 1等、ラット由来の210. RSY3. Ag. 1. 2. 3（Y3）等、ヒト由来のU266AR（SKO-007）、GM1500・GTG-A12（GM1500）、UC729-6、LICR-LOW-HMy2（HMy2）、8226AR/NIP4-1（NP41）等である。

[0079] これらのHGPRT欠損株は例えば、American Type Culture Collection（ATCC）等から入手することができる。

[0080] これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地[RPMI

ー1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清（以下「FCS」という）を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下「IMDM」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という）で継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地〔例えば、10% FCSを含むASF104培地（味の素（株）社製）〕で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

[0081] (d) 細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法（Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等）に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。

[0082] そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電氣的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

[0083] このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。

すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量1500~6000、好ましくは2000~4000のポリエチレングリコール溶液中で、30~40℃、好ましくは35~38℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1~10分間、好ましくは5~8分間混合する。

[0084] (e) ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法（Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p. 550）が用いられる。

[0085] この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。

[0086] すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをHAT培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

[0087] (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる（例えば Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照）。これらの方法のうち、特に限界希釈法が好適である。

[0088] この方法では、マイクロプレートにラット胎児由来線維芽細胞株、あるいは正常マウス脾臓細胞、胸腺細胞、腹水細胞などのフィーダー（feeder）を接種しておく。

[0089] 一方、あらかじめハイブリドーマを0.2～0.5個／0.2mlになるように培地中で希釈し、この希釈したハイブリドーマの浮遊液を各ウェルに0.1mlずつ入れ、一定期間毎（例えば3日毎）に約1／3の培地を新しいものに交換しながら2週間程度培養を続けることによってハイブリドーマのクローンを増殖させることができる。

[0090] 抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニン

グを2～4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗S i g l e c - 1 5モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

- [0091] このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株の例としては、WO 09/48072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-S i g l e c - 1 5 H y b r i d o m a #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。また、本明細書の実施例において#32A1抗体以外に取得された抗体についても、同様な方法で抗体名を記載する。#32A1抗体の重鎖可変領域を含む部分断片は、配列表の配列番号28の20乃至167番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する。また、#32A1抗体の軽鎖可変領域配列を含む部分断片は、配列表の配列番号30の21乃至139番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する。

- [0092] (g) ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。

- [0093] このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

- [0094] 本発明における抗体価の測定は、例えば上記(b)の項目で説明したE L I S A法により行うことができる。

- [0095] 以上の方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は-80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

- [0096] クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地

に換えて培養される。

[0097] 大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。

この大量培養における上清から、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

[0098] また、同系統のマウス（例えば、上記のBALB/c）、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

[0099] 腹腔内に投与する場合には、事前（3～7日前）に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane）（プリスタン）等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

[0100] たとえば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、20日後に $10^6 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマ・クローン細胞を、血清を含まない培地中に浮遊（0.5ml）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水がたまったところでマウスより腹水を採取する。

[0101] この方法により、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

[0102] 上記方法により得たモノクローナル抗体は、例えばWeir, D. M. : Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)に記載されている方法で精製することができる。

[0103] すなわち、硫安塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等である。

[0104] 精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、M A b T r a p G I I キット；ファルマシア社製）等を利用することもできる。

[0105] かくして得られるモノクローナル抗体は、S i g l e c - 1 5 に対して高い抗原特異性を有する。

[0106] (h) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの設定は以下のように行うことができる。

[0107] まず、同定法としてはオクテルロニー（O u c h t e r l o n y）法、E L I S A 法、又は R I A 法を挙げることができる。

[0108] オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

[0109] 一方、E L I S A 法又は R I A 法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

[0110] また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

[0111] さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び 280 nm における吸光度 $[1.4 (OD_{280}) = \text{イムノグロブリン } 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。

[0112] (3) その他の抗体

本発明の抗体には、上記 S i g l e c - 1 5 に対するモノクローナル抗体に加え、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た遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（C h i m e r i c）抗体、ヒト化（H u m a n i z e d）抗体、ヒト抗体なども含まれる。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。

[0113] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体

、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 参照)。ラット抗マウス抗体#32A1由来のキメラ抗体の一例として、配列表の配列番号41の20乃至470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43の21乃至237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。

[0114] 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 (国際公開パンフレットWO90/07861) 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、配列表の配列番号51の20乃至140番目のアミノ酸残基、配列番号53の20乃至140番目のアミノ酸残基、配列番号55の20乃至140番目のアミノ酸残基、配列番号57の20乃至140番目のアミノ酸残基、配列番号59の20乃至140番目のアミノ酸残基、配列番号99の20乃至140番目のアミノ酸残基、配列番号101の20乃至140番目のアミノ酸残基、又は配列番号72乃至77に記載のいずれか一つのアミノ酸配列の1乃至121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61の21乃至133番目のアミノ酸残基、配列番号63の21乃至133番目のアミノ酸残基、配列番号65の21乃至133番目のアミノ酸残基、配列番号67の21乃至132番目のアミノ酸残基、配列番号69の21乃至133番目のアミノ酸残基、配列番号71の21乃至133番目のアミノ酸残基、配列番号103の21乃至133番目のアミノ酸残基、配列番号105の21乃至133番目のアミノ酸残基、又は配列番号78乃至96のいずれか一つに記載のアミノ酸配列の1乃至113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任意の組合せを挙げることができる。

- [0115] 好適な組合せとしては、配列番号51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61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からなる抗体、配列番号53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63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からなる抗体、配列番号55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65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からなる抗体、配列番号55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67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からなる抗体、配列番号57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69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からなる抗体、配列番号59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71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からなる抗体、配列番号99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69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からなる抗体、配列番号101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69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からなる抗体、配列番号99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103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からなる抗体、又は配列番号 99 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 105 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からなる抗体を挙げることができる。

[0116] さらに好適な組合せとしては、配列番号 51 の 20 乃至 470 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 61 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、配列番号 53 の 20 乃至 470 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 63 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、配列番号 55 の 20 乃至 470 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 65 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、配列番号 55 の 20 乃至 470 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 67 の 21 乃至 237 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、配列番号 57 の 20 乃至 470 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 69 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、配列番号 59 の 20 乃至 470 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 71 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、配列番号 99 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 69 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、配列番号 101 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 69 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、配列番号 99 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 103 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、又は配列番号 99 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 105 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。

[0117] 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 44 に示されるアミノ酸配列からなる CDRH1 (DYFMN)、配列番号 45 に示されるアミノ酸配列からなる CDRH2 (QIRNKIYTYATFYAESLEG) 又は配列番号 97 に示される CDRH2 (QIRNKIYTYATFYA) のいずれか一つ、及び配列番号 46 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 45 に示される CDRH2 は、Kabat の定義 (SEQUENCE S OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST VOL. I, FIFTH EDITION (1991)) によるものである。配列番号 97 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 47 に示されるアミノ酸配列からなる CDRL1 (RASQSVTISGYSFIH)、配列番号 48 に示されるアミノ酸配列からなる CDRL2 (RASNLAS)、及び配列番号 49 に示されるアミノ酸配列からなる CDRL3 (QQSRKSPWT) を保有している。

[0118] 本発明の抗体としては、さらに、ヒト抗体を挙げることができる。抗 Siglec-15 ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗 Siglec-15 ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用い

た方法 (Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143, ; Kuroiwa, Y. et. al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999. ; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2000) 97, p. 722-727等を参照。)によって取得することができる。

[0119] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクターなどを介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製、及びこれらの動物同士を掛け合わせるにより作り出すことができる。

[0120] また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

[0121] ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0122] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Ca

rmen, S. et. al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et. al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), p. 427-431等参照。)も知られている。

[0123] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (s c F v) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), p. 1105-1116) を用いることができる。

[0124] 抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

[0125] 抗原に結合する s c F v のDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる (WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388、*Annu. Rev. Immunol* (1994) 12, p. 433-455、*Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), p. 1105-1116)。

[0126] 以上の方法によって得られた抗体は、実施例 25 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。実施例 33 で示された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 (T_m) を素早く、また正確に測定することができる装置である。DSC を用いて T_m 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。

[0127] 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機能性断片の一種と解釈することも可能である。

[0128] 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/

3 1 1 4 0等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0129] 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・ハムスター卵巢細胞 (CHO細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Uriaub, 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。

[0130] 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 (IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4)、IgM、IgA (IgA 1, IgA 2)、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IgG 1又はIgG 2を挙げることができる。

[0131] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の機能性断片又はそ

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機能性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機能性断片が保持する機能は、S i g l e c - 1 5 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。

[0132] 例えば、抗体の断片としては、F a b、F (a b ') 2、F v、又は重鎖及び軽鎖のF vを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンF v (s c F v)、d i a b o d y (d i a b o d i e s)、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 (a b ') 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F a b ' も抗体の断片に含まれる。

[0133] 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（b i s p e c i f i c a n t i b o d y））、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。

[0134] 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 (a b ') 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（H L 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（M i l l s t e i n e t a l . , N a t u r e (1 9 8 3) 3 0 5 , p

、 537-539）。

[0135] 本発明の抗体は一本鎖抗体（s c F v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s c F vをポリペプチドリナーで結合させて作製されるB i s c F v断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0136] 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s c F v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ナ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）。s c F v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ナーとしては、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。

[0137] s c F v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ナ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ることで増幅することにより得られる。

- [0138] また、一旦 s c F v をコードする DNA が作製されると、それらを含む発現ベクター、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 s c F v 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。
- [0139] 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、I g G C H 3 ドメインと2つの s c F v との結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスターン-ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。
- [0140] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗 S i g l e c - 1 5 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、C D R 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（WO 2 0 0 4 / 0 6 1 1 0 4 号参照）。
- [0141] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（P E G）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。
- [0142] 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（I m m u n o c o n j u g a t e）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（N a t u r e B i o t e c h n o l o g y （2 0 0 5）2 3, p. 1 1 3 7 - 1 1 4 6）。
- [0143] 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

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 (1996); 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 4. 抗S i g l e c - 1 5抗体を含有する医薬

上述の「3. 抗S i g l e c - 1 5抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗S i g l e c - 1 5抗体の中から、S i g l e c - 1 5の生物活性を中和する抗体を得ることができる。これらS i g l e c - 1 5の生物活性を中和する抗体は、生体内でのS i g l e c - 1 5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 S i g l e c - 1 5 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 S i g l e c - 1 5 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জেット病、腎性骨異常栄養症、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 S i g l e c - 1 5 抗体の例として、# 3 2 A 1 抗体から 3. (3) 「その他の抗体」に記載の方法によって作製されたキメラ抗体又はヒト化抗体を挙げることができる。また、# 3 2 A 1 抗体と同じエピトープを有するキメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体も医薬として使用可能である。ある抗 S i g l e c - 1 5 抗体が、# 3 2 A 1 抗体と同じエピトープを持つことは、S i g l e c - 1 5 の特定の部分ペプチドに対してこれらの抗体が共通に結合するか否かを観察することによって確認できる。また、ある抗 S i g l e c - 1 5 抗体が、S i g l e c - 1 5 との結合において # 3 2 A 1 抗体と競合するのであれば、これらの抗体が共通のエピトープを持つと判定することができる。

[0149] i n v i t r o での抗 S i g l e c - 1 5 抗体による S i g l e c - 1 5 の生物活性の中和活性は例えば、S i g l e c - 1 5 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 R A W 2 6 4 . 7 細胞又は R A W 2 6 4 細胞に種々の濃度で抗 S i g l e c - 1 5 抗体を添加し、R A N K L あるいは T N F - 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S i g l e c - 1 5抗体を添加し、RANKL、TNF- α あるいは活性型ビタミンD₃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S i g l e c - 1 5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S i g l e c - 1 5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S i g l e c - 1 5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S i g l e c - 1 5を過剰に発現しているトランスジェニック動物に抗S i g l e c - 1 5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。

[0150] このようにして得られたS i g l e c - 1 5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。

[0151] 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 E 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。

- [0152] 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D₃、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K₂（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TNF α 抗体又は該抗体の機能性断片（例えば、infliximab）

、抗PTHrP (parathyroid hormone-related protein) 抗体又は該抗体の機能性断片、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機能性断片 (例えば、tocilizumab)、抗RANKL抗体又は該抗体の機能性断片 (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薬剤を投与することもできるし、それらの薬剤は同じ製剤の中に封入することによって同時に供給することができる。それらの薬剤と抗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供給することもできる。また、それらの薬剤は治療及び／又は予防用キットとして封入することによって同時に供給することもできる。また、それらの薬剤と抗Siglec-15抗体は別々に供給することもできる。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。

- [0153] 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

r 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。

[0154] 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。

[0155] 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D₃、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K₂（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TNF α 抗体又は該抗体の機能性断片（例えば、infliximab）、抗PTHrP（parathyroid hormone-related protein）抗体又

は該抗体の機能性断片、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機能性断片（例えば、*tocilizumab*）、抗RANKL抗体又は該抗体の機能性断片（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。

[0156] 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。

[0157] 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、トリスー塩酸（*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。

[0158] 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る、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。

[0159] 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*Siglec-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（*K_d*値）に対し、親和性が高い（*K_d*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S i g l e c - 1 5抗体をヒトに対して投与する際には、約0. 1 ~ 1 0 0 m g / k gを1 ~ 1 8 0日間に1回投与すればよい。

[0160] 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。

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 (M o l e c u l a r C l o n i n g)」 (S a m b r o o k, J., F r i t s c h, E. F. 及びM a n i a t i s, T. 著, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s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。

実施例 1

[0161] 可溶型マウスS i g l e c - 1 5蛋白質の発現コンストラクトの作製

マウスS i g l e c - 1 5蛋白質の細胞外領域をコードする部分のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号5であり、アミノ酸配列は、配列表の配列番号6である。このような部分配列を利用することにより、動物細胞などの培養上清中に可溶型マウスS i g l e c - 1 5蛋白質を産生させることができる。

[0162] a) 可溶型マウスS i g l e c - 1 5遺伝子のPCRによる増幅

マウスS i g l e c - 1 5の細胞外領域cDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして

5' - g g g g a c a a g t t t g t a c a a a a a a g c a g g c t
t c a c c A T G G A G G G G T C C C T C C A A C T C - 3' (m
S i g l e c - 1 5 - E C D - F : 配列表の配列番号7)

及び

5' - g g g g a c c a c t t t g t a c a a g a a a g c t g g g t
c T C C G G G G G C G C C G T G G A A G C G G A A C - 3' (m
S i g l e c - 1 5 - E C D - R : 配列表の配列番号 8) 、

の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。なお、これらのプライマーは、G a t e w a y エントリークローン作製用増幅用プライマーとして、m S i g l e c - 1 5 - E C D - F には a t t B 1 配列が、m S i g l e c - 1 5 - E C D - R には a t t B 2 配列が付加されるように設計した。このプライマーの組み合わせと、テンプレートとしてマウス S i g l e c - 1 5 のオープンリーディングフレーム配列を含むポリヌクレオチドを用い、常法に従い P C R を行った。サーマルサイクラーの設定条件は、94℃で5分間加熱した後、「94℃で0.5分、55℃で0.5分、68℃で1.5分」の温度サイクルを15回繰り返してから、68℃で5分加熱し、4℃で保温とした。

[0163] b) G a t e w a y B P 反応によるエントリークローンの作製

λファージの部位特異的組換えシステムを応用した G a t e w a y テクノロジー（インビトロジェン社）により、マウス S i g l e c - 1 5 細胞外領域の c D N A を組み込んだエントリークローンを以下の方法で作製した。まず、a) で作製した、a t t B 配列を両端に持つ P C R 産物と、a t t P 配列を有するドナーベクターである p D N O R 2 2 1（インビトロジェン社製）との間で、B P クロナーゼを用いた B P 反応を行った。この反応液を用いて大腸菌 D H 1 0 B を形質転換し、薬剤耐性クローンに対してコロニー P C R を行い、インサートサイズを確認した。インサートのサイズが正しく確認されたクローンについて、インサートの全 D N A 配列のシーケンス解析を実施した結果、目的とするマウス S i g l e c - 1 5 蛋白質の細胞外領域をコードするヌクレオチド配列（配列表の配列番号 5）と完全に一致するエントリークローンが得られた。

[0164] c) G a t e w a y L R 反応による発現クローンの作製

λファージの部位特異的組換えシステムを応用したGatewayテクノロジー（インビトロジェン社）により、マウス*Siglec-15*細胞外領域のcDNAを組み込んだ発現クローンを以下の方法で作製した。b)で作製したエントリークローンは、インサートの両端にattL配列を有している。このエントリークローンと、attR配列を有する2種類のディストネーションベクターとの間でLRクロナーゼを用いたLR反応を行った。なおディストネーションベクターは、インサートのC末側にV5エピトープと6×Hisタグが付加される様に設計されたpDONM、及びインサートのC末側にヒトFcタグが付加されるように設計されたpHlgFcの2種類を用いた。LR反応により得られた反応液を用いて大腸菌DH10Bを形質転換し、得られた薬剤耐性クローンに対してコロニーPCRを行い、インサートサイズを確認した。インサートのサイズが正しく確認されたクローンについて、インサート側からベクター側への両末端のシーケンス解析を行った。

[0165] シーケンス用プライマー配列：

5' - t g c g t g a a g g t g c a g g g c a g - 3' (m*Siglec-15*-ECD-seq-upstm：配列表の配列番号9)

及び

5' - c c t c g c c t g g t c g g g t c - 3' (m*Siglec-15*-ECD-seq-dnstm：配列表の配列番号10)

シーケンス解析の結果、pDONM及びpHlgFcの両方で正しく組換えわたった発現クローン（可溶型マウス*Siglec-15*/pDONM及び可溶型マウス*Siglec-15*/pHlgFc）が、それぞれ得られた。可溶型マウス*Siglec-15*/pDONMを動物細胞などにトランスフェクションすることにより、配列表の配列番号11に記載した塩基配列を有するmRNAが転写され、配列表の配列番号12に記載したアミノ酸配列を有する蛋白質（マウス*Siglec-15*-His）が翻訳される。可溶型マウス*Siglec-15*/pHlgFcを動物細胞などにトランスフェク

ショウすることにより、配列表の配列番号 13 に記載した塩基配列を有する mRNA が転写され、配列表の配列番号 14 に記載したアミノ酸配列を有する蛋白質 (マウス Ig15-Fc) が翻訳される。

実施例 2

[0166] 293-F 細胞を用いた可溶性マウス Ig15 蛋白質含有培養液の大量調製

実施例 1 で得られた 2 種類の発現ベクター (可溶性マウス Ig15/pDONM 及び可溶性マウス Ig15/phiGFC) をそれぞれ約 5mg 調製した。なお、大量培養した大腸菌からのプラスミド精製には、インビトロジェン PureLink HiPure Plasmid GigaPrep Kit (インビトロジェン社製) を使用した。調製したプラスミドを Opti-MEM (インビトロジェン社製) と混合し、フィルター滅菌した後トランスフェクション試薬である 293fectin (インビトロジェン社製) を 10 μ l 添加して室温で 20 分間インキュベーションした。この混和液を、FreeStyle 293 Expression Medium (1L/フラスコを 5 本) となるようにエルンブライフラスコ中で培養した FreeStyle 293-F 細胞 (インビトロジェン社製) に添加した。8.0% CO₂ 濃度、37°C で 96 時間 (4 日間) 回転培養 (125 回転/分) した後培養液を回収し、遠心分離後培養上清を調製した。このようにして調製した培養上清中には、マウス Ig15 の細胞外領域 C 末側に V5 エピトープと 6 $\times$ His タグが付加された蛋白質 (マウス Ig15-His) 及び C 末側に His タグが付加された蛋白質 (マウス Ig15-Fc) が、それぞれ発現すると考えられる。

実施例 3

[0167] マウス Ig15-His の精製

a) HisTrap HP カラムクロマト

実施例 2 で調製したマウス IgG 15-His 発現 293F 細胞の培養液 2 L に 225 ml の 10x buffer (500 mM Tris

s, 1.5 M NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8.0) を加えて良く攪拌した後に Sterilex GVフィルター (ミリポア社

製) でろ過した。この培養液を、予めパイロジェン除去剤・Pyrocle

AN (ALERECHK 社製) で処理して注射用蒸留水で洗浄しておいた H

istrap HP 5 mL の 3 本直列カラム (アミバイオサイエンス

社製) に流速 2 ml/min でかけた。300 mM NaCl を含む 50

mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 60 ml を用いて流速 1 ml/min でカラムを洗浄した後に、300 mM NaCl, 500 mM

Imidazole を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0

) 50 ml を用いて流速 1 ml/min でカラムに吸着している蛋白質を

溶出した。溶出した液は、予め 10% Tween 20 10 μ l を加え

ておいた Minisorp tube (マシラ社製) に 1 ml/Fr. に

て分取した。溶出された蛋白質を含む画分約 20 ml (Fr. 14-20)

を遠心膜濃縮器 Amicon Ultra-15 (ミリポア社製) で 2.5

ml に濃縮した後に、0.01% Tween 20 を含む リン酸塩緩衝生

理食塩水 (TPBS) で平衡化しておいた PD-10 脱塩カラム (アミ

バイオサイエンス社製) にかけて、TPBS で溶出して、溶媒を TP

BS に置換したサンプル 3.5 ml を得た。

[0168]

b) Resource Q カラムクロマト

Histrap HP カラムクロマトで精製した TPBS 置換サンプ

ル 3.5 ml に 0.1% CHAPS を含む 50 mM Tris-HCl

緩衝液 (pH 7.5) 22.5 ml を加えて攪拌した後に、4°C、3.00

0 r.p.m. にて 30 分間遠心して沈殿物を除去した。この上清液を M

ilex GVフィルター (ミリポア社製) でろ過した後、0.1% CH

APS を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で予め

平衡化しておいた Resource Q 6 mL カラム (アミバイオ

サイエンス社製)に流速1 ml/minでかけ、引き続きこの緩衝液を用いて流速1 ml/minでカラムを洗浄して、カラムに吸着しない蛋白質画分を集めた。カラムに吸着した蛋白質は、0.1% CHAPS, 1M NaClを含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を用いて流速1 ml/minで溶出した。カラムに吸着しなかった画分26.5 mlを、遠心膜濃縮器Amicon Ultra-15(ミリポア社製)で2.0 mlに濃縮した後に、4°C、3,000 r.p.m.にて10分間遠心して沈殿物を除去した。遠心後の上清液は使用するまで-80°Cで凍結保存した。以上の精製操作(HisTrap HPカラムクロマト、Resource Qカラムクロマト)を2回繰り返して実施した。

[0169] c) 精製したマウスSiglec-15-Hisの検出と純度検定

上記の精製操作(HisTrap HPカラムクロマト、Resource Qカラムクロマト)で調製したサンプルを用いて還元条件下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色を行った。即ち各精製ステップのサンプル5 µlに同量のSDS-処理液を加えて、95°Cで10分間熱処理した。熱処理した各サンプル0.3 µlをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に使用した。電気泳動のゲルとして8-25%ポリアクリルアミドグラジエントゲル(アマシャムバイオサイエンス社製)を用い、電気泳動はPhast System(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて実施した。また分子量マーカーとしてレインボー分子量マーカー(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いた。電気泳動終了後にPhastGel Silver Kit(アマシャムバイオサイエンス社製)とPhast Systemを用いて銀染色を行い、その結果を図1に示した。Resource Qカラムに吸着しなかった蛋白質画分に分子量約35 kDaの蛋白質(マウスSiglec-15-His)が効率的に精製濃縮されたことが示された。

[0170] 分子量マーカーとしてECL DualVue Western Blotting Markers、アマシャムバイオサイエンス社製)を用いた以外は上記と同じ条件で電気泳動したゲル中の蛋白質を、PhastTra

nsfer Semi-dry Transfer Kit (アマシャムバイオサイエンス社製)とPhast Systemを用いてPVDF膜 (Hybond-P、アマシャムバイオサイエンス社製)に転写 (ブロット)した。このPVDF膜を0.1% Tween 20を含むブロッキング剤 (Block Ace、雪印乳業社製) 10ml中室温で1時間緩やかに振とうした。このブロッキング溶液にS-protein HRP (アマシャムバイオサイエンス社) 10 μ lと抗V5-HRP抗体 (Monoclonal Antibody to Pk-TAG-HRP、Acris Antibodies社製) 10 μ lを加えて、更に室温で1時間緩やかに振とうした。PVDF膜を0.01% Tween 20を含むリン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) 50ml中で緩やかに振とうしながら5分間4回洗浄した。洗浄後このPVDF膜をECL detection kit (アマシャムバイオサイエンス社)のプロトコールに従って処理して、蛋白質のバンドの発色をECL mini-camera (アマシャムバイオサイエンス社) ポラロイドフィルム (Polapan 3200B、ポラロイド社)で検出した。結果を図2に示した。この結果からも、抗V5-HRP抗体に反応する分子量約35kDaの蛋白質 (マウスSiglec-15-His)がResource Qカラムに吸着しなかった蛋白質画分に効率良く精製濃縮されたことが確認できた。

[0171] d) 精製したマウスSiglec-15-Hisの蛋白質濃度の測定

精製マウスSiglec-15-His (Resource Qカラムに吸着しなかった蛋白質画分)について、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして用い、DC-Protein Assay kit (BioRad社製)で蛋白質濃度を測定した。表1に示したように、2回の精製操作で合計1.66mgの精製マウスSiglec-15-His蛋白質を得た。

[0172]

[表1]

	Protein Conc. (mg/ml)	Sample Vol. (ml)	Total protein (mg)
1 st .	0.475	2.0	0.95
2 nd .	0.354	2.0	0.71
Total			1.66

実施例 4

[0173] マウス S i g l e c - 1 5 - F c の精製

a) H i T r a p p r o t e i n A カラムクロマト

実施例2で調製したマウス S i g l e c - 1 5 - F c 発現 2 9 3 F 細胞の培養液 1.8 L を S t e r i v e x G V フィルター（ミリポア社製）でろ過した後、予めダルベッコ PBS（D-PBS、インビトロジェン社製）で平衡化しておいた H i T r a p p r o t e i n A 5 mL カラム（アマシャムバイオサイエンス社製）に流速 5 mL/min でかけた。D-PBS を用いて流速 5 mL/min でカラムを洗浄した後に、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0）50 mL を用いて流速 5 mL/min でカラムに吸着している蛋白質を溶出した。溶出した液は、M i n i - s o r p t u b e（ヌンク社製）に 5 mL/Fr. にて分取した後に、1 M T r i s 1.3 mL を直ちに加えて中和した。溶出された蛋白質が検出された画分（Fr. 1, 2）を遠心膜濃縮器 A m i c o n U l t r a - 1 5（ミリポア社製）で 2.5 mL に濃縮した後に、0.01% T w e e n 20 を含む大塚注射用生理食塩水（T O - S S、大塚製薬社製）で平衡化しておいた P D - 1 0 脱塩カラム（アマシャムバイオサイエンス社製）にかけて T O - S S で溶出して、溶媒を T O - S S に置換したサンプル 3.5 mL を得た。このサンプルは、使用するまで - 8 0 °C で凍結保存した。2.9 L の 2 9 3 F 細胞の培養液を用いて、同様の精製操作を更に 1 回繰り返して実施した。

[0174] b) 精製したマウス S i g l e c - 1 5 - F c の検出と純度検定

上記の精製操作で調製したサンプルを用いて還元条件下のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色を行った。即ち各精製ステップのサンプル5 μ lに同量のSDS-処理液を加えて、95°Cで10分間加熱した。熱処理した各サンプルを1/2濃度のSDS-処理液で1/300又は1/900倍希釈したサンプル0.3 μ lをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に使用した。電気泳動と銀染色は実施例3、c)に記載のマウスSiglec-15-Hisの純度検定と同様の方法で実施して、その結果を小スケールでの予備精製条件検討の結果（アプライした培養液のpHが8.9又は7.0）と共に図3に示した。HiTrap protein A カラムから溶出した蛋白質画分に分子量約55 kDaの蛋白質（マウスSiglec-15-Fc）が効率的に精製濃縮されたことが示された。

[0175] c) 精製したマウスSiglec-15-Fcの蛋白質濃度の測定

精製マウスSiglec-15-Fc（PD-10脱塩カラムから溶出された蛋白質画分）について、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして用い、DC-Protein Assay kit（BioRad社製）で蛋白質濃度を測定した。表2に示したように、2回の精製操作で合計92 mgの精製マウスSiglec-15-Fc蛋白質を得た。

[0176] [表2]

	Protein Conc. (mg/ml)	Sample Vol. (ml)	Total Protein (mg)
1 st .	8.0	3.5	28
2 nd .	18.5	3.5	64
Total			92

実施例 5

[0177] ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

a) 抗原の調製

実施例3で作製した、マウスSiglec-15-His蛋白質を100

$\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ となるように調製し、アジュバントを同量加えガラスシリンジにてエマルジョンを作製した。なおアジュバントは、初回免疫時のみ Freund's Complete Adjuvant (FCA、ディフコ社製) を使用し、2回目以降 Freund's Incomplete Adjuvant (FICA、ディフコ社製) を使用した。

[0178] b) ラットへの免疫

ラット (Wistar、雌、6週齢、日本クレア社より購入) 4匹を免疫動物として使用した。a) で得られたエマルジョンを、抗原量が $50\mu\text{g}/$ ラットとなるよう皮下及び皮内に 27G 注射針を用いて注射した。以降 7 日毎に合計 4 回の免疫を実施した。4 回目の免疫から 7 日後に尾静脈より少量 ($200\mu\text{l}$) 採血し、抗血清を調製した。抗血清の抗体価を確認するため、抗原として用いたマウス Siglec-15-His 蛋白質、実施例 4 で作製したマウス Siglec-15-Fc 蛋白質、あるいはウシ血清アルブミン (BSA) を固相化した ELISA を実施した。その結果、4 匹のラット (ラット No. 1~4) の何れにおいてもマウス Siglec-15-His 蛋白質及びマウス Siglec-15-Fc 蛋白質への反応性が認められた。一方、BSA への反応性は認められなかった。以上より、免疫したラットの血清中抗体価が上昇していることが確認されたため、抗体価が最も高かった No. 2 ラットについて細胞融合操作へ進めた。

[0179] c) 細胞融合

細胞融合は、一般的なマウス (ラット) 脾臓細胞とミエローマ細胞との融合に従って実施した。ラットをエーテル麻酔下で心臓より全採血して安楽死させ、その後脾臓を摘出した。採取した脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞である P3X63Ag8.653 細胞 (ATCC CRL 1580) を、ポリエチレングリコール (PEG) を用いて細胞融合させた。96 穴プレートに細胞を播種し、hypoxanthine (H)、aminopterin (A)、thymidine (T) を含有した培地 (HAT 選択培地) を添加して 7~10 日間培養した。細胞融合したハイブリドーマの生存が

確認された61穴の培養上清を採取し、抗原として用いたマウスS i g l e c - 1 5 - H i s 蛋白質、実施例4で作製したマウスS i g l e c - 1 5 - F c 蛋白質、あるいはB S Aを固相化したE L I S Aにて抗体価を評価し、抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。スクリーニングの結果から、抗体価の高い12穴を選抜し、その中のハイブリドーマをクローニング操作へ進めた。

[0180] d) ハイブリドーマのクローニング

選抜したハイブリドーマについて、限界希釈法により1次クローニングした。限界希釈後の培養は2週間行い、培養上清中の抗体価の確認を、実施例4で作製したマウスS i g l e c - 1 5 - F c 蛋白質あるいはB S Aを固相化したE L I S Aにて実施した。陽性クローンと認められた11クローンについて、さらに2次クローニングを実施（1次クローニングと同様の作業）することにより、最終的に抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを10クローン（#1A1、#3A1、#8A1、#24A1、#32A1、#34A1、#39A1、#40A1、#41B1、#61A1）樹立した。なお、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、a n t i - S i g l e c - 1 5 H y b r i d o m a # 3 2 A 1 の名称で受託番号FERM BP-10999が付与されている。

実施例 6

[0181] ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体の調製

a) ノードマウス腹水の調製

実施例5で樹立したハイブリドーマを、10% F C S 含有T I L M e d i a I （（株）免疫生物研究所製）培地を用いて培養した。なお細胞の継代は 5×10^5 細胞/ml程度に増殖した時点を目安に4分の1程度に希釈する作業を、2～3日に1度実施した。プリスタン腹腔内に前投与（0.

2 ml / マウス) したヌードマウスに、培養したハイブリドーマを 1×10^7 細胞 / マウスとなるように腹腔内に移植した。移植には、10 クローンのハイブリドーマそれぞれにつき各3匹のヌードマウスを使用した。移植後、腹水の蓄積が十分に見られた時点で腹水を採取し、各ハイブリドーマ3匹分を1つにまとめて採取量を測定後、抗体の精製まで凍結保存した。各ハイブリドーマについて、腹水の採取量を表3にまとめた。

[0182] [表3]

ハイブリドーマ	腹水採取量 (ml)	ハイブリドーマ	腹水採取量 (ml)
#1A1	12.5	#34A1	8.2
#3A1	8.0	#39A1	14.5
#8A1	6.0	#40A1	20.3
#24A1	7.8	#41B1	10.5
#32A1	5.5	#61A1	12.3

[0183] b) 抗体の精製

採取した腹水の全量を、20 ml の Protein G カラム (GE Healthcare 社製) を用いた IgG の精製に供した。精製された IgG はゲルろ過分析 (Superdex 200 カラムクロマト) により純度検定を行い、一部を遠心膜濃縮した。すなわち、精製した抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体の内、# 2 4 A 1 抗体を除く9種類の抗体を、遠心膜濃縮器 Amicon Ultra-15 (ミリポア社製) を用いて 3000 r. p. m. 、4℃で30～60分間遠心することによって約6倍～8倍濃縮した。続いて、# 2 4 A 1 抗体及び濃縮した他の9種類の抗体について、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準サンプルとして用い、D C - P r o t e i n A s s a y K i t (BioRad 社製) で蛋白質濃度を測定した。以上の操作により、抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体を調製した。

実施例 7

[0184] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体のマウス S i g l e

c-15 蛋白質に対する結合性評価

ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体のマウス S i g l e c - 1 5 蛋白質に対する結合性を E L I S A 法により評価した。実施例 4 で作製したマウス S i g l e c - 1 5 - F c 蛋白質を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 0.1 M 炭酸ナトリウムバッファー ($\text{pH} 9.5$) で希釈し、 96 穴プレート (ナルジェヌンク社製、カタログ番号: 430341) に $100 \mu\text{l}$ / 穴添加した。室温で 1 時間放置後に溶液を除去し、 $300 \mu\text{l}$ / 穴の洗浄バッファー (0.05% Tween 20 含有リン酸塩緩衝生理食塩水) を添加して、除去した。この洗浄作業をさらに 1 回行った後、 25% ブロックエース (大日本住友製薬社製) を含むリン酸塩緩衝生理食塩水を $200 \mu\text{l}$ / 穴添加し、室温で 1 時間放置することによりブロッキングを行った。液を除き $300 \mu\text{l}$ / 穴の洗浄バッファーで 2 回洗浄した後、実施例 6 で調製したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体あるいはラットコントロール I g G (R & D Systems 社製) を、E L I S A バッファー (12.5% ブロックエース、 0.05% Tween 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水) を用いて終濃度が $1.28 \sim 20,000 \text{ ng}/\text{ml}$ (5 倍希釈系列) となるように希釈し、 $100 \mu\text{l}$ / 穴添加した。室温で 1 時間放置後に液を除き、 $300 \mu\text{l}$ / 穴の洗浄バッファーで 3 回洗浄した。続いて E L I S A バッファーを用いて $1,000$ 倍希釈した HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) 標識ヤギ抗ラット I g G 抗体 (ベックマンコールター社製) を $100 \mu\text{l}$ / 穴添加し、室温で 1 時間放置した。液を除き、 $300 \mu\text{l}$ / 穴の洗浄バッファーで 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ用発色キット (住友ベークライト社製) を用いて、キットに添付された説明書に従い発色させた。発色後、マイクロプレートリーダー (日本モレキュラーデバイス社製) を用いて 492 nm での吸光度を測定した。その結果、検討したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 10 検体全てにおいて、抗体の濃度に依存したマウス S i g l e c - 1 5 蛋白質への結合が確認された (図 4)。一方ラットコントロール I g G では、マウス S i g l e c -

15 蛋白質への結合が認められなかった。

実施例 8

[0185] マウス骨髄非付着細胞の調製

5～8週齢の雄 ddY マウスより大腿骨と脛骨を摘出し、軟組織を除去した。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した。室温で 100 g、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 1 ml (RED BLOOD CELL LYSING BUFFER、シグマ社製) を加えて懸濁し、室温で 5 分間放置した。20 ml の D-PBS を加えて室温で 100 g、5 分間遠心し、上清を捨てた後に細胞のペレットに 5 ng/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) 10 ml を加えて懸濁し、セルストレイナー (40 μ m Nylon、BD フアルコン社製) を通して凝集物を除いた。この細胞を 75 cm²-T フラスコ (付着細胞用) に移して、CO₂ インキュベーター中で 1 晩培養した。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した。

実施例 9

[0186] ラット抗マウス Siglec-15 モノクローナル抗体のマウス破骨細胞形成試験での生物活性評価

実施例 6 において作製した 10 検体全ての抗マウス Siglec-15 モノクローナル抗体を用い、マウス骨髄非付着細胞の破骨細胞分化への影響を検討した。実施例 8 の方法で調製したマウス骨髄非付着細胞を 10% FBS と 10 ng/ml M-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 200 μ l 播種して、CO₂ インキュベーター中で 2 日間培養した。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 20 ng/ml、M-CSF を 10 ng/ml

1になるように添加した10% FBS含有MEM- α 培地100 μ lを添加した。この細胞培養液に、実施例6で作製したラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体、市販のラットコントロールI g G (P u r i f i e d R a t I g G、R & D S y s t e m s社製)よりアジ化ナトリウムを除去したサンプル、及び別途作製したウサギ抗マウスS i g l e c - 1 5ポリクローナル抗体(N o. 3)を32~1,000ng/mlの濃度になるように添加して、更に3日間CO₂インキュベーター中で培養した。なお、ポリクローナル抗体(N o. 3)は、本実施例に記載の実験系において破骨細胞形成を阻害することが既に確認されている抗体である。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(T R A P)活性を以下の操作で測定した。96穴プレートの各ウェルの培養液を吸引除去して、1% T r i t o n X - 1 0 0を含有する50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.1)50 μ l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した。これらの各ウェルに基質溶液(5mg/ml p - n i t r o p h e n y l p h o s p h a t e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))50 μ lを加えて室温で5分間インキュベートした。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50 μ lを加えて酵素反応を停止した。酵素反応停止後に各ウェルの405nmの吸光度を測定してT R A P活性の指標にした。結果を図5及び6に示した。市販のラットコントロールI g Gでは顕著なT R A P活性の抑制は認められなかった。その一方で、#32A1抗体では32ng/mlから1000ng/mlの範囲で、#8A1抗体とアフィニティー精製ウサギポリクローナルN o. 3抗体では63ng/mlから1000ng/mlの範囲で、顕著なT R A P活性の抑制が認められた。また#3A1抗体、#34A1抗体、#39A1抗体においても、500ng/ml以上の比較的高濃度においてT R A P活性の用量依存的な抑制が認められた。その他の抗体によるマウス破骨細胞形成の抑制は認められなかった。以上の結果より、調製したラット抗マ

ウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体の中に、マウスの破骨細胞形成（破骨細胞の分化と成熟）を強く抑制する抗体が見出された。また、# 3 A 1抗体、# 8 A 1抗体、# 3 2 A 1抗体、# 3 4 A 1抗体、# 3 9 A 1抗体に共通な性質として、1 0 0 0 n g / m l、すなわち1 μ g / m l以下の濃度において破骨細胞形成を阻害する作用を挙げることができる。

実施例 10

[0187] 可溶型ヒトS i g l e c - 1 5蛋白質の発現コンストラクトの作製

ヒトS i g l e c - 1 5蛋白質の細胞外領域をコードする部分のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号15であり、アミノ酸配列は、配列表の配列番号16である。このような部分配列を利用することにより、動物細胞などの培養上清中に可溶型ヒトS i g l e c - 1 5蛋白質を産生させることができる。

[0188] a) 可溶型ヒトS i g l e c - 1 5遺伝子のPCRによる増幅

ヒトS i g l e c - 1 5の細胞外領域cDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして

5' - g g g g a c a a g t t t g t a c a a a a a a g c a g g c t
t c a c c A T G G A A A A G T C C A T C T G G C T G C - 3' (h S i g l e c - 1 5 - E C D - F : 配列表の配列番号17)

及び

5' - g g g g a c c a c t t t g t a c a a g a a a g c t g g g t
c C C C G C T G G C G C C A T G G A A G C G G - 3' (h S i g l e c - 1 5 - E C D - R : 配列表の配列番号18)、

の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。なお、これらのプライマーは、G a t e w a y エントリークローン作製用増幅用プライマーとして、h S i g l e c - 1 5 - E C D - Fにはa t t B 1配列が、h S i g l e c - 1 5 - E C D - Rにはa t t B 2配列が付加されるように設計した。このプライマーの組み合わせと、テンプレートとしてヒトS i g l e c - 1 5のオープンリーディング配列を含むポリヌクレオチドを用い、常法

に従いPCRを行った。得られたPCR反応液は、PureLink PCR Purification Kit（インビトロジェン社製）を用いて精製した。

[0189] b) Gateway BP反応によるエントリークローンの作製

λファージの部位特異的組換えシステムを応用したGatewayテクノロジー（インビトロジェン社）により、ヒトSiglec-15細胞外領域のcDNAを組み込んだエントリークローンを以下の方法で作製した。まず、a)で作製した、attB配列を両端に持つPCR産物と、attP配列を有するドナーベクターであるpDONR221（インビトロジェン社製）との間で、BPクロナーゼを用いたBP反応を行った。この反応液を用いて大腸菌TOP10を形質転換し、薬剤耐性クローンに対してコロニーPCRを行い、インサートサイズを確認した。インサートのサイズが正しく確認されたクローンについて、インサートの全DNA配列のシーケンス解析を実施した結果、目的とするヒトSiglec-15蛋白質の細胞外領域をコードするヌクレオチド配列（配列表の配列番号15）と完全に一致するエントリークローンが得られた。

[0190] c) Gateway LR反応による発現クローンの作製

λファージの部位特異的組換えシステムを応用したGatewayテクノロジー（インビトロジェン社）により、ヒトSiglec-15細胞外領域のcDNAを組み込んだ発現クローンを以下の方法で作製した。b)で作製したエントリークローンは、インサートの両端にattL配列を有している。このエントリークローンと、attR配列を有する2種類のディストネーションベクターとの間でLRクロナーゼを用いたLR反応を行った。なおディストネーションベクターは、インサートのC末側にV5エピトープと6×Hisタグが付加される様に設計されたpDONM、及びインサートのC末側にヒトFcタグが付加されるように設計されたpHlgFcの2種類を用いた。LR反応により得られた反応液を用いて大腸菌TOP10を形質転換し、得られた薬剤耐性クローンに対してシーケンス解析を行い、組換えが

正しく行われたかを確認した。

シーケンス解析の結果、pDONM及びp h I g F cの両方で正しく組換わった発現クローン（可溶型ヒトS i g l e c－15／pDONM及び可溶型ヒトS i g l e c－15／p h I g F c）が、それぞれ得られた。可溶型ヒトS i g l e c－15／pDONMを動物細胞などにトランスフェクションすることにより、配列表の配列番号19に記載した塩基配列を有するmRNAが転写され、配列表の配列番号20に記載したアミノ酸配列を有する蛋白質（ヒトS i g l e c－15－H i s）が翻訳される。可溶型ヒトS i g l e c－15／p h I g F cを動物細胞などにトランスフェクションすることにより、配列表の配列番号21に記載した塩基配列を有するmRNAが転写され、配列表の配列番号22に記載したアミノ酸配列を有する蛋白質（ヒトS i g l e c－15－F c）が翻訳される。

実施例 11

[0191] 293-F細胞を用いた可溶型ヒトS i g l e c－15蛋白質含有培養液の大量調製

a) ヒトS i g l e c－15－H i s含有培養液の調製

実施例10で得られた可溶型ヒトS i g l e c－15／pDONMを約25mg調製した。なお、大量培養した大腸菌からのプラスミド精製には、インビトロジェン PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit（インビトロジェン社製）を使用した。調製したプラスミドをOpti-MEM（インビトロジェン社製）と混合し、トランスフェクション試薬である293fectin（インビトロジェン社製）を50ml添加して室温で20分間インキュベーションした。この混和液を、1%ペニシリンストレプトマイシンを含有するFreeStyle 293 Expression Media（インビトロジェン社製）中で $1.0 \sim 3.4 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように25Lバイオプロセス培養装置（WAVE Bioreactor）を用いて培養したFreeStyle 293-F細胞（インビトロジェン社製）に添加した。6～12% CO₂濃度

、37℃で96時間（4日間）攪拌培養（30回転／分）した後に培養液を回収し、遠心分離して培養上清を調製した。このようにして調製した培養上清中には、ヒトS i g l e c - 1 5の細胞外領域C末側にV5エピトープと6×H i sタグが付加された蛋白質（ヒトS i g l e c - 1 5 - H i s）が発現すると考えられる。

[0192] b) ヒトS i g l e c - 1 5 - F c含有培養液の調製

実施例10で得られた可溶型ヒトS i g l e c - 1 5 / p h I g F cを約5mg調製した。なお、大量培養した大腸菌からのプラスミド精製には、インビトロジェン PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit（インビトロジェン社製）を使用した。調製したプラスミドをOpti-MEM（インビトロジェン社製）と混合し、フィルター滅菌した後トランスフェクション試薬である293fectin（インビトロジェン社製）を10 ml添加して室温で20分間インキュベーションした。この混和液を、FreeStyle 293 Expression Media（インビトロジェン社製）中で $1.0 \sim 3.0 \times 10^6$ 細胞/ml $\times 5$ L（1 L／フラスコを5本）となるようにエルレンマイヤーフラスコ中で培養したFreeStyle 293-F細胞（インビトロジェン社製）に添加した。8.0% CO₂濃度、37℃で96時間（4日間）回転培養（125回転／分）した後に培養液を回収し、遠心分離して培養上清を調製した。このようにして調製した培養上清中には、ヒトS i g l e c - 1 5の細胞外領域C末側にヒトFcタグが付加された蛋白質（ヒトS i g l e c - 1 5 - F c）が発現すると考えられる。

実施例 12

[0193] 可溶型ヒトS i g l e c - 1 5蛋白質の精製

a) 可溶型ヒトS i g l e c - 1 5 - H i sの精製

a-i) HiSTrap HPカラムクロマト

実施例11、a)で調製したヒトS i g l e c - 1 5 - H i sを発現させた293F細胞の培養液12 Lに1350 mlの10×buffer（50

0 mM Tris, 1.5 M NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8.0) を加えて良く攪拌した後に、Millipack 60 ユニター (ミリポア社製) でろ過した。この培養液を、予め純水 (Milli-Q 水) で洗浄しておいた Ni-Sepharose HP (アマシャムバイオサイエンス社製) 100 ml カラムに流速 10 ml/min でかけた。300 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 400 ml を用いて流速 8 ml/min でカラムを洗浄した後に、300 mM NaCl, 500 mM Imidazole を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 200 ml を用いて流速 2.5 ml/min に、遠心膜濃縮器 Amicon Ultra-15 (ミリポア社製) で約 20 ml に濃縮した。濃縮時に発生した不溶物を 3000 r.p.m., 4°C で 30 分間遠心して除き、その上清液 2.5 ml を予め 1 M NaCl を含むトリン酸塩緩衝生理食塩水 (N-PBS) で平衡化しておいた PD-10 脱塩カラム (アマシャムバイオサイエンス社製) にかけて、N-PBS で溶出して、溶媒を N-PBS に置換したサンプル 3.5 ml を得た。この操作を更に 7 回繰り返して行い、EHS15-His 粗精製溶液約 28 ml を得た。

[0194]

a-1) Resource Q カラムクロマト

Ni-Sepharose HP カラムクロマトで精製した N-PBS 置換サンプル 12 ml を 0.1% CHAPS を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に 4°C で一晩透析 (1 L, 3 回) した後に、4°C, 3000 r.p.m. にて 30 分間遠心して沈殿物を除去した。この上清液を Millipack 60 ユニター (ミリポア社製) でろ過した後、0.1% CHAPS を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で予め平衡化しておいた Resource Q カラム (アマ

マシャムバイオサイエンス社製)に流速1ml/minでかけ、引き続きこの緩衝液を用いて流速1ml/minでカラムを洗浄して、カラムに吸着しない蛋白質画分を集めた。カラムに吸着した蛋白質は、0.1% CHAPS, 1M NaClを含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を用いて流速1ml/minで溶出した。カラムに吸着しなかった画分26.5mlを、遠心膜濃縮器Amicon Ultra-15(ミリポア社製)で3.0mlに濃縮した後に、4°C、3,000r.p.m.にて10分間遠心して沈殿物を除去した。その上清液2.5mlを予め50mM アルギニン塩酸塩を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(pH7.0、A-PBS)で平衡化しておいたPD-10脱塩カラム(アマシャムバイオサイエンス社製)にかけ、A-PBSで溶出して、溶媒をA-PBSに置換したサンプル3.5mlを得た。調製したサンプルの溶媒中のアルギニン塩酸塩は可溶性ヒトSiglec-15-Hisが沈殿することを防止するために添加した。遠心後の上清液は使用するまで-80°Cで凍結保存した。以上の精製操作(Resource Qカラムクロマト)を2回繰り返して実施した。

- [0195] a-i-i-i) 精製したヒトSiglec-15-Hisの検出と純度検定
上記の精製操作(Ni-Sepharose HPカラムクロマト、Resource Qカラムクロマト)で調製したサンプルを用いて還元条件下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色を行った。即ち各精製ステップのサンプル5μlに同量のSDS-処理液を加えて、95°Cで10分間熱処理した。熱処理した各サンプル0.3μlをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に使用した。電気泳動の操作は分子量マーカーとしてレインボー分子量マーカー(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いた以外は、実施例3と同様の方法で実施した。電気泳動終了後にPhastGel Silver Kit(アマシャムバイオサイエンス社製)とPhastSystemを用いて銀染色を行い、その結果を図7に示した。Resource Qカラムに吸着しなかった蛋白質画分に分子量約35kDaの蛋白質(ヒトSiglec-15-His)が効率的に精製濃縮されたことが示された。

[0196] a-i v) 精製したヒトS i g l e c-15-H i sの蛋白質濃度の測定
精製ヒトS i g l e c-15-H i s (R e s o u r c e Qカラムに吸着しなかった蛋白質画分) について、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして用い、D C-P r o t e i n A s s a y k i t (B i o R a d社製) で蛋白質濃度を測定した。2回の精製操作で合計1. 66mgの精製ヒトS i g l e c-15-H i sを得た。

[0197] b) 可溶型ヒトS i g l e c-15-F cの精製

b-i) H i T r a p p r o t e i n Aカラムクロマト

実施例11、b) で調製したヒトS i g l e c-15-F cを発現させた293F細胞の培養液1. 5 LをS t e r i v e x G Vフィルター (ミリポア社製) でろ過した後、予めダルベッコPBS (D-PBS、インビトロジェン社製) で平衡化しておいたH i T r a p p r o t e i n A 5 mLカラム (アマシャムバイオサイエンス社製) に流速5ml/minでかけた。D-PBS 70mlを用いて流速5ml/minでカラムを洗浄した後に、0. 1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH3. 0) 24mlを用いて流速1. 2ml/minでカラムに吸着している蛋白質を溶出した。溶出した液は、M i n i - s o r p t u b e (ヌンク社製) に1. 2ml/Fr. にて分取した後に、1M T r i s 0. 31mlを直ちに加えて中和した。溶出された蛋白質の画分 (Fr. 5~9) 約7. 5ml中の2. 5mlを、50mM アルギニン塩酸塩を含むリン酸塩緩衝生理食塩水 (pH7. 0、A-PBS) で平衡化しておいたPD-10脱塩カラム (アマシャムバイオサイエンス社製) にかけてA-PBSで溶出して、溶媒をA-PBSに置換したサンプル3. 5mlを得た。この作業を2回繰り返して実施した。溶媒中のアルギニン塩酸塩は可溶型ヒトS i g l e c-15-F cが沈殿することを防止するために添加した。溶出された蛋白質画分 (Fr. 5~9) の残り2. 5mlは、1M N a C lを含むリン酸塩緩衝生理食塩水 (pH6. 7、N-PBS) で平衡化しておいたPD-10脱塩カラム (アマシャムバイオサイエンス社製) にかけてN-PBSで溶出して、溶媒をN-

PBSに置換したサンプル3.5mlを得た。調製したサンプルの溶媒中のNaClは、アルギニン等のアミノ基含有化合物を添加せずに、可溶型ヒトSiglec-15-Fcの沈殿を防止する目的で添加した。以上の操作で調製したサンプルは、使用するまで-80℃で凍結保存した。

[0198] b-ii) 精製したヒトSiglec-15-Fcの検出と純度検定

上記の精製操作で調製したサンプルを用いて還元条件下のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色を行った。即ち各精製ステップのサンプル5μlに同量のSDS-処理液を加えて、95℃で10分間加熱した。熱処理した各サンプルを1/2濃度のSDS-処理液で1/100又は1/300倍希釈したサンプル0.3μlをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に使用した。電気泳動と銀染色は、a-iii)に記載のヒトSiglec-15-Hisの純度検定と同様の方法で実施して、その結果を図8に示した。HiTrap protein A カラムから溶出した蛋白質画分に分子量約55kDaの蛋白質（ヒトSiglec-15-Fc）が効率的に精製濃縮されたことが示された。

[0199] b-iii) 精製したヒトSiglec-15-Fcの蛋白質濃度の測定

精製ヒトSiglec-15-Fc（PD-10脱塩カラムから溶出された蛋白質画分）について、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして用い、DC-Protein Assay kit（BioRad社製）で蛋白質濃度を測定した。表4に示したように、2回の精製操作で合計25.2mgの精製ヒトSiglec-15-Fcを得た。

[0200] [表4]

	Protein Conc. (mg/ml)	Sample Vol. (ml)	Total Protein (mg)
Arg 含有溶媒	2.3	7.0	16.1
NaCl 含有溶媒	2.6	3.5	9.1
Total			25.2

実施例 13

[0201] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体のヒト S i g l e c - 1 5 蛋白質に対する結合性評価

ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体のヒト S i g l e c - 1 5 蛋白質に対する結合性を E L I S A 法により評価した。実施例 1 2、b) で作製したヒト S i g l e c - 1 5 - F c 蛋白質 (A - P B S 置換したもの) を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 0.1 M 炭酸ナトリウムバッファー (pH 9.5) で希釈し、96 穴プレート (ナルジェヌンク社製、カタログ番号: 430341) に $100 \mu\text{l}/\text{穴}$ 添加した。室温で 1 時間放置後に溶液を除去し、 $300 \mu\text{l}/\text{穴}$ の洗浄バッファー (0.05% Tween 20 含有リン酸塩緩衝生理食塩水) を添加、除去した。この洗浄作業をさらに 1 回行った後、25% ブロックエース (大日本住友製薬社製) を含むリン酸塩緩衝生理食塩水を $200 \mu\text{l}/\text{穴}$ 添加し、室温で 1 時間放置することによりブロッキングを行った。液を除き $300 \mu\text{l}/\text{穴}$ の洗浄バッファーで 2 回洗浄した後、実施例 6 で調製したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体あるいはラットコントロール I g G (R & D Systems 社製) を、E L I S A バッファー (12.5% ブロックエース、0.05% Tween 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水) を用いて終濃度が 1.28 ~ 20,000 ng/ml (5 倍希釈系列) となるように希釈し、 $100 \mu\text{l}/\text{穴}$ 添加した。室温で 1 時間放置後に液を除き、 $300 \mu\text{l}/\text{穴}$ の洗浄バッファーで 3 回洗浄した。続いて E L I S A バッファーを用いて 1,000 倍希釈した HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) 標識ヤギ抗ラット I g G 抗体 (ベックマンコールター社製) を $100 \mu\text{l}/\text{穴}$ 添加し、室温で 1 時間放置した。液を除き、 $300 \mu\text{l}/\text{穴}$ の洗浄バッファーで 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ用発色キット (住友ベークライト社製) を用いて、キットに添付された説明書に従い発色させた。発色後、マイクロプレートリーダー (日本モレキュラーデバイス社製) を用いて 492 nm での吸光度を測定した。その結果、検討したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 10 検体全てにおいて、抗体の濃度に依存したヒト S i g l e c - 1 5

蛋白質への結合が確認された（図9）。特に結合活性が強かったのは、#1 A1、#3 A1、#24 A1、#32 A1、#61 A1の5検体であり、#8 A1、#34 A1、#39 A1の3検体は比較的結合活性が弱かった。一方ラットコントロールIgGは、ヒトSiglec-15蛋白質への結合が認められなかった。以上の結果から、実施例6で調製したラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体は、マウスSiglec-15だけでなくヒトSiglec-15にも結合することが示され、しかも一部の抗体はヒトSiglec-15に強く結合することが判明した。

実施例 14

[0202] ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体添加による正常ヒト破骨前駆細胞の細胞融合、及び骨吸収活性への影響（*in vitro* 生物活性評価）

実施例13において、ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体がヒトSiglec-15にも結合することが確認されたので、これらの抗体のヒト破骨細胞形成及び骨吸収活性に対する効果を検討した。

[0203] a) ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体添加による正常ヒト破骨前駆細胞の破骨細胞融合への影響（TRAP染色）

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穴プレートに 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66 ng/ml）及びヒトM-CSF（終濃度33 ng/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6で調製したラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体及びラットコントロールIgG（R&D Systems社製）を終濃度30 µg/mlとなるように添加して、CO₂

インキュベーター中で4日間培養した。培養後上清を除去し、10%中性ホルマリンを添加して細胞固定を行った。細胞固定後、蒸留水で2回洗浄し、TRAP染色液(0.27mMナトリウムアス－MXリン酸(シグマ社製)、1.6mM Fast red violet LB salt (シグマ社製)、1%ジメチルホルムアミド、50mM酒石酸ナトリウム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0))を100 μ l/穴添加し、室温で5分反応させた。蒸留水で2回洗浄し、顕微鏡下で細胞を観察した(図10)。

その結果、#32A1抗体添加により、高度に細胞融合した巨大破骨細胞の形成がほぼ完全に抑制された。また、#41B1抗体でも、高度に細胞融合した巨大破骨細胞の形成が顕著に抑制された。一方、それ以外のラット抗マウスIgG1抗体(#1A1抗体他)及びラットコントロールIgGでは、このような破骨細胞融合の顕著な抑制は認められなかった。このように、正常ヒト破骨前駆細胞からのTRAP陽性破骨細胞の多核化・細胞融合が、Siglec-15蛋白質と特異的に結合するモノクローナル抗体により抑制されることが明らかとなった。

[0204]

b) ラット抗マウスIgG1モノクローナル抗体(#32A1)添加による正常ヒト破骨前駆細胞の破骨細胞融合への影響(TRAP染色)

正常ヒト破骨前駆細胞(Normal Human Osteoclast Precursor Cells、三光純薬より購入、カタログ番号2T-110)を、細胞に添付のフロックに従い96ウェルプレートに1 $\times$ 10⁴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68.4 ng/ml)及びヒトM-CSF(終濃度33 ng/ml)等を含むOPGM添加因子セツト(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6で調製したラット抗マウスIgG1モノクローナル抗体(#32A1抗体)を終濃度0.1、0

3、1、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加して、 CO_2 インキュベーター中で3日間培養した。培養後上清を除去し、10%中性ホルマリンを添加して細胞固定を行った。細胞固定後、蒸留水で2回洗浄し、TRAP染色液（0.27 mM ナフトールAS-MXリン酸（シグマ社製）、1.6 mM Fast red violet LB salt（シグマ社製）、1%ジメチルホルムアミド、50 mM 酒石酸ナトリウム、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0））を100 μl /穴添加し、室温で5分反応させた。蒸留水で2回洗浄し、顕微鏡下で細胞を観察した（図11）。その結果、TRAP陽性多核破骨細胞形成が、#32A1抗体 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で濃度依存的に抑制された。

[0205] c) ラット抗マウス Siglec-15 モノクローナル抗体（#32A1）添加による正常ヒト破骨前駆細胞の骨吸収活性への影響（コラーゲンコートプレートを用いた評価）

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。

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68.4 ng/ml ）及びヒトM-CSF（終濃度33 ng/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6で調製したラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体(#32A1抗体)を終濃度0.1、0.3、1、3 μ g/mlとなるように添加して、CO₂インキュベーター中で3日間培養した。培養上清10 μ lを採取し、O s t e o l y s e A s s a y K i t に付属のF l u o r o p h o r e R e l e a s i n g R e a g e n t を200 μ l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: 340 nm、Emission: 615 nm)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12)。その結果、RANKL添加により増加した蛍光コラーゲン断片量が、#32A1抗体によって、0.3 μ g/mlから3 μ g/mlの範囲で濃度依存的に抑制された。このことから、ヒト破骨細胞の骨吸収活性が、S i g l e c - 1 5蛋白質と特異的に結合するモノクローナル抗体により抑制されることが明らかとなった。

実施例 15

[0206] ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体の卵巣摘出ラットを用いた生物活性評価

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、ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体#8A1抗体投与群及び#32A1抗体投与群の3群に分けた。また偽手術群についても1群設定した。抗体を投与する群については、実施例6で調製したラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体#8A1抗体及び#32A1抗体を、各1mg/kgの用量で腹腔内に週3回、手術翌日から4週間反復投与した。溶媒投与群及び偽手術群には、溶媒として0.01% Tween 20含有PBSを腹腔内に投与した。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

した。採尿終了後にラットを安楽死させ、腰椎を摘出した。

[0207] 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腰椎を切り出した。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した。結果を図13（A）に示した。偽手術群に対し、卵巢摘除群では有意な腰椎骨密度の減少が認められたが、#8A1及び#32A1抗体投与群では卵巢摘除による骨密度の減少が有意に抑制された。

[0208] 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。

[0209] 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た。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）を用いて測定した。また、クレアチニン-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した。結果を図13（B）に示した。偽手術群に対し、卵巢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したことから、卵巢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た。一方#8A1及び#32A1抗体投与群では、卵巢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た。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巢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た。

実施例 16

[0210] ラット抗マウス Siglec-15モノクローナル抗体の結合部位（エピトープ）の決定

a) ヒトSigelec-15 V-set フォメインの発現精製

ヒトSigelec-15 V-set フォメイン (NCBIの蛋白質データベースのACCESSION番号NP_998767のフォミノ酸配列又は配列表の配列番号2に記載のフォミノ酸配列の39乃至165番目のフォミノ酸残基からなるポリペプチド)のN末端側にHisタグ、及び、Thrombin認識配列を連結させた蛋白質をコードする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 B (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ヘルスクア社、カタログ番号: 17-5247-01) で精製した。その後、ThrombinでHisタグを切断後、Mono S5/G50 GLカラム (GEヘルスクア社、カタログ番号: 17-5168-01)、さらに、Superdex 75 10/300カラム (GEヘルスクア社、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Sigelec-15 V-set フォメインを精製した。

[0211]

b) 可溶性ヒトSigelec-15-Fcの精製

可溶性ヒトSigelec-15-Fcは、実施例12の方法で精製した。

[0212]

c) ヒトV-set フォメインとラット抗マウスSigelec-15モノクローナル抗体#32A1の競合ELISA

96穴Maxisorpプレート (マシク社製、型番: 442404) に、25 µg/mlのヤギ抗ヒトFc抗体 (ジヤクソン/リサーチ社、型番: 109-005-098) を100 µl添加し、4°Cで一晩固相化した。96穴MaxisorpプレートをPBSで2回洗浄後、1 µg/mlの可溶性ヒトSigelec-15-Fcを100 µl添加し、室温で1時間固相化した。その後、5%スキムミルク/PBS溶液を300 µl添加し、室

温で3時間、ウェルのブロッキングを実施した。一方、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1と0、0. 032、0. 16、0. 8、4、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトS i g l e c - 1 5 V - s e tドメインをそれぞれ等量混合し、室温で1. 5時間反応させた。96穴M a x i - s o r pプレートをPBSで2回洗浄後、ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1とヒトS i g l e c - 1 5 V - s e tドメインの混合溶液を $100\mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間反応させた。0. 05%T w e e n - 2 0（バイオラッド社、カタログ番号：170-6531）/PBS溶液（以下、PBST溶液とする）で96穴M a x i - s o r pプレートを5回洗浄後、HRP標識ヤギ抗ラットI g G抗体（ベクマンコールター社、カタログ番号：732664、2, 000倍希釈）を $100\mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間反応させた。PBST溶液で5回洗浄後、ELISA POD基質A. B. T. S. キット（ナカライテスク社、カタログ番号：14351-80）の発色液を $100\mu\text{l}$ 添加して30分間反応させた。反応停止液を $100\mu\text{l}$ 添加後405nmの吸光度を測定した。競合ELISAの結果、ヒトV - s e tドメインの濃度依存的にラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1の固相化したヒトS i g l e c - 1 5への結合が阻害されることが示された。よって、ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1のエピトープは、ヒトS i g l e c - 1 5 V - s e tドメイン（NCBIの蛋白質データベースのACCESSION番号NP_998767のアミノ酸配列又は配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の39乃至165番目のアミノ酸残基からなるドメイン）であることが示された（図14）。

実施例 17

[0213] ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体# 3 2 A 1の可変領域をコードするcDNAの増幅と塩基配列の解析

a) mRNAの調製

ハイブリドーマ# 3 2 A 1は、実施例6、a)に従って培養した。4 x 1

0.7個のハイブリドーマ#32A1から、QuickPrep mRNA Purification Kit (GE Healthcare社)を用いて、約65 μ gのmRNAを調製した。

[0214] b) cDNA (5' -RACE-Ready cDNA) の合成

cDNA (5' -RACE-Ready cDNA) の合成はa) で合成したmRNAの0.3 μ gを用い、PrimeScript Reverse Transcriptase (TAKARA社) とSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社)を用いて実施した。

[0215] c) 5' -RACE PCRによる#32A1遺伝子の重鎖可変領域のcDNAの増幅

#32A1重鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix : SMART RACE cDNA Amplification Kitに付属)

及び

5' -GGCCGGGTGGGCTACGTTGCAGGTGACGGTCTG-3' (RG2AR2 : 配列表の配列番号23) の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。UPMはSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社) に付属のものを使用し、RG2AR2はデータベースのラット重鎖 (IgG2a) の定常領域の配列から設計した後に常法に従って合成した。

このプライマーの組み合わせと、b) で合成したcDNA (5' -RACE-Ready cDNA) を鋳型とした、5' -RACE PCRにより#32A1重鎖遺伝子の可変領域のcDNAを増幅した。PCRは、Advantage 2 PCR Kit (Clontech社) を用い、サーマルサイクラーの設定条件は、94°Cで1分間加熱した後、「94°Cで0.5分、72°Cで3分」の温度サイクルを5回繰り返し、次に「94°Cで0.5分

、70℃で0.5分、72℃で3分」の温度サイクルを5回繰り返し、さらに「94℃で0.5分、68℃で0.5分、72℃で3分」の温度サイクルを20回繰り返してから、4℃で保温とした。

[0216] d) 5'-RACE PCRによる#32A1軽鎖遺伝子の可変領域のcDNAの増幅

#32A1軽鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMART RACE cDNA Amplification Kitに付属) 及び

5'-CATGCTGTACGTGCTGTCTTTGCTGTCCTGATCAG-3' (RKR2: 配列表の配列番号24) の配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、UPMはSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社) に付属のものを使用し、RKR2はデータベースのラット軽鎖(κ 鎖)の定常領域の配列から設計した後に常法に従って合成した。

このプライマーの組み合わせと、b)で合成したcDNA (5'-RACE-Ready cDNA) を鋳型とした、5'-RACE PCRにより#32A1軽鎖遺伝子の可変領域のcDNAを増幅した。PCRは、Advantage 2 PCR Kit (Clontech社) を用い、サーマルサイクラーの設定条件は、94℃で1分間加熱した後、「94℃で0.5分、72℃で3分」の温度サイクルを5回繰り返し、次に「94℃で0.5分、70℃で0.5分、72℃で3分」の温度サイクルを5回繰り返し、さらに「94℃で0.5分、68℃で0.5分、72℃で3分」の温度サイクルを20回繰り返してから、4℃で保温とした。

[0217] e) 重鎖及び軽鎖可変領域のcDNAの塩基配列の決定

c)で増幅した重鎖の可変領域のcDNAをMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社) を用いて精製した後に、DNA配列のシーケンス解析を実施した。シーケンスプライマーと

して、

5' -CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC-3'
' (RG2AR3 : 配列表の配列番号25) の配列を有するオリゴヌクレオチドをデータベースのラット重鎖 (IgG2a) の定常領域の配列から設計した後に常法に従って合成した。

[0218] d) で増幅した軽鎖の可変領域の cDNA を MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製を行った後に、DNA 配列のシーケンス解析を実施した。シーケンスプライマーとして、

5' -TCCAGTTGCTAACTGTTCCG-3' (sqRK : 配列表の配列番号26) の配列を有するオリゴヌクレオチドをデータベースのラット軽鎖 (κ 鎖) の定常領域の配列から設計した後に常法に従って合成した。

[0219] シーケンス解析により得られた重鎖可変領域を含む cDNA は、配列表の配列番号27に記載の塩基配列を有しており、配列表の配列番号28に記載のアミノ酸配列をコードしている。配列番号28のアミノ酸番号1乃至19に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル、アミノ酸番号20乃至140に示されるアミノ酸配列が重鎖可変領域、そしてアミノ酸番号141乃至167で示されるアミノ酸配列が重鎖定常領域 (部分) に相当する。上記の重鎖可変領域は、配列番号44に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1 (DYFMN)、配列番号45に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2 (QIRNKIYTYATFYAESLEG)、及び配列番号46に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3 (SLTGGDYFDY) を保有している。また、軽鎖可変領域を含む cDNA は、配列表の配列番号の29に記載の塩基配列を有しており、配列表の配列番号30に記載のアミノ酸配列をコードしている。配列番号30のアミノ酸番号1乃至20に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル、アミノ酸番号21乃至132に示されるアミノ酸配列が軽鎖可変領域、そしてアミノ酸番号133乃至139で示されるアミノ酸配列

が軽鎖定常領域（部分）に相当する。上記の軽鎖可変領域は、配列番号 47 に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1（RASQSVTISGYSH）、配列番号 48 に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2（RASNLAS）、及び配列番号 49 に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3（QQSRKSPWT）を保有している。

実施例 18

[0220] ラット抗マウス *Siglec-15* モノクローナル抗体 #32A1 のヒトキメラ抗体遺伝子発現コンストラクトの作製

a) 汎用発現ベクター pEF1/FCCU-1 及び pEF6KCL の作製

a) - i) ヒト軽鎖発現ベクター pEF6KCL の構築

プラスミド pEF6/V5-HisB (Invitrogen) を鋳型として下記プライマーを用いて PCR を行うことにより、BGHpA の直後 (2174) から、Sma I (2958) までの DNA 断片 (f1 origin of replication 及び SV40 promoter and origin を含む DNA フラグメント、以下、「フラグメント A」とする。) を取得した。

5' -CCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC-3'

(プライマー EFF1 : 配列表の配列番号 31)

5' -AAACCCGGGAGCTTTTTTGCAAAAGCCTAGG-

3' (プライマー EFsmaR : 配列番号 32)

得られたフラグメント A と、ヒト κ 鎖分泌シグナル、ヒト κ 鎖定常領域及びヒト poly A 付加シグナルをコードする DNA 配列を含む DNA フラグメント (配列番号 33) 以下、「フラグメント B」とする。) をオーバーラップ PCR により結合した。得られたフラグメント A とフラグメント B とが結合した DNA 断片 (以下、「フラグメント A+B」とする。) を制限酵素 Kpn I 及び Sma I で消化し、制限酵素 Kpn I 及び Sma I で消化したプラスミド pEF6/V5-HisB (Invitrogen) とライゲーションし、EF1 プロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイ

ト、ヒト κ 鎖定常領域、及びヒトpoly A付加シグナル配列をもつ、ヒト軽鎖発現ベクターpEF6KCLを構築した。

[0221] a) - i i) pEF1/KCLの構築

上記の方法で得られたpEF6KCLから制限酵素KpnI及びSmaIで切り出されたDNA断片を、KpnI及びSmaIで消化したpEF1/myc-HisB (Invitrogen社) とライゲーションし、プラスミドpEF1/KCLを構築した。

[0222] a) - i i i) ヒト重鎖発現ベクターpEF1/FCCU-1の構築

ヒトIgG1シグナル配列及び定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片(配列表の配列番号34)を制限酵素NheI及びPmeIで消化し、NheI及びPmeIで消化したプラスミドpEF1/KCLと結合し、EF1プロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒト重鎖定常領域、及びヒトpoly A付加シグナル配列をもつヒト重鎖発現ベクターpEF1/FCCU-1を構築した。

[0223] b) #32A1ヒトキメラ抗体重鎖発現コンストラクトの作製

#32A1重鎖可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、

5' - a a a g c t g a g c G A G G T G C A A A T T T T G G A G A C T G G A G G A G G C - 3' (32A1HF: 配列表の配列番号35)

及び

5' - a a a g c t g a g c t G A C T G T G A C C A T G A C T C C T T G G C C C C A G - 3' (32A1HR: 配列表の配列番号36) の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。

[0224] なお、これらのプライマーはPCR産物をpEF1/FCCU-1に組み込むために、制限酵素BspI認識配列が付加されるように設計した。このプライマーの組み合わせとテンプレートとして、実施例17、e)で精製した重鎖可変領域のcDNAを用い、常法に従いPCRを行った。PCR産物をMinElute PCR Purification Kit (QIA

GEN社)を用いて精製した後に、制限酵素BspI (NEW ENGLAND BIOLABS社)で消化したDNA断片を、pEF1/FCU-1を制限酵素BspI (NEW ENGLAND BIOLABS社)で切断した箇所に挿入することにより#32A1ヒトキメラ抗体重鎖発現コンストラクトを構築した。インサートの配列はシーケンス解析により確認した。シーケンスのためのプライマーとして、

5'-TAATACGACTCAGCTATAGGG-3' (F11: 配列表の配列番号37)の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。正しくインサートが挿入できた発現ベクターを「32A1H/pEF1/FCU」と命名した。

[0225] c) #32A1ヒトキメラ抗体軽鎖発現コンストラクトの作製

#32A1軽鎖可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、

5'-aaacataatggcGACATTGCTGTGACCAAGTC
TCCTGCTTTGG-3' (32A1LF: 配列表の配列番号38)

及び

5'-aaacgtacgTCTCAATTCGAGCTTGGTGCT
CCAGCG-3' (32A1LR: 配列表の配列番号39)の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。

[0226] なお、これらのプライマーはPCR産物をpEF6KCLに組み込むため

に、32A1LFには制限酵素NdeI 認識配列が、32A1LRには制限酵素BspI 認識配列が付加されるように設計した。このプライマーの組み合わせとランプレートとして、実施例17、e)で精製した軽鎖可変領域のcDNAを用い、常法に従いPCRを行った。PCR産物をMienue PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用いて精製した後に、制限酵素NdeI (TAKARA社)及び、BspI (NEW ENGLAND BIOLABS社)で消化したDNA断片を、pEF6KCLを制限酵素NdeI (TAKARA社)及び、BspI (

NEW ENGLAND BIOLABS社)で切断した箇所に挿入することにより#32A1ヒトキメラ抗体軽鎖発現コンストラクトを構築した。インサートの配列はシーケンス解析により確認した。シーケンスのためのプライマーとしては、配列表の配列番号37に記載のプライマーF11を使用した。正しくインサートが挿入できた発現ベクターを「32A1L/pEFF6KCL」と命名した。

- [0227] b)で作製された#32A1ヒトキメラ抗体重鎖遺伝子は、配列表の配列番号40に記載のヌクレオチド配列を有しており、配列表の配列番号41に記載のアミノ酸配列をコードしている。配列番号41のアミノ酸番号1乃至19に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル、アミノ酸番号20乃至140に示されるアミノ酸配列が重鎖可変領域、そしてアミノ酸番号141乃至470で示されるアミノ酸配列が重鎖定常領域に相当する。また、c)で作製された#32A1ヒトキメラ抗体軽鎖遺伝子は、配列表の配列番号42に記載のヌクレオチド配列を有しており、配列表の配列番号43に記載のアミノ酸配列をコードしている。配列番号43のアミノ酸番号1乃至20に示されるアミノ酸配列が分泌シグナル、アミノ酸番号21乃至132に示されるアミノ酸配列が軽鎖可変領域、そしてアミノ酸番号133乃至237で示されるアミノ酸配列が軽鎖定常領域に相当する。

実施例 19

- [0228] ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体#32A1のヒトキメラ抗体の調製

a) ヒトキメラ抗体の生産

対数増殖期の293FreeStyle細胞 3×10^7 個を新鮮な30m l (30m l培養を1ロットとして4ロット作製)のFreeStyle293 Expression Medium (Invitrogen社)に播種し、37℃、8%CO₂インキュベーターで振とう培養した(125rpm)。Polyethyleneimine (Polyscience社製 #24765) 300μgをOpti-ProSFM培地 (Invitrogen社製)

ogen社製) 1mlに溶解し、室温で5分間放置した。実施例18において作製された#32A1ヒトキメラ抗体重鎖発現ベクター 32A1H/pEF1/FCCU、及び#32A1ヒトキメラ抗体軽鎖発現ベクター 32A1L/pEF6KCLを、PureLink HiPure Plasmid キット (Invitrogen社) を用いて調製した。32A1H/pEF1/FCCU (15 μ g) 及び32A1L/pEF6KCL (45 μ g) を1mlのOpti-ProSFM培地 (Invitrogen社) に懸濁し、室温で5分間放置したPolyethyleneimine/Opti-ProSFM混合液1mlに加え、さらに室温5分間放置した。次にPolyethyleneimine/発現ベクター/Opti-ProSFM混合液2mlを293 FreeStyle細胞懸濁液の1ロットに添加し、振とう培養を続けた。37°C、8%CO₂中で7日間培養した後、培養上清をロットごとに回収した。

[0229] b) ヒトキメラ抗体の精製

上記で得られた培養上清90ml (3ロット分) をフィルターろ過 (NALGENE社製 #295-4545) 後、PBSで平衡化したMabSelect SuRe 0.5ml (GE Healthcare Bioscience社製 #17-5438-01) を加え、80rpm、10°Cで一晩振とうさせた。翌日、担体を回収しPBSで洗浄後、1Mアルギニン溶液 (pH4.0) にて抗体を溶出した。溶出液をPD10カラム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製 #17-0851-01) にてPBSに置換後、アミコンウルトラ4 (ミリポア社製 #UFC805008) にて濃縮しヒトキメラ抗体 1.2ml (0.98mg/ml) を得た。抗体の濃度は日立ダイオードアレー型バイオ光度計 U-0080Dにて280nmを測定し算出した。

実施例 20

[0230] ラット抗マウスSige-15モノクローナル抗体#32A1のヒトキメラ抗体のマウスSige-15蛋白質に対する結合性評価

実施例 19 において調製した精製ヒトキメラ抗体に対するラット #32A1 抗体の競合阻害を以下の方法で測定した。実施例 4 にて精製したマウス S i g l e c - 1 5 - F c を P B S で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈後、イムノプレート (N u n c 社製 #437111) に $100 \mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、 4°C で一晩静置することでプレートに蛋白質を吸着させた。翌日、ウェルを P B S - T 液 (P B S、 $0.05\% (v/v)$ T w e e n 20) で 2 回洗浄後、スキムミルク (森永乳業社製) を P B S で 5% に希釈した溶液を $350 \mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、室温で 2 時間静置した。ウェル中の液を除去し P B S - T 液にて 3 回洗浄後、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトキメラ抗体と各種濃度 ($0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.016 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.66 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) の #32A1 抗体又はラットコントロール I g G 抗体 (R & D s y s t e m s 社製 #6-001-A) の混合溶液 (最終濃度 0.5% のスキムミルク含有 P B S 液) をそれぞれ $100 \mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、2 時間室温で静置した。P B S - T 液で 3 回ウェルを洗浄後、T B S - T 液 (T B S、 $0.05\% (v/v)$ T w e e n 20) で 2500 倍に希釈した A l k a l i n e P h o s p h a t a s e - c o n j u g a t e d A f f i n i P u r e G o a t A n t i - H u m a n I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 社製 #109-055-097) を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ で添加し、室温で 1 時間静置した。ウェル中の液を除去し、T B S - T 液で 5 回ウェルを洗浄した後、蛍光基質液 (R o c h e 社製 #11681982001) を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ で添加し蛍光反応を行った。蛍光基質液添加 10 分後、プレートリーダーにて蛍光強度を測定した。その結果、#32A1 抗体は、ヒトキメラ抗体のマウス S i g l e c - 1 5 - F c に対する結合を濃度依存的に阻害することが示された。また #32A1 抗体とヒトキメラ抗体を同濃度 (1 : 1) にて混合した場合、約 40% の競合阻害が示された。従って、#32A1 抗体とヒトキメラ抗体は、マウス S i g l e c - 1 5 - F c に対してほぼ同等の親和性を持つと考えられる。一方ラットコントロ

ール I g G は、競合阻害を示さなかった（図 15）。

実施例 21

[0231] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒトキメラ抗体のマウス破骨細胞形成試験、並びにヒト破骨細胞形成試験での生物活性評価

a) マウス破骨細胞形成試験

実施例 19 において調製したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒトキメラ抗体を用い、マウス骨髄非付着細胞の破骨細胞分化への影響を検討した。実施例 8 の方法で調製したマウス骨髄非付着細胞を 10% FBS と 10 ng/ml M-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 200 μ l 播種して、CO₂ インキュベーター中で 2 日間培養した。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 20 ng/ml、M-CSF を 10 ng/ml になるように添加した 10% FBS 含有 MEM- α 培地 100 μ l を添加した。この細胞培養液に、実施例 6 において作製したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 と実施例 19 において作製したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒトキメラ抗体を 3 ~ 100 ng/ml の濃度になるように添加して、更に 3 日間 CO₂ インキュベーター中で培養した。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) 活性を実施例 9 に記載の方法で測定した。酵素反応停止後に各ウェルの 405 nm の吸光度を測定して TRAP 活性の指標にした。結果を図 16 に示した。# 3 2 A 1 抗体及びラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒトキメラ抗体において、50 ng/ml 以上の濃度で用量依存的な TRAP 活性の抑制が認められた。この結果より、ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒトキメラ抗体はラット # 3 2 A 1 抗体とほぼ同等のマウスの破骨細胞形成（破骨細胞の分化と成熟

) 抑制活性を有することが示された。

[0232] b) 正常ヒト破骨前駆細胞を用いた評価 (TRAP 染色)

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 穴プレートに 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 66 ng/ml) 及びヒト M-CSF (終濃度 33 ng/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 19 で調製したラット抗マウス Siglec-15 モノクローナル抗体 #32A1 のヒトキメラ抗体を終濃度 0.3、1、3、10 μ g/ml となるように添加して、CO₂ インキュベーター中で 3 日間培養した。培養後上清を除去し、10% 中性ホルマリンを添加して細胞固定を行った。細胞固定後、蒸留水で 2 回洗浄し、TRAP 染色液 (0.27 mM ナフトール AS-MX リン酸 (シグマ社製)、1.6 mM Fast red violet LB salt (シグマ社製)、1% ジメチルホルムアミド、50 mM 酒石酸ナトリウム、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)) を 100 μ l/穴添加し、室温で 5 分反応させた。蒸留水で 2 回洗浄し、顕微鏡下で細胞を観察した (図 17)。その結果、TRAP 陽性多核破骨細胞形成が、#32A1 のヒトキメラ抗体の添加により 0.3 μ g/ml から 10 μ g/ml の範囲で抑制された。

実施例 22

[0233] ラット抗マウス Siglec-15 モノクローナル抗体 #32A1 のヒト化抗体の設計 (1)

a) #32A1 のヒト化バージョンの設計

a) - i) #32A1 の可変領域の分子モデリング

#32A1 の可変領域の分子モデリングは、相同性モデリングとして一般

的に公知の方法 (Methods in Enzymology, 203, 1

21-153, (1991)) によって実行された。Protein Dat

a Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (200

7)) に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の1次配列 (X線結晶構

造から誘導される三次元構造が入手可能である) を、上で決定された#32

A1の可変領域と比較した。結果として、1LK3が、#32A1の軽鎖の

可変領域に対して同様にフレームワーク中に欠損がある抗体の中で、最も高

い配列相同性を有するとして選択された。また、1AD0が、#32A1の

重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。フ

レームワーク領域の三次元構造は、#32A1の軽鎖及び重鎖に対応する1

LK3及び1AD0の座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得る

ことによって作製された。#32A1のCDRは、Thornton et

al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)

) の分類に従って、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1及び

CDRH2は、それぞれクワスター15A、7A、9A、10A、12Bに割り

当てられた。CDRH3は、H3ルール (FEBS letter 399,

1-8 (1996)) を使用して、k (8) Cに分類された。次いで、それ

ぞれのCDRについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデル

に組み込まれた。

[0234] 最後に、エネルギーの点で#32A1の可変領域の可能性のある分子モデ

ルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。

上記手順を、市販の蛋白質立体構造予測プログラムPrime及び配座探索

プログラムMacroModel (Schrödinger, LLC) を

用いて行った。

[0235]

a) -!!) ヒト化#32A1に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化#32A1抗体の構築を、CDRグラフトイング (Proc. Nat

l. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)

) として一般的に公知の方法によって行った。アウセプター抗体は、フレー

ムワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて2通り選択された。#32A1のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のKabatデータベース(Nuc. Acid Res. 29, 205-206(2001))の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、M37G037'CL抗体がフレームワーク領域についての73%の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。M37G037'CLについてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、#32A1についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築された#32A1の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989))によって与えられる基準によって選択された。

[0236] #32A1のフレームワーク領域の配列を、IgBLAST(Nuc. Acid Res. 36, D25-D30(2007))の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、L鎖はAAB34430がフレームワーク領域についての79%配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。H鎖はCAF31288がフレームワーク領域についての78%の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。L鎖はAAB34430について、H鎖はCAF31288についてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、#32A1についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築された#32A1の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989))によって与えられる基準によって選択された。いずれの方法も、選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化#32A1配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

[0237] b) #32A1重鎖のヒト化

b) - i) h # 3 2 A 1 - T 1 Hタイプ重鎖 :

配列表の配列番号 28 に示される # 3 2 A 1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、61 (グルタミン酸)、89 (バリン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、105 (セリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 重鎖を「h # 3 2 A 1 - T 1 Hタイプ重鎖」と命名した。

[0238] h # 3 2 A 1 - T 1 Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 51 に記載されている。配列番号 51 のアミノ酸配列の 1 乃至 19 番目のアミノ酸残基からなる配列、20 乃至 140 番目のアミノ酸残基からなる配列、141 乃至 470 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 51 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 50 に記載されている。配列番号 50 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 1410 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 50 のヌクレオチド配列及び配列番号 51 のアミノ酸配列は、図 27 にも記載されている。

[0239] b) - i i) h # 3 2 A 1 - T 2 Hタイプ重鎖 :

配列表の配列番号 28 に示される # 3 2 A 1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、1

14（イソロイシン）、118（スレオニン）、134（バリン）、135（メチオニン）、140（ロイシン）をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1重鎖を「h#32A1-T2Hタイプ重鎖」と命名した。

[0240] h#32A1-T2Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号53に記載されている。配列番号53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470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53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52に記載されている。配列番号52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1410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52のヌクレオチド配列及び配列番号53のアミノ酸配列は、図28にも記載されている。

[0241] b) - i i i) h#32A1-T3Hタイプ重鎖：

配列表の配列番号28に示される#32A1重鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、26（スレオニン）、32（リジン）、104（バリン）、114（イソロイシン）、134（バリン）、135（メチオニン）、140（ロイシン）をそれぞれバリン、セリン、グルタミン、メチオニン、バリン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1重鎖を「h#32A1-T3Hタイプ重鎖」と命名した。

[0242] h#32A1-T3Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号55に記載されている。配列番号55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470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 55 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 54 に記載されている。配列番号 54 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 1410 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 54 のヌクレオチド配列及び配列番号 55 のアミノ酸配列は、図 29 にも記載されている。

[0243] b) - i v) h # 3 2 A 1 - T 5 H タイプ重鎖：

配列表の配列番号 28 に示される # 3 2 A 1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、61 (グルタミン酸)、89 (バリン)、95 (アスパラギン酸)、97 (グルタミン酸)、99 (セリン)、104 (バリン)、105 (セリン)、114 (イソロイシン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれバリン、バリン、セリン、グルタミン、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン、リジン、スレオニン、メチオニン、アスパラギン、バリン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 重鎖を「h # 3 2 A 1 - T 5 H タイプ重鎖」と命名した。

[0244] h # 3 2 A 1 - T 5 H タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 57 に記載されている。配列番号 57 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 470 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 57 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 56 に記載されている。配列番号 56 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 1410 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 56 のヌクレオチド

配列及び配列番号 57 のアミノ酸配列は、図 30 にも記載されている。

[0245] b) - v) h # 3 2 A 1 - T 6 H タイプ重鎖：

配列表の配列番号 28 に示される # 3 2 A 1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、95 (アスパラギン酸)、97 (グルタミン酸)、99 (セリン)、104 (バリン)、114 (イソロイシン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれバリン、バリン、セリン、グルタミン、アスパラギン、リジン、スレオニン、メチオニン、バリン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 重鎖を「h # 3 2 A 1 - T 6 H タイプ重鎖」と命名した。

[0246] h # 3 2 A 1 - T 6 H タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 59 に記載されている。配列番号 59 のアミノ酸配列の 1 乃至 19 番目のアミノ酸残基からなる配列、20 乃至 140 番目のアミノ酸残基からなる配列、141 乃至 470 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 59 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 58 に記載されている。配列番号 58 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 1410 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 58 のヌクレオチド配列及び配列番号 59 のアミノ酸配列は、図 31 にも記載されている。

[0247] b) - v i) h # 3 2 A 1 - T 7 H タイプ重鎖：

配列表の配列番号 28 に示される # 3 2 A 1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、89 (バリン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、105 (セリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン)

をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、フェニルアラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1重鎖を「h#32A1-T7Hタイプ重鎖」と命名した。

[0248] h#32A1-T7Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号72に記載されている。配列番号72のアミノ酸配列の1乃至121番目のアミノ残基からなる配列、122乃至451番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号72のアミノ酸配列は、図38にも記載されている。

[0249] b) -v i i) h#32A1-T8Hタイプ重鎖：

配列表の配列番号28に示される#32A1重鎖のアミノ酸番号23（イソロイシン）、24（ロイシン）、26（スレオニン）、32（リジン）、43（スレオニン）、61（グルタミン酸）、95（アスパラギン酸）、96（セリン）、97（グルタミン酸）、98（セリン）、100（バリン）、104（バリン）、105（セリン）、114（イソロイシン）、118（スレオニン）、134（バリン）、135（メチオニン）、140（ロイシン）をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、グリシン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1重鎖を「h#32A1-T8Hタイプ重鎖」と命名した。

[0250] h#32A1-T8Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号73に記載されている。配列番号73のアミノ酸配列の1乃至121番目のアミノ残基からなる配列、122乃至451番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号73のアミノ酸配列は、図38にも記載されている。

[0251] b - v i i i) h#32A1-T9Hタイプ重鎖：

配列表の配列番号 28 に示される #32A1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、61 (グルタミン酸)、89 (バリン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリン に置き換えることを伴い設計されたヒト化 #32A1 重鎖を「h#32A1-T9Hタイプ重鎖」と命名した。

[0252] h#32A1-T9Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 74 に記載されている。配列番号 74 のアミノ酸配列の 1 乃至 121 番目のアミノ残基からなる配列、122 乃至 451 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号 74 のアミノ酸配列は、図 38 にも記載されている。

[0253] b) -ix) h#32A1-T10Hタイプ重鎖:

配列表の配列番号 28 に示される #32A1 重鎖のアミノ酸番号 23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、105 (セリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリン に置き換えることを伴い設計されたヒト化 #32A1 重鎖を「h#32A1-T10Hタイプ重鎖」と命名した。

[0254] h#32A1-T10Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号

75に記載されている。配列番号75のアミノ酸配列の1乃至121番目のアミノ残基からなる配列、122乃至451番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号75のアミノ酸配列は、図39にも記載されている。

[0255] b) -x) h#32A1-T11Hタイプ重鎖:

配列表の配列番号28に示される#32A1重鎖のアミノ酸番号23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、89 (バリン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、フェニルアラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1重鎖を「h#32A1-T11Hタイプ重鎖」と命名した。

[0256] h#32A1-T11Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号76に記載されている。配列番号76のアミノ酸配列の1乃至121番目のアミノ残基からなる配列、122乃至451番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号76のアミノ酸配列は、図39にも記載されている。

[0257] b) -xi) h#32A1-T12Hタイプ重鎖:

配列表の配列番号28に示される#32A1重鎖のアミノ酸番号23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、61 (グルタミン酸)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれロイ

シン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、グリシン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1重鎖を「h#32A1-T12Hタイプ重鎖」と命名した。

[0258] h#32A1-T12Hタイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号77に記載されている。配列番号77のアミノ酸配列の1乃至121番目のアミノ残基からなる配列、122乃至451番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号77のアミノ酸配列は、図39にも記載されている。

[0259] c) #32A1軽鎖のヒト化

c) - i) h#32A1-T1Lタイプ軽鎖:

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、29（アラニン）、29-30の間（欠損残基）、36（グルタミン）、41（セリン）、66（グルタミン）、68（アルギニン）、81（イソロイシン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、110（フェニルアラニン）、122（アラニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T1Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0260] h#32A1-T1Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号61に記載されている。配列番号61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61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60に記載されている。配列番号60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60のヌクレオチド配列及び配列番号61のアミノ酸配列は、図32にも記載されている。

[0261] c) - i i) h # 3 2 A 1 - T 2 L タイプ軽鎖 :

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、29（アラニン）、29-30の間（欠損残基）、36（グルタミン）、66（グルタミン）、81（イソロイシン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T2Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0262] h # 3 2 A 1 - T 2 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号63に記載されている。配列番号63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63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62に記載されている。配列番号62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62のヌクレオチド配列及び配列番号63のアミノ酸配列は、図33にも記載されている。

[0263] c) - i i i) h # 3 2 A 1 - T 3 L タイプ軽鎖 :

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 29 (アラニン)、29-30 の間 (欠損残基)、36 (グルタミン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれアスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 3 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0264] h # 3 2 A 1 - T 3 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 65 に記載されている。配列番号 65 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 65 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 64 に記載されている。配列番号 64 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 64 のヌクレオチド配列及び配列番号 65 のアミノ酸配列は、図 34 にも記載されている。

[0265] c) - i v) h # 3 2 A 1 - T 4 L タイプ軽鎖 :

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 36 (グルタミン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれグルタミン酸、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を

「h # 3 2 A 1 - T 4 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0266] h # 3 2 A 1 - T 4 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 7 に記載されている。配列番号 6 7 のアミノ酸配列の 1 乃至 2 0 番目のアミノ残基からなる配列、2 1 乃至 1 3 2 番目のアミノ酸残基からなる配列、1 3 3 乃至 2 3 7 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 6 7 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 6 6 に記載されている。配列番号 6 6 のヌクレオチド配列の 1 乃至 6 0 番目のヌクレオチドからなる配列、6 1 乃至 3 9 6 番目のヌクレオチドからなる配列、4 0 0 乃至 7 1 1 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 6 6 のヌクレオチド配列及び配列番号 6 7 のアミノ酸配列は、図 3 5 にも記載されている。

[0267] c) - v) h # 3 2 A 1 - T 5 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 3 0 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 2 9 (アラニン)、2 9 - 3 0 の間 (欠損残基)、3 6 (グルタミン)、4 1 (セリン)、6 6 (グルタミン)、6 8 (アルギニン)、9 9 (アスパラギン)、1 0 0 (プロリン)、1 0 1 (バリン)、1 0 4 (アスパラギン酸)、1 0 6 (イソロイシン)、1 1 0 (フェニルアラニン)、1 2 2 (アラニン)、1 2 3 (グリシン)、1 2 7 (ロイシン)、1 2 9 (ロイシン)、1 3 0 (アルギニン)、1 3 2 (アラニン) をそれぞれアスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、リジン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 5 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0268] h # 3 2 A 1 - T 5 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 6 9 に記載されている。配列番号 6 9 のアミノ酸配列の 1 乃至 2 0 番目のアミノ残基からなる配列、2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなる配列、1 3 4 乃至 2 3 8 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 69 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 68 に記載されている。配列番号 68 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 68 のヌクレオチド配列及び配列番号 69 のアミノ酸配列は、図 36 にも記載されている。

[0269] c) -v i) h # 3 2 A 1 - T 6 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 29 (アラニン)、29-30 の間 (欠損残基)、36 (グルタミン)、66 (グルタミン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれアスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 6 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0270] h # 3 2 A 1 - T 6 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 71 に記載されている。配列番号 71 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 71 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 70 に記載されている。配列番号 70 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 70 のヌクレオチド配列及び配列番号 71 のアミノ酸配列は、図 37 にも記載されている。

[0271] c) -v i i) h # 3 2 A 1 - T 7 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 24 (ロイシン)、29 (アラニン)、29-30 の間 (欠損残基)、36 (グルタミン)、66 (グルタミン)、68 (アルギニン)、81 (イソロイシン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、108 (スレオニン)、110 (フェニルアラニン)、122 (アラニン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 7 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0272] h # 3 2 A 1 - T 7 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 78 に記載されている。配列番号 78 のアミノ酸配列の 1 乃至 113 番目のアミノ残基からなる配列、114 乃至 218 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号 78 のアミノ酸配列は、図 40 にも記載されている。

[0273] c) -v i i i) h # 3 2 A 1 - T 8 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 24 (ロイシン)、29 (アラニン)、29-30 の間 (欠損残基)、36 (グルタミン)、41 (セリン)、66 (グルタミン)、81 (イソロイシン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、108 (スレオニン)、110 (フェニルアラニン)、122 (アラニン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チ

ロシン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T8Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0274] また、h#32A1-T8Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号79に記載されている。配列番号79のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号79のアミノ酸配列は、図40にも記載されている。

[0275] c) -ix) h#32A1-T9Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、29（アラニン）、29-30の間（欠損残基）、36（グルタミン）、41（セリン）、66（グルタミン）、68（アルギニン）、81（イソロイシン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、122（アラニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T9Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0276] また、h#32A1-T9Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号80に記載されている。配列番号80のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号80のアミノ酸配列は、図40にも記載されている。

[0277] c) -x) h#32A1-T10Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロ

イシン)、29(アラニン)、29-30の間(欠損残基)、36(グルタミン)、41(セリン)、66(グルタミン)、68(アルギニン)、81(イソロイシン)、99(アスパラギン)、100(プロリン)、101(バリン)、104(アスパラギン酸)、106(イソロイシン)、108(スレオニン)、110(フェニルアラニン)、127(ロイシン)、129(ロイシン)、130(アルギニン)、132(アラニン)をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T10Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0278] また、h#32A1-T10Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号81に記載されている。配列番号81のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号81のアミノ酸配列は、図40にも記載されている。

[0279] c) -xi) h#32A1-T11Lタイプ軽鎖:

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24(ロイシン)、29(アラニン)、29-30の間(欠損残基)、36(グルタミン)、66(グルタミン)、81(イソロイシン)、99(アスパラギン)、100(プロリン)、101(バリン)、104(アスパラギン酸)、106(イソロイシン)、108(スレオニン)、110(フェニルアラニン)、122(アラニン)、127(ロイシン)、129(ロイシン)、130(アルギニン)、132(アラニン)をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T11Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0280] また、h # 3 2 A 1 - T 1 1 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 2 に記載されている。配列番号 8 2 のアミノ酸配列の 1 乃至 1 1 3 番目のアミノ残基からなる配列、1 1 4 乃至 2 1 8 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号 8 2 のアミノ酸配列は、図 4 0 にも記載されている。

[0281] c) - x i i) h # 3 2 A 1 - T 1 2 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 3 0 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 2 4 (ロイシン)、2 9 (アラニン)、2 9 - 3 0 の間 (欠損残基)、3 6 (グルタミン)、6 6 (グルタミン)、6 8 (アルギニン)、8 1 (イソロイシン)、9 9 (アスパラギン)、1 0 0 (プロリン)、1 0 1 (バリン)、1 0 4 (アスパラギン酸)、1 0 6 (イソロイシン)、1 0 8 (スレオニン)、1 2 2 (アラニン)、1 2 7 (ロイシン)、1 2 9 (ロイシン)、1 3 0 (アルギニン)、1 3 2 (アラニン) をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 1 2 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0282] また、h # 3 2 A 1 - T 1 2 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 3 に記載されている。配列番号 8 3 のアミノ酸配列の 1 乃至 1 1 3 番目のアミノ残基からなる配列、1 1 4 乃至 2 1 8 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号 8 3 のアミノ酸配列は、図 4 1 にも記載されている。

[0283] c) - x i i i) h # 3 2 A 1 - T 1 3 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 3 0 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 2 4 (ロイシン)、2 9 (アラニン)、2 9 - 3 0 の間 (欠損残基)、3 6 (グルタミン)、6 6 (グルタミン)、6 8 (アルギニン)、8 1 (イソロイシン)、9 9 (アスパラギン)、1 0 0 (プロリン)、1 0 1 (バリン)、1 0 4 (アスパラギン酸)、1 0 6 (イソロイシン)、1 0 8 (スレオニン)、1

10（フェニルアラニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T13Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0284] また、h#32A1-T13Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号84に記載されている。配列番号84のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号84のアミノ酸配列は、図41にも記載されている。

[0285] c) -xiv) h#32A1-T14Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、29（アラニン）、29-30の間（欠損残基）、36（グルタミン）、41（セリン）、66（グルタミン）、81（イソロイシン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、122（アラニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T14Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0286] また、h#32A1-T14Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号85に記載されている。配列番号85のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号85のアミノ酸配列は、図41にも記載されている。

[0287] c) -x v) h # 3 2 A 1 - T 1 5 L タイプ軽鎖 :

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 24 (ロイシン)、29 (アラニン)、29-30 の間 (欠損残基)、36 (グルタミン)、41 (セリン)、66 (グルタミン)、81 (イソロイシン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、108 (スレオニン)、110 (フェニルアラニン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 1 5 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0288] また、h # 3 2 A 1 - T 1 5 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 86 に記載されている。配列番号 86 のアミノ酸配列の 1 乃至 113 番目のアミノ残基からなる配列、114 乃至 218 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号 86 のアミノ酸配列は、図 41 にも記載されている。

[0289] c) -x v i) h # 3 2 A 1 - T 1 6 L タイプ軽鎖 :

配列表の配列番号 30 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 24 (ロイシン)、29 (アラニン)、29-30 の間 (欠損残基)、36 (グルタミン)、41 (セリン)、66 (グルタミン)、68 (アルギニン)、81 (イソロイシン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、108 (スレオニン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽

鎖を「h # 3 2 A 1 - T 1 6 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0290] また、h # 3 2 A 1 - T 1 6 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 7 に記載されている。配列番号 8 7 のアミノ酸配列の 1 乃至 1 1 3 番目のアミノ残基からなる配列、1 1 4 乃至 2 1 8 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号 8 7 のアミノ酸配列は、図 4 1 にも記載されている。

[0291] c) - x v i i) h # 3 2 A 1 - T 1 7 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 3 0 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 2 4 (ロイシン)、2 9 (アラニン)、2 9 - 3 0 の間 (欠損残基)、3 6 (グルタミン)、6 6 (グルタミン)、8 1 (イソロイシン)、9 9 (アスパラギン)、1 0 0 (プロリン)、1 0 1 (バリン)、1 0 4 (アスパラギン酸)、1 0 6 (イソロイシン)、1 0 8 (スレオニン)、1 2 2 (アラニン)、1 2 7 (ロイシン)、1 2 9 (ロイシン)、1 3 0 (アルギニン)、1 3 2 (アラニン) をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、グリシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 # 3 2 A 1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 1 7 L タイプ軽鎖」と命名した。

[0292] また、h # 3 2 A 1 - T 1 7 L タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 8 8 に記載されている。配列番号 8 8 のアミノ酸配列の 1 乃至 1 1 3 番目のアミノ残基からなる配列、1 1 4 乃至 2 1 8 番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号 8 8 のアミノ酸配列は、図 4 2 にも記載されている。

[0293] c) - x v i i i) h # 3 2 A 1 - T 1 8 L タイプ軽鎖：

配列表の配列番号 3 0 に示される # 3 2 A 1 軽鎖のアミノ酸番号 2 4 (ロイシン)、2 9 (アラニン)、2 9 - 3 0 の間 (欠損残基)、3 6 (グルタミン)、6 6 (グルタミン)、8 1 (イソロイシン)、9 9 (アスパラギン)、1 0 0 (プロリン)、1 0 1 (バリン)、1 0 4 (アスパラギン酸)、

１０６（イソロイシン）、１０８（スレオニン）、１１０（フェニルアラニン）、１２７（ロイシン）、１２９（ロイシン）、１３０（アルギニン）、１３２（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、チロシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃３２Ａ１軽鎖を「ｈ＃３２Ａ１－Ｔ１８Ｌタイプ軽鎖」と命名した。

[0294] また、ｈ＃３２Ａ１－Ｔ１８Ｌタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号８９に記載されている。配列番号８９のアミノ酸配列の１乃至１１３番目のアミノ残基からなる配列、１１４乃至２１８番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号８９のアミノ酸配列は、図４２にも記載されている。

[0295] c) - x i x) h＃３２Ａ１－Ｔ１９Ｌタイプ軽鎖：

配列表の配列番号３０に示される＃３２Ａ１軽鎖のアミノ酸番号２４（ロイシン）、２９（アラニン）、２９－３０の間（欠損残基）、３６（グルタミン）、６６（グルタミン）、６８（アルギニン）、８１（イソロイシン）、９９（アスパラギン）、１００（プロリン）、１０１（バリン）、１０４（アスパラギン酸）、１０６（イソロイシン）、１０８（スレオニン）、１２７（ロイシン）、１２９（ロイシン）、１３０（アルギニン）、１３２（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、リジン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化＃３２Ａ１軽鎖を「ｈ＃３２Ａ１－Ｔ１９Ｌタイプ軽鎖」と命名した。

[0296] また、ｈ＃３２Ａ１－Ｔ１９Ｌタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号９０に記載されている。配列番号９０のアミノ酸配列の１乃至１１３番目のアミノ残基からなる配列、１１４乃至２１８番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号９

Oのアミノ酸配列は、図42にも記載されている。

[0297] c) - x x) h # 3 2 A 1 - T 2 0 Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、29（アラニン）、29-30の間（欠損残基）、36（グルタミン）、41（セリン）、66（グルタミン）、81（イソロイシン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アスパラギン、プロリン、バリン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、バリン、バリン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 2 0 Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0298] また、h # 3 2 A 1 - T 2 0 Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号91に記載されている。配列番号91のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号91のアミノ酸配列は、図42にも記載されている。

[0299] c) - x x i) h # 3 2 A 1 - T 2 1 Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号21（アスパラギン酸）、24（ロイシン）、29-30の間（欠損残基）、31（アラニン）、32（バリン）、34（ロイシン）、36（グルタミン）、40（イソロイシン）、66（グルタミン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、102（グルタミン）、103（アラニン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、110（フェニルアラニン）、122（アラニン）、123（グリシン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれグルタミン酸、メチオニン、スレオニン

、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、アラニン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32 A1軽鎖を「h#32 A1-T21Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0300] また、h#32 A1-T21Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号92に記載されている。配列番号92のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号92のアミノ酸配列は、図42にも記載されている。

[0301] c) -x x i i) h#32 A1-T22Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32 A1軽鎖のアミノ酸番号21（アスパラギン酸）、24（ロイシン）、29-30の間（欠損残基）、31（アラニン）、32（バリン）、34（ロイシン）、36（グルタミン）、40（イソロイシン）、66（グルタミン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、102（グルタミン）、103（アラニン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、123（グリシン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれグルタミン酸、メチオニン、スレオニン、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、アラニン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32 A1軽鎖を「h#32 A1-T22Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0302] また、h#32 A1-T22Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号93に記載されている。配列番号93のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号9

3のアミノ酸配列は、図43にも記載されている。

[0303] c) -x x i i i) h # 3 2 A 1 - T 2 3 Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号24（ロイシン）、29-30の間（欠損残基）、31（アラニン）、32（バリン）、34（ロイシン）、36（グルタミン）、40（イソロイシン）、66（グルタミン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、102（グルタミン）、103（アラニン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニン）をそれぞれメチオニン、スレオニン、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、アラニン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h # 3 2 A 1 - T 2 3 Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0304] また、h # 3 2 A 1 - T 2 3 Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号94に記載されている。配列番号94のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号94のアミノ酸配列は、図43にも記載されている。

[0305] c) -x x i v) h # 3 2 A 1 - T 2 4 Lタイプ軽鎖：

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号21（アスパラギン酸）、29-30の間（欠損残基）、31（アラニン）、32（バリン）、34（ロイシン）、36（グルタミン）、40（イソロイシン）、66（グルタミン）、99（アスパラギン）、100（プロリン）、101（バリン）、102（グルタミン）、103（アラニン）、104（アスパラギン酸）、106（イソロイシン）、108（スレオニン）、110（フェニルアラニン）、122（アラニン）、123（グリシン）、127（ロイシン）、129（ロイシン）、130（アルギニン）、132（アラニ

ン)をそれぞれグルタミン酸、スレオニン、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、アラニン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T24Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0306] また、h#32A1-T24Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号95に記載されている。配列番号95のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号95のアミノ酸配列は、図43にも記載されている。

[0307] c) -x x v) h#32A1-T25Lタイプ軽鎖:

配列表の配列番号30に示される#32A1軽鎖のアミノ酸番号29-30の間(欠損残基)、31(アラニン)、32(バリン)、34(ロイシン)、36(グルタミン)、40(イソロイシン)、99(アスパラギン)、100(プロリン)、101(バリン)、102(グルタミン)、103(アラニン)、104(アスパラギン酸)、106(イソロイシン)、110(フェニルアラニン)、127(ロイシン)、129(ロイシン)、130(アルギニン)、132(アラニン)をそれぞれスレオニン、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化#32A1軽鎖を「h#32A1-T25Lタイプ軽鎖」と命名した。

[0308] また、h#32A1-T25Lタイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号96に記載されている。配列番号96のアミノ酸配列の1乃至113番目のアミノ残基からなる配列、114乃至218番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれ軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号96のアミノ酸配列は、図43にも記載されている。

実施例 23

[0309] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒト化抗体遺伝子の作製

a) h # 3 2 A 1 - T 1 L、h # 3 2 A 1 - T 2 L、h # 3 2 A 1 - T 3 L、h # 3 2 A 1 - T 4 L、h # 3 2 A 1 - T 5 L 及び h # 3 2 A 1 - T 6 L タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号 6 1 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3、配列番号 6 3 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3、配列番号 6 5 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3、配列番号 6 7 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 2、配列番号 6 9 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3 及び配列番号 7 1 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3 にそれぞれ示される、分泌シグナルと融合した h # 3 2 A 1 - T 1 L、h # 3 2 A 1 - T 2 L、h # 3 2 A 1 - T 3 L、h # 3 2 A 1 - T 4 L、h # 3 2 A 1 - T 5 L 及び h # 3 2 A 1 - T 6 L タイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含む DNA を合成し（MBL 社、人工遺伝子合成サービス）、制限酵素 N h e I 及び B s i W I で切り出された DNA 断片を、ヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクター（p E F 6 K C L）を制限酵素 N h e I 及び B s i W I で切断した箇所に挿入することにより、h # 3 2 A 1 - T 1 L、h # 3 2 A 1 - T 2 L、h # 3 2 A 1 - T 3 L、h # 3 2 A 1 - T 4 L、h # 3 2 A 1 - T 5 L 及び h # 3 2 A 1 - T 6 L タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 1 L」、「p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 2 L」、「p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 3 L」、「p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 4 L」、「p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 5 L」及び「p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 6 L」と命名した。

[0310] b) h # 3 2 A 1 - T 1 H、h # 3 2 A 1 - T 2 H、h # 3 2 A 1 - T 3 H、h # 3 2 A 1 - T 5 H 及び h # 3 2 A 1 - T 6 H 重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号 5 1、5 3、5 5、5 7 及び 5 9 のアミノ酸番号 1 乃至 1 4 0 にそれぞれ示される、分泌シグナルと融合した h # 3 2 A 1 - T 1 H

、h#32A1-T2H、h#32A1-T3H、h#32A1-T5H及びh#32A1-T6H重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むDNAを合成し（MBL社 人工遺伝子合成サービス）、制限酵素BspIで切り出されるDNA断片を、ヒト化抗体重鎖発現汎用ベクター（pEF1/FCCU-1）を制限酵素BspIで切断した箇所に挿入することにより、h#32A1-T1H、h#32A1-T2H、h#32A1-T3H、h#32A1-T5H及びh#32A1-T6H重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「pEF1/FCCU/h#32A1-T1H」、「pEF1/FCCU/h#32A1-T2H」「pEF1/FCCU/h#32A1-T3H」「pEF1/FCCU/h#32A1-T5H」及び「pEF1/FCCU/h#32A1-T6H」と命名した。

実施例 24

[0311] ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体#32A1のヒト化抗体の調製

a) ヒト化抗体の生産

対数増殖期の293FreeStyle細胞 1.5×10^8 を新鮮な100 mlのFreeStyle293 Expression Medium（Invitrogen社）に播種し、37℃、8%CO₂インキュベーターで振とう培養した（125rpm）。Polyethyleneimine（Polyscience #24765）1mgをOpti-ProSFM培地（Invitrogen社製）4mlに溶解し、室温で5分間放置した。PureLink HiPure Plasmidキット（Invitrogen社）を用いて調製した重鎖発現プラスミド（0.05mg）及び軽鎖発現プラスミド（0.15mg）を4mlのOpti-ProSFM培地（Invitrogen社）に懸濁した。室温で5分間放置したPolyethyleneimine/Opti-ProSFM混合液4mlに、発現プラスミド/Opti-ProSFM混合液4mlを加え、さらに室温5分間放置した。次にPolyethyleneimine/発現プラスミド/Opti-ProSFM混合液4mlに、発現プラスミド/Opti-ProSFM混合液4mlを加え、さらに室温5分間放置した。次にPolyethyleneimine/発現プラスミド/Opti-ProSFM混合液4mlに、発現プラスミド/Opti-ProSFM混合液4mlを加え、さらに室温5分間放置した。

t i P r o S F M 混合液 8 m l を 2 9 3 F r e e S t y l e 細胞懸濁液に添加し、振とう培養を続けた。37℃、8%CO₂中で7日間培養したのち、培養上清を回収した。

[0312] b) ヒト化抗体の精製

上記 a) で得られた培養上清を、P r o t e i n A アフィニティークロマトグラフィーで精製した。500 m l 容キャップつきフラスコに培養上清 100 m l を入れ、PBS で平衡化した M a b S e l e c t S u R e (G E H e a l t h c a r e B i o - s c i e n c e 社製) 懸濁液 (50% スラリー) 1 m l を添加した。10℃のインキュベーター中、100 r p m で一晩攪拌した。Z e b a S p i n C o l u m n , e m p t y 5 m L (P I E R C E 社) に 2 9 3 F 培養上清 / M a b S e l e c t S u R e 懸濁液をアプライした。樹脂がカラムに全て入ったのち、1 M N a C l 10 m l で洗浄した。次に 1 M アルギニン溶液 (pH 4.0) 1 m l をアプライし、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を C e n t r i f u g a l F i l t e r D e v i c e (A m i c o n U l t r a 4 , 分画分子量 50 K 、ミリポア社) に添加し、クエン酸緩衝への液置換及び濃縮をおこなった。最終的な容量を 200 μ l とし、精製サンプルとした。

[0313] p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 1 L と p E F 1 / F C C U / h # 3 2 A 1 - T 1 H との組合せによって取得された # 3 2 A 1 のヒト化抗体を「h # 3 2 A 1 - T 1」、p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 2 L と p E F 1 / F C C U / h # 3 2 A 1 - T 2 H との組合せによって取得された # 3 2 A 1 のヒト化抗体を「h # 3 2 A 1 - T 2」、p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 3 L と p E F 1 / F C C U / h # 3 2 A 1 - T 3 H との組合せによって取得された # 3 2 A 1 のヒト化抗体を「h # 3 2 A 1 - T 3」、p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 4 L と p E F 1 / F C C U / h # 3 2 A 1 - T 3 H との組合せによって取得された # 3 2 A 1 のヒト化抗体を「h # 3 2 A 1 - T 4」、p E F 6 K C L / h # 3 2 A 1 - T 5 L と p E F 1 / F C C U / h # 3 2 A 1 - T 5 H との組合せによって取得された # 3 2 A 1 のヒト化抗体を

「h#32A1-T5」、pEF6KCL/h#32A1-T6LとpEF1/FCCU/h#32A1-T6Hとの組合せによって取得された#32A1のヒト化抗体を「h#32A1-T6」と命名した。

実施例 25

[0314] ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体#32A1のヒト化抗体のマウスSiglec-15蛋白質に対する結合性評価

ラット抗マウスSiglec-15#32A1ヒト化抗体T1-T6のマウスSiglec-15-Fc及びヒトSiglec-15-Fcに対する結合性を以下の方法で評価した。実施例4にて精製したマウスSiglec-15-Fc、あるいは実施例12にて精製したヒトSiglec-15-FcをPBSで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈後、イムノプレート（Nunc社製 #437111）に $100\mu\text{l}$ /ウェルで分注し、 4°C で一晩静置することでプレートに各蛋白質を吸着させた。翌日、ウェルをPBS-T液（PBS、0.05%（v/v） Tween 20）で5回洗浄後、スキムミルク（森永乳業社製）をPBSで5%に希釈した溶液を $350\mu\text{l}$ /ウェルで分注し、室温で2時間静置した。ウェル中の液を除去しPBS-T液にて5回洗浄後、実施例24で調製した精製ラット抗マウスSiglec-15#32A1ヒト化抗体T1-T6あるいは実施例19にて調製したヒトキメラ抗体を、0.5%スキムミルク含有PBS液を用いて終濃度が $1\sim 0.004\mu\text{g}/\text{ml}$ （4倍希釈系列）となるように希釈後 $100\mu\text{l}$ /ウェルで分注し、2時間室温で静置した。その際、各抗体濃度はスペクトロホトメーターDU7400（ベックマン社製）にて 280nm を測定し、各抗体のモル分子吸光係数に基づき決定した。PBS-T液で5回ウェルを洗浄後、TBS-T液（TBS、0.05%（v/v） Tween 20）で2500倍に希釈したAlkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG（Jackson ImmunoResearch社製 #109-055-097）を $100\mu\text{l}$ /ウェルで添加し、室温で1時間静置した。ウェル中の

液を除去し、TBS-T液で5回ウエルを洗浄した後、蛍光基質液（Roc h社製 #11681982001）を100 μ l/ウエルで添加し蛍光 反応を行った。マウスS i g l e c -15-Fc吸着プレートは蛍光基質液 添加10分後、ヒトS i g l e c -15-Fcプレートは15分後に、各々 スペクトラブックAM5（モレキュラーデバイス社製）にて蛍光強度を測定 した。その結果、検討したラット抗マウスS i g l e c -15ヒト抗体6 検体全てにおいて、抗体の濃度に依存したマウスS i g l e c -15蛋白質 検出（図18）及びヒトS i g l e c -15蛋白質（図19）への結合が確認さ れた。

実施例 26

[0315] ラット抗マウスS i g l e c -15モノクローナル抗体#32A1のキメラ 抗体の添加による、マウス骨髓非付着細胞の破骨細胞分化への影響（TNF α 刺激）

実施例6で調製したラット抗マウスS i g l e c -15モノクローナル抗 体#32A1及び実施例19で調製したラット抗マウスS i g l e c -15 モノクローナル抗体#32A1のキメラ抗体を用い、マウス骨髓非付着細胞 のTNF α 刺激による破骨細胞分化への影響を検討した。実施例8の方法で 調製したマウス骨髓非付着細胞を、10%ウシ胎児血清（FBS）、10n g/m l M-CSF、及び2n g/m l TGF- β （R&D S y s t g/m l α -MEM培地で1.5 $\times$ 10⁵細胞/m lに調製したも のを96穴プレートに200 μ l播種して、CO₂インキュベータ ー中で2日間培養した。96穴プレート中の古い培養液を除去して、ヒト遺 伝子組換え型TNF α （R&D S y s t e m s社製）を終濃度30n g/m l、M-CSFを10n g/m lになるように添加した10% FBS含 有MEM- α 培地100 μ lを添加した。この細胞培養液に、実施例9で作 製したラット抗マウスS i g l e c -15モノクローナル抗体#32A1及 び実施例19で作製したラット抗マウスS i g l e c -15モノクローナル 抗体#32A1のキメラ抗体を0.125~4 μ g/m l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した。同時に特許W O 9 6 / 2 6 2 1 7 の明細書に記載の方法で調製したヒト遺伝子組換え型 O C I F / O P G を 100 ng/ml の濃度になるように添加して培養したウェルも準備した。培養終了後に、L e u k o c y t e A c i d P h o s p h a t a s e k i t (シグマ社製) を用いて、キットに添付のプロトコールに従い T R A P 染色を行い、T R A P 陽性多核破骨細胞の形成を観察した。その結果、抗マウス S i g l e c - 1 5 ポリクローナル抗体の添加によって T R A P 陽性で巨大な多核破骨細胞の形成が抑制された (図 2 0)。ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 及びそのキメラ抗体を添加した場合でも単核で小型の破骨細胞は形成されたが、 $\text{TNF } \alpha$ で誘導される大型で多核の破骨細胞の形成はほぼ完全に抑制された。その一方で、RANKL ブロッカーである O C I F / O P G を十分量添加しても、大型で多核の破骨細胞の形成は殆ど抑制されなかった。また同様に、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 (T R A P) 活性を実施例 9 に記載の操作で測定した。酵素反応停止後に各ウェルの 405 nm の吸光度を測定して T R A P 活性の指標にした。結果を図 2 1 に示した。# 3 2 A 1 抗体及び # 3 2 A 1 のキメラ抗体において、 125 ng/ml から $4 \mu \text{ g/ml}$ の範囲で、顕著な T R A P 活性の抑制が認められた。これらの結果から、ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体及びそのキメラ抗体は $\text{TNF } \alpha$ で誘導される破骨細胞の分化成熟における細胞融合の過程を強く抑制することが示された。

実施例 27

[0316] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 8 A 1、# 3 2 A 1 のラット破骨細胞形成試験での生物活性評価

実施例 6 において調製したラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 8 A 1、# 3 2 A 1 を用い、ラット骨髓非付着細胞の破骨細胞への分化の影響を検討した。実施例 8 の方法を改変してラット骨髓非付着細胞を調製した。即ち、12週齢の雌 F 3 4 4 ラットの両足より大腿骨を摘出し

、軟組織を除去した。この大腿骨の両端を切り落とし、23ゲージの注射針付きシリンジによりMEM- α 培地を注入して骨髓細胞を押し出して、遠心チューブに回収した。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 (RED BLOOD CELL LYSING BUFFER、シグマ社製)を加えて懸濁し、室温で5分間放置した。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、セルスレイナー (40 μ m Nylon、BDファルコン社製)を通して凝集物を除いた。この細胞を75cm²-T フラスコ (付着細胞用)に移して、CO₂インキュベーター中で1晩培養した。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、ラット骨髓非付着細胞として使用した。

[0317] この方法で調製したラット骨髓非付着細胞を実施例9の方法に準じて培養してラット破骨細胞形成試験を実施した。即ち、調製したラット骨髓非付着細胞を10% FBSと10ng/ml M-CSF (R&D Systems社製)を含む α -MEM培地で1.5 $\times$ 10⁵細胞/mlに調製したものを96穴プレートに200 μ l播種して、CO₂インキュベーター中で2日間培養した。96穴プレート中の古い培養液を除去して、ヒトRANKL (RANKL、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100 μ lを添加した。この細胞培養液に、実施例6において作製したラット抗マウスIgG1-15モノクローナル抗体#8A1、#32A1を31~1000ng/mlの濃度になるように添加して、更に3日間CO₂インキュベーター中で培養した。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) 活性を実施例9に記載の方法で測定した。酵素反応停止後に各ウェルの405nmの吸光度を測定してTR

A P 活性の指標にした。結果を図 2 2 に示した。# 8 A 1 抗体では、6 3 n g / m l 以上の濃度で用量依存的な T R A P 活性の抑制が認められた。また # 3 2 A 1 抗体では、3 1 n g / m l 以上の濃度で用量依存的な T R A P 活性の抑制が認められた。これらの結果より、ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 8 A 1、# 3 2 A 1 はマウスの破骨細胞形成と同様にラットの破骨細胞形成も強く抑制すること、及び # 3 2 A 1 抗体の i n v i t r o でのラット破骨細胞形成抑制活性は # 8 A 1 抗体よりも強いことが示された。

実施例 28

[0318] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒト化抗体の設計 (2)

a) # 3 2 A 1 のヒト化バージョンの設計

a) - i) ヒト化 # 3 2 A 1 に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化 # 3 2 A 1 抗体の構築を、CDR グラフティング (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 , 1 0 0 2 9 - 1 0 0 3 3 (1 9 8 9)) として一般的に公知の方法によって行った。CDR 領域の定義は、CDR H 2 以外は全て K a b a t の定義 (S E Q U E N C E S O F P R O T E I N S O F I M M U N O L O G I C A L I N T E R E S T V O L . I , F I F T H E D T I O N (1 9 9 1)) を用いた。CDR H 2 については、独自の定義を用いて C 末端を K a b a t の定義より 5 残基短縮した。このように定義された CDR H 2 を含む重鎖配列では、ラット由来の CDR 配列が短縮され、ヒトフレームワーク配列がより多く取り入れられており、ヒトに投与された際に異種抗原としてより一層認識されにくい。アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。# 3 2 A 1 のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列の K a b a t データベース (N u c . A c i d R e s . 2 9 , 2 0 5 - 2 0 6 (2 0 0 1)) の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、L 鎖は G F 4 / 1 . 1 ' C L がフレームワーク領域についての 7 1 % 配列相同性に起因して

、アクセプターとして選択された。H鎖はM37GO37' CLがフレームワーク領域についての73%の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。L鎖はGF4/1. 1 'CLについて、H鎖はM37GO37' CLについてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、#32A1についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、実施例22a) - i) で構築された#32A1の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) によって与えられる基準によって選択された。選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化#32A1配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

[0319] a) - i i) #32A1重鎖のヒト化

a) - i i) - i) h#32A1-H1-1タイプ重鎖:

配列表の配列番号28に示される32A1のアミノ酸番号23 (イソロイシン)、24 (ロイシン)、26 (スレオニン)、32 (リジン)、43 (スレオニン)、61 (グルタミン酸)、83 (グルタミン酸)、85 (ロイシン)、86 (グルタミン酸)、89 (バリン)、95 (アスパラギン酸)、96 (セリン)、97 (グルタミン酸)、98 (セリン)、100 (バリン)、104 (バリン)、105 (セリン)、114 (イソロイシン)、118 (スレオニン)、134 (バリン)、135 (メチオニン)、140 (ロイシン) をそれぞれロイシン、バリン、セリン、グルタミン、アラニン、グリシン、アラニン、バリン、リジン、フェニルアラニン、アスパラギン、アラニン、リジン、アスパラギン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、バリン、アラニン、スレオニン、ロイシン、セリンに置き換えることを伴い設計されたヒト化32A1重鎖を「h#32A1-H1-1タイプ重鎖」と命名した。

[0320] h#32A1-H1-1タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号

99に記載されている。配列番号99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99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98に記載されている。配列番号98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98のヌクレオチド配列及び配列番号99のアミノ酸配列は、図54にも記載されている。

[0321]

a) - ! ! !) # 3 2 A 1 軽鎖のヒト化

a) - ! ! !) - !) h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 タイロ軽鎖 :

配列表の配列番号30に示される32A1のアミノ酸番号21(アスパラギン酸)、23(バリン)、24(ロイシン)、29-30の間(欠損残基)、31(アラニン)、32(バリン)、34(ロイシン)、36(グルタミン)、40(イソロイシン)、66(グルタミン)、99(アスパラギン酸)、100(プロリン)、101(バリン)、102(グルタミン)、103(アラニン)、104(アスパラギン酸)、106(イソロイシン)、108(アミノ酸)、110(フェニルアラニン)、122(アラニン)、123(グリシン)、127(ロイシン)、129(ロイシン)、130(アルギニン)、132(アラニン)をそれぞれグルタミン酸、ロイシン、メチオニン、アミノ酸、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、アラニン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、リジン、アミノ酸に置き換えることを伴い設計されたヒト化32A1軽鎖を「h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 タイロ軽鎖」と命名した。

[0322]

h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 タイロ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号

号 103 に記載されている。配列番号 103 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 103 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 102 に記載されている。配列番号 102 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 102 のヌクレオチド配列及び配列番号 103 のアミノ酸配列は、図 56 にも記載されている。

[0323] a) - i i i) - i i) h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 6 タイプ軽鎖 :

配列表の配列番号 30 に示される 32A1 のアミノ酸番号 21 (アスパラギン酸)、23 (バリン)、24 (ロイシン)、29-30 の間 (欠損残基)、31 (アラニン)、32 (バリン)、34 (ロイシン)、36 (グルタミン)、40 (イソロイシン)、66 (グルタミン)、99 (アスパラギン)、100 (プロリン)、101 (バリン)、102 (グルタミン)、103 (アラニン)、104 (アスパラギン酸)、106 (イソロイシン)、108 (スレオニン)、123 (グリシン)、127 (ロイシン)、129 (ロイシン)、130 (アルギニン)、132 (アラニン) をそれぞれグルタミン酸、ロイシン、メチオニン、スレオニン、セリン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸、ロイシン、アラニン、セリン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、プロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン、バリン、イソロイシン、リジン、スレオニンに置き換えることを伴い設計されたヒト化 32A1 軽鎖を「h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 6 タイプ軽鎖」と命名した。

[0324] h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 6 タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 105 に記載されている。配列番号 105 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105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104に記載されている。配列番号104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104のヌクレオチド配列及び配列番号105のアミノ酸配列は、図57にも記載されている。

[0325] b) ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒト化抗体遺伝子の作製

 b) - i) ヒト重鎖発現汎用ベクター p E G 2 の構築

配列番号106に示すヒト I g G 2 シグナル配列及び定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し (M B L 社、人工遺伝子合成サービス)、制限酵素 N h e I 及び P m e I で消化し、約1100bpのDNA断片を得た。このDNA断片を、p E F 1 / F C C U - 1 を N h e I および P m e I で消化し、約1100bpのDNA断片を取り除いて得られる約6200bpのDNA断片と結合させることにより、ヒト化抗体 (h I g G 2 型) 重鎖発現汎用ベクター p E G 2 を構築した。

[0326] b) - i i) h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号99のアミノ酸番号1乃至140に示される、分泌シグナルと融合した h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 重鎖可変領域をコードする遺伝子を含むDNAを合成し (I n v i t r o g e n)、制限酵素 B l p I で切り出されるDNA断片を、ヒト化抗体 (h I g G 2 型) 重鎖発現汎用ベクター (p E G 2) を制限酵素 B l p I で切断した箇所に挿入することにより、h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「p E G 2 / h # 3 2 A 1 - H 1 - 1」と命名した。

[0327] b) - i i i) h # 3 2 A 1 - H 5 重鎖発現ベクターの構築

実施例 2 2、b) - i v) で設計された h # 3 2 A 1 - T 5 H タイプ重鎖のシグナル配列及び定常領域を I g G 2 タイプに変更したヒト化 3 2 A 1 重鎖を「h # 3 2 A 1 - H 5 タイプ重鎖」と命名した。

[0328] h # 3 2 A 1 - H 5 タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 0 1 に記載されている。配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列の 1 乃至 1 9 番目のアミノ残基からなる配列、2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなる配列、1 4 1 乃至 4 6 6 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 1 0 1 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 0 0 に記載されている。配列番号 1 0 0 のヌクレオチド配列の 1 乃至 5 7 番目のヌクレオチドからなる配列、5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなる配列、4 2 1 乃至 1 3 9 8 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 0 0 のヌクレオチド配列及び配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列は、図 5 5 にも記載されている。

[0329] 実施例 2 3 で作製した p E F 1 / F C C U / h # 3 2 A 1 - T 5 H から制限酵素 B l p I で切り出される DNA 断片を、ヒト化抗体 (h I g G 2 型) 重鎖発現汎用ベクター (p E G 2) を制限酵素 B l p I で切断した箇所に挿入することにより、h # 3 2 A 1 - H 5 重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「p E G 2 / h # 3 2 A 1 - H 5」と命名した。

[0330] b) - i v) h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 及び h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 6 タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号 1 0 3 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3 及び配列番号 1 0 5 のアミノ酸番号 1 乃至 1 3 3 にそれぞれ示される、分泌シグナルと融合した h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 及び h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 6 タイプ軽鎖可変領域をコードする遺伝子を含む DNA を合成し (I n v i t r o g e n)、実施例 2 3 と同様の方法によって、h # 3 2 A 1 - L 2 - 1 5 及び h # 3 2 A

1-L2-16タイプ軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターをそれぞれ「pEF6KCL/h#32A1-L2-15」及び「pEF6KCL/h#32A1-L2-16」と命名した。

[0331] c) ラット抗マウスS i g l e c-15モノクローナル抗体#32A1のヒト化抗体の調製

c) - i) ヒト化抗体の生産

1. 2×10^9 個の対数増殖期のFreeStyle 293F細胞 (Invitrogen) を新鮮な1.2LのFreeStyle293 expression medium (Invitrogen) に播種し、37°C、8%CO₂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) 20mlに溶解し、次にPureLink HiPure Plasmid キット (Invitrogen社) を用いて調製したH鎖発現プラスミド (0.4mg) 及びL鎖発現プラスミド (0.8mg) を20mlのOpti-Pro SFM培地に懸濁した。Polyethyleneimine/Opti-Pro SFM混合液20mlに、発現プラスミド/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°C、8%CO₂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。

[0332] pEF6KCL/h#32A1-T5LとpEG2/h#32A1-H5との組合せによって取得された#32A1のヒト化抗体を「h#32A1-H5/L5」、pEF6KCL/h#32A1-T5LとpEG2/h#32A1-H1-1との組合せによって取得された#32A1のヒト化抗体を「h#32A1-H1-1/L5」、pEF6KCL/h#32A1-L2-15とpEG2/h#32A1-H1-1との組合せによって取得された

#32A1のヒト化抗体を「h#32A1-H1-1/L2-15」、pEF6KCL/h#32A1-L2-16とpEG2/h#32A1-H1-1との組合せによって取得された#32A1のヒト化抗体を「h#32A1-H1-1/L2-16」と命名した。

[0333] c) - i i) ヒト化抗体の精製

上記c) - i) 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）とセラミックヒドロキシルアパタイト（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1100-1200 mlを、PBSで平衡化したMabSelect SuRe（GE Healthcare Bioscience社製、HiTrapカラム：容積1 ml × 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、PBS 15-30 mlでカラムを洗浄した。次に2 Mアルギニン塩酸塩溶液（pH 4.0）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5 ml × 2 連結）で5 mM リン酸ナトリウム / 50 mM MES / 20 mM NaCl / pH 6.5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、5 mM NaPi / 50 mM MES / 20 mM NaCl / pH 6.5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2 ml）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5 ml × 2 連結）でCBS（10 mMクエン酸緩衝液 / 140 mM塩化ナトリウム、pH 6.0）への液置換を行った。最後にCentrifugal UF Filter Device VIVASP

IN20（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。各精製サンプルの容量は、h#32A1-H1-1/L5:2.2ml、h#32A1-H5/L5:1.8ml、h#32A1-H1-1/L2-16:6.0ml、h#32A1-H1-1/L2-15:2.2mlであった。

実施例 29

[0334] ラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体#32A1のヒト化抗体のマウス破骨細胞形成試験での生物活性評価

実施例24及び28によって取得されたヒト化抗体の示すマウス破骨細胞形成抑制効果を、実施例9に記載の方法を一部改変して評価した。実施例8の方法で調製したマウス骨髄非付着細胞を10% FBSと10ng/ml M-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200 μ l播種して、CO₂インキュベーター中で2日間培養した。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100 μ lを添加した。この細胞培養液に、実施例6で調製したラット抗マウスSiglec-15モノクローナル抗体（#32A1抗体）及び実施例24で調製した6種類のヒト化#32A1抗体（h#32A1-T1、h#32A1-T2、h#32A1-T3、h#32A1-T4、h#32A1-T5、h#32A1-T6）を3~100ng/mlの濃度になるように添加して、更に3日間CO₂インキュベーター中で培養した。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した。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）50 μ l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した。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)) 50 μ lを加えて室温で10分間インキュベートした。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50 μ lを加えて酵素反応を停止した。酵素反応停止後に各ウェルの405nmの吸光度を測定してTRAP活性の指標にした。結果を図44及び45に示した。またこの試験と同じ方法で、実施例6で調製したラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体(#32A1抗体)、実施例19で調製した#32A1抗体のヒトキメラ抗体、及び実施例28で調製した4種類のヒト化#32A1抗体(h#32A1-H1-1/L5、h#32A1-H5/L5、h#32A1-H1-1/L2-16、h#32A1-H1-1/L2-15)についてその生物活性を評価して、その結果を図46及び47に示した。活性を評価した10種類のヒト化#32A1抗体(h#32A1-T1、h#32A1-T2、h#32A1-T3、h#32A1-T4、h#32A1-T5、h#32A1-T6、h#32A1-H1-1/L5、h#32A1-H5/L5、h#32A1-H1-1/L2-16、h#32A1-H1-1/L2-15)の全てにおいて、ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体(#32A1抗体)、又は#32A1抗体のヒトキメラ抗体とほぼ同等の強い破骨細胞形成抑制活性が認められた。

実施例 30

[0335] ラット抗マウスS i g l e c - 1 5モノクローナル抗体#32A1のヒト化抗体添加による正常ヒト破骨前駆細胞の骨吸収活性への影響(コラーゲンコートプレートを用いた評価)

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(三光純薬より購入、カタログ番号PA-1500)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RA NKL（終濃度63.8 ng/ml）及びヒトM-CSF（終濃度33 ng/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6で調製したラット抗マウスSieg-15モノクローナル抗体 （#32A1抗体）、実施例19で調製した#32A1抗体のヒトキメラ抗 体、および実施例24及び28で調製した10種類のヒト化#32A1抗体 （h#32A1-T1、h#32A1-T2、h#32A1-T3、h#32A1-T4、h#32A1-T5、h#32A1-T6、h#32A1-T7、h#32A1-T8、h#32A1-T9、h#32A1-T10、h#32A1-T11、h#32A1-T12、h#32A1-T13、h#32A1-T14、h#32A1-T15、h#32A1-T16、h#32A1-T17、h#32A1-T18、h#32A1-T19、h#32A1-T20、h#32A1-T21、h#32A1-T22、h#32A1-T23、h#32A1-T24、h#32A1-T25、h#32A1-T26、h#32A1-T27、h#32A1-T28、h#32A1-T29、h#32A1-T30、h#32A1-T31、h#32A1-T32、h#32A1-T33、h#32A1-T34、h#32A1-T35、h#32A1-T36、h#32A1-T37、h#32A1-T38、h#32A1-T39、h#32A1-T40、h#32A1-T41、h#32A1-T42、h#32A1-T43、h#32A1-T44、h#32A1-T45、h#32A1-T46、h#32A1-T47、h#32A1-T48、h#32A1-T49、h#32A1-T50、h#32A1-T51、h#32A1-T52、h#32A1-T53、h#32A1-T54、h#32A1-T55、h#32A1-T56、h#32A1-T57、h#32A1-T58、h#32A1-T59、h#32A1-T60、h#32A1-T61、h#32A1-T62、h#32A1-T63、h#32A1-T64、h#32A1-T65、h#32A1-T66、h#32A1-T67、h#32A1-T68、h#32A1-T69、h#32A1-T70、h#32A1-T71、h#32A1-T72、h#32A1-T73、h#32A1-T74、h#32A1-T75、h#32A1-T76、h#32A1-T77、h#32A1-T78、h#32A1-T79、h#32A1-T80、h#32A1-T81、h#32A1-T82、h#32A1-T83、h#32A1-T84、h#32A1-T85、h#32A1-T86、h#32A1-T87、h#32A1-T88、h#32A1-T89、h#32A1-T90、h#32A1-T91、h#32A1-T92、h#32A1-T93、h#32A1-T94、h#32A1-T95、h#32A1-T96、h#32A1-T97、h#32A1-T98、h#32A1-T99、h#32A1-T100）を終濃度4、20、100、500 ng/mlとなるように添加して、CO₂インキュベーター中で5 日間培養した。培養上清10 μ lを採取し、Osteolysis Assay Kitに付属のFluorophore Releasing Reagentを200 μ l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、ユーロピウムによる蛍光測定に適した時 間分解蛍光測定（Time-resolved fluorescence）（Excitation: 340 nm, Emission: 615 nm）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48及び49）。その結果、RANKL添 加により増加した蛍光コラーゲン断片量が、ラット#32A1抗体やヒトキ メラ#32A1抗体添加により濃度依存的に抑制された。同様に、検討した 10種類全てのヒト化#32A1抗体によっても、濃度依存的な抑制が認め られた。このことから、ヒト破骨細胞の骨吸収活性が、Sieg-15 蛋白質と特異的に結合するヒト化#32A1抗体により抑制されることが明 らかとなった。

実施例 31

[0336] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒト化抗体の卵巣摘出ラットを用いた生物学的評価

実施例 2 4 及び 2 8 によって取得されたヒト化抗体の示す、卵巣摘出ラットにおける骨密度減少に対する抑制効果は、実施例 1 5 に記載の方法で評価することが可能である。

実施例 32

[0337] ラット抗マウス S i g l e c - 1 5 モノクローナル抗体 # 3 2 A 1 のヒト化抗体の T N F α 刺激によるマウス破骨細胞形成試験での生物活性評価

実施例 2 4 及び 2 8 によって取得されたヒト化抗体の示す T N F α 刺激によるマウス破骨細胞形成抑制効果は、実施例 2 6 に記載の方法で評価することが可能である。

実施例 33

[0338] 示差走査カロリメトリー (D S C) を用いたヒト化抗体の熱安定性測定

h # 3 2 A 1 - H 5 / L 5、h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 5、h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 5、h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 6 について、熱安定性の測定を行なった。これらのサンプルを 0. 5 m g / m l の濃度 (C B S 溶液) に調製し、4 0 0 μ l ずつ試料溶液として D S C 測定に使用した。D S C 測定条件は、以下のように設定した。即ち、初期温度は 2 0 °C、最終温度を 1 0 0 °C とし、昇温速度を 6 0 °C / 1 時間、フィルター時間 1 0 秒とした。参照液は C B S を使用した。D S C 測定装置としては、米国 M i c r o C a l 社製 V P - C a p i l l a r y D S C P l a t f o r m を使用した。試料溶液から得られたスキャン曲線からベースライン (試料セルにも参照溶液を充填して得られたスキャン曲線) を差し引いてベースライン補正を行なった。図 5 0 が h # 3 2 A 1 - H 5 / L 5 のサーモグラム、図 5 1 が h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 5 のサーモグラム、図 5 2 が h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 5 のサーモグラム、図 5 3 が h # 3 2 A 1 - H 1 - 1 / L 2 - 1 6 のサーモグラムを示す。それぞれのピークトップ値を F a b 領域の熱変性中点 T m とすると、h # 3 2 A 1 - H 5 / L 5 の T m 値が 8 1

. 2°C、h#32A1-H1-1/L5のT_m値が84.1°C、h#32A1-H1-1/L2-15のT_m値が80.0°C、h#32A1-1-1/L2-16(IgG2)のT_m値が77.9°C、であった。

産業上の利用可能性

[0339] 本発明のキメラ又はヒト化抗S i g l e c - 1 5抗体は破骨細胞の分化又は骨吸収活性の抑制能を有し、該抗S i g l e c - 1 5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。

受託番号

[0340] F E R M B P - 1 0 9 9 9

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号2に示されるアミノ酸配列の39乃至165番目のアミノ酸残基からなるポリペプチドに結合し、破骨細胞の形成及び／又は破骨細胞による骨吸収を抑制する抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項2] 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44に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号45又は配列番号97に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は、配列番号46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47に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号48に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は、配列番号49に示されるアミノ酸配列からなること；
を特徴とする請求項1に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項3] 配列番号41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43に示されるアミノ酸配列の21乃至132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2に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項4] Fab、F(ab')₂、Fab' 及びFvからなる群から選択される、請求項1乃至3のいずれか一つに記載の抗体の機能性断片。
- [請求項5] scFvであることを特徴とする、請求項1乃至3のいずれか一つに記載の抗体。
- [請求項6] キメラ抗体であることを特徴とする、請求項1乃至4のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項7] 配列番号41に示されるアミノ酸配列の20乃至470番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号43に示されるアミノ酸配列の21乃至237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 6 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項 8] ヒト化されていることを特徴とする、請求項 1 乃至 4 又は 6 のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項 9] 重鎖がヒト免疫グロブリン G 2 重鎖の定常領域を含み、軽鎖がヒト免疫グロブリン κ 軽鎖の定常領域を含む、請求項 7 又は 8 に記載の抗体。

[請求項 10] 破骨細胞の形成及び／又は破骨細胞による骨吸収を抑制する抗体又は該抗体の機能性断片であって、

(a) 以下のアミノ酸配列からなる群から選択される重鎖可変領域：

a 1) 配列番号 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 2) 配列番号 5 3 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 3) 配列番号 5 5 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 4) 配列番号 5 7 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 5) 配列番号 5 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 6) 配列番号 9 9 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 7) 配列番号 1 0 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

a 8) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の相同性を持つアミノ酸配列；

a 9) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を持つアミノ酸配列；

a 1 0) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのアミノ酸

配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；及び

(b) 以下のアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域：

b 1) 配列番号 6 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 2) 配列番号 6 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 3) 配列番号 6 5 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 4) 配列番号 6 7 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 2 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 5) 配列番号 6 9 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 6) 配列番号 7 1 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 7) 配列番号 1 0 3 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 8) 配列番号 1 0 5 に示されるアミノ酸配列の 2 1 乃至 1 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列；

b 9) b 1) 乃至 a 8) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の相同性を持つアミノ酸配列；

b 1 0) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を持つアミノ酸配列；

b 1 1) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列；

を含むことを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項11] 配列番号 5 1 に示されるアミノ酸配列の 2 0 乃至 1 4 0 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配列及び配列番号 61 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項12] 配列番号 53 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 63 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項13] 配列番号 55 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 65 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項14] 配列番号 55 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 67 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項15] 配列番号 57 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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号 69 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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

断片。

- [請求項16] 配列番号59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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号71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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項10に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項17] 配列番号99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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号69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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項10に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項18] 配列番号101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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号69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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項10に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項19] 配列番号99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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号103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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項10に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項20] 配列番号99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アミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖配列及び配列番号105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アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項21] 配列番号 51 に示されるアミノ酸配列の 20 乃至 470 番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号 61 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項22] 配列番号 53 に示されるアミノ酸配列の 20 乃至 470 番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号 63 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項23] 配列番号 55 に示されるアミノ酸配列の 20 乃至 470 番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号 65 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項24] 配列番号 55 のアミノ酸配列に示される 20 乃至 470 番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号 67 に示されるアミノ酸配列の 21 乃至 237 番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項25] 配列番号 57 に示されるアミノ酸配列の 20 乃至 470 番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号 69 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項26] 配列番号 59 に示されるアミノ酸配列の 20 乃至 470 番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列及び配列番号 71 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項27] 配列番号 99 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 69 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項28] 配列番号 101 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 69 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項29] 配列番号 99 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 103 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項30] 配列番号 99 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 105 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を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項31] 請求項 1 乃至 30 に記載の抗体又は該抗体の機能性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32] 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 31 に記載の医薬組成物。

[請求項33] 請求項 1 乃至 30 に記載の抗体又は該抗体の機能性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 D₃、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 K₂ (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 TNF α 抗体又は該抗体の機能性断片、抗 PTHrP (parathyroid hormone-related protein)

抗体又は該抗体の機能性断片、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機能性断片、抗RANKL抗体又は該抗体の機能性断片、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34] 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জেット病、腎性骨異常栄養症、及び骨形成不全症からなる群から選択される、請求項32又は33に記載の医薬組成物。

[請求項35] 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34に記載の医薬組成物。

[請求項36] 骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、請求項35に記載の医薬組成物。

[請求項37] 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36に記載の医薬組成物。

[請求項38] 請求項1乃至30に記載の抗体又は該抗体の機能性断片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39] 請求項1乃至30に記載の抗体又は該抗体の機能性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D₃、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K₂（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TNF α 抗体又は該抗体の機能性断片、抗PTHrP（parathyroid hormone-related protein）抗体又は該抗体の機能性断片、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機能性断片、抗RANKL抗体又は該抗体の機能性断片、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。

- [請求項40] 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38又は39に記載の治療及び／又は予防方法。
- [請求項41] 骨代謝異常が、骨粗鬆症であることを特徴とする、請求項40に記載の治療及び／又は予防方法。
- [請求項42] 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41に記載の治療及び／又は予防方法。
- [請求項43] 請求項3、7又は10乃至30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44] 請求項43に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号40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及び配列番号42に示されるヌクレオチド配列の61乃至396番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。
- [請求項45] 配列番号40に示されるヌクレオチド配列の58乃至1410番目の

ヌクレオチドからなるヌクレオチド配列及び配列番号 4 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 7 1 1 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 4 4 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項46]

請求項 4 3 に記載のポリヌクレオチドであって、

(a) 以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

a 1) 配列番号 5 0 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 2) 配列番号 5 2 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 3) 配列番号 5 4 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 4) 配列番号 5 6 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 5) 配列番号 5 8 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 6) 配列番号 9 8 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 7) 配列番号 1 0 0 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

a 8) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つの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するポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

a 9) a 1) 乃至 a 7) から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；及び

(b) 以下のヌクレオチド配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド：

b 1) 配列番号 6 0 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 2) 配列番号 6 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 3) 配列番号 6 4 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 4) 配列番号 6 6 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 6 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 5) 配列番号 6 8 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 6) 配列番号 7 0 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 7) 配列番号 1 0 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 8) 配列番号 1 0 4 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列；

b 9) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つの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するポリヌクレオチドが保有するヌクレオチド配列；

b 1 0) b 1) 乃至 b 8) から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列に 1 乃至数個のヌクレオチドが置換、欠失又は付加されたヌクレオチド配列；

を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

[請求項47]

配列番号 5 0 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 60 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 48] 配列番号 52 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 62 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 49] 配列番号 54 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 64 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 50] 配列番号 54 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 66 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 51] 配列番号 56 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 68 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項 52] 配列番号 58 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 70 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

- [請求項53] 配列番号 9 8 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 6 8 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 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 4 6 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項54] 配列番号 1 0 0 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 6 8 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 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 4 6 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項55] 配列番号 9 8 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 1 0 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 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 4 6 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項56] 配列番号 9 8 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 4 2 0 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 1 0 4 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 3 9 9 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 4 6 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項57] 配列番号 5 0 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 1 4 1 0 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 6 0 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 7 1 4 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 4 6 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項58] 配列番号 5 2 に示されるヌクレオチド配列の 5 8 乃至 1 4 1 0 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 6 2 に示されるヌクレオチド配列の 6 1 乃至 7 1 4 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項59] 配列番号 54 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 64 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項60] 配列番号 54 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 66 に示されるヌクレオチド配列の 61 乃至 711 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項61] 配列番号 56 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 68 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項62] 配列番号 58 に示されるヌクレオチド配列の 58 乃至 1410 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 70 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項63] 配列番号 98 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 68 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項64] 配列番号 100 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 68 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項65] 配列番号 98 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 102 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項66] 配列番号 98 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 104 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 46 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項67] 請求項 43 乃至 66 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68] 請求項 43 乃至 66 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69] 請求項 67 に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

[請求項70] 請求項 68 又は 69 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 3、7 又は 10 乃至 30 に記載の抗体の生産方法。