

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7246306号

(P7246306)

(45)発行日 令和5年3月27日(2023.3.27)

(24)登録日 令和5年3月16日(2023.3.16)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/24 (2006.01)

C 0 7 K 16/24

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

A 6 1 P 19/10 (2006.01)

A 6 1 P 19/10

請求項の数 4 (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-516460(P2019-516460)

(86)(22)出願日 平成29年10月20日(2017.10.20)

(65)公表番号 特表2020-500836(P2020-500836
A)

(43)公表日 令和2年1月16日(2020.1.16)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/057543

(87)国際公開番号 WO2018/080914

(87)国際公開日 平成30年5月3日(2018.5.3)

審査請求日 平成31年3月26日(2019.3.26)

審判番号 不服2021-18073(P2021-18073/J
1)

審判請求日 令和3年12月27日(2021.12.27)

(31)優先権主張番号 62/414,217

(32)優先日 平成28年10月28日(2016.10.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 594197872

イーライ リリー アンド カンパニー
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
8 5 インディアナポリス リリー コー
ポレイト センター (番地なし)

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 アンドリュー・アイホー・コリトコ

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 イ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗RANKL抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

軽鎖可変領域(LCVR)および重鎖可変領域(HCVR)を含む、ヒトRANKLに結合する抗体であって、前記LCVRが相補性決定領域(CDR)LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含み、前記HCVRがCDRHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含み、前記LCDR1のアミノ酸配列が配列番号12であり、前記LCDR2のアミノ酸配列が配列番号13であり、前記LCDR3のアミノ酸配列が配列番号14であり、前記HCDR1のアミノ酸配列が配列番号9であり、前記HCDR2のアミノ酸配列が配列番号10であり、前記HCDR3のアミノ酸配列が配列番号11であり、および、配列番号11で示されるアミノ酸配列の6位のXaaがAlaであり、配列番号11で示されるアミノ酸配列の14位のXaaがProであり、配列番号14で示されるアミノ酸配列の4位のXaaがTrpである、抗体。

【請求項2】

前記LCVRのアミノ酸配列が配列番号4であり、前記HCVRのアミノ酸配列が配列番号3である、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

軽鎖(LC)および重鎖(HC)を含み、前記LCのアミノ酸配列が配列番号2であり、前記HCのアミノ酸配列が配列番号1である、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体および1つ以上の薬学的に許容される担体、

希釈剤、または賦形剤を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医学の分野に属する。より具体的には、本発明は、核因子κBリガンドの受容体活性化因子（RANKL）に対する抗体を含む抗体およびその医薬組成物に関する。本発明の抗体は、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）などの骨関連障害、ならびに非小細胞肺癌および多発性骨髄腫などの癌によって引き起こされる骨格異常の治療に有用であることが期待される。

【0002】

骨関連障害に何百万人もの個人が冒され、該障害は疼痛を伴う衰弱性の症状をしばしば引き起こす。骨粗鬆症は、一般的な代謝性骨関連障害であり、骨芽細胞骨形成に対する過剰な破骨細胞骨吸収から少なくとも一部生じる進行性の骨量喪失を特徴とする。骨粗鬆症に関連する骨量喪失により、骨折の危険性がより高まる。骨粗鬆症関連の骨量喪失の長期にわたる結果は、骨折、慢性疼痛、身体障害、および／または不動状態を含む重篤な身体的結果をもたらし得るとともに、骨格による充分な体の構造支持ができなくなり得る。

【0003】

RANKLは、タンパク質のTNFスーパーファミリーのメンバーであり、骨リモデリングにおいて重要な役割を果たす。RANKLは、骨芽細胞によって発現され、破骨細胞および破骨細胞前駆細胞の表面上にある同族（cognate）受容体RANKに結合する。RANKへのRANKLの結合は、成熟破骨細胞の形成、活性化、及び生存、ならびに細胞内シグナル伝達カスケードの刺激を誘導して、骨吸収の増加を引き起こす。RANKLに対する中和抗体は、当該技術分野で既知である。例えば、米国特許第6,740,522号は、唯一の認可された抗RANKL治療抗体であるProlia（登録商標）およびXgeva（登録商標）（それぞれ、閉経後の女性および骨折の危険性が高い男性における骨粗鬆症の治療、ならびに固体腫瘍からの骨転移を有する患者における骨格関連事象の予防のために認可された）という名称で市販されているデノスマブを含む、抗RANKL抗体を開示している。

【0004】

骨粗鬆症関連の骨折は、医療制度にとって主要な健康懸念および経済的負担となる。国際骨粗鬆症財団（National Osteoporosis Foundation）によると、990万人のアメリカ人が骨粗鬆症を有し、さらに4,310万人が低骨密度に悩まされている。毎年、200万件超の骨折および40万件超の入院が骨粗鬆症に起因している。米国公衆衛生局長官は、骨粗鬆症関連の骨折により毎年120～180億ドルの直接医療費が生ずると推定している。

【0005】

現在の療法は、骨吸収抑制または同化性（anabolic）化合物などの他の薬剤との共投与または共製剤化（co-formulation）には適していない。さらに、マウスモデルなどのインビボ前臨床モデルで研究するのに有用な抗RANKL抗体が不足している。したがって、患者により良い転帰をもたらす得る、骨関連障害または癌によって引き起こされる骨格異常のための代替療法が依然として必要である。そのような代替療法は、好ましくは、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）などの骨関連障害の治療、ならびに非小細胞肺癌および多発性骨髄腫などの癌によって引き起こされる骨格異常の治療において有効性を示すことができるであろう。本発明の抗体は、上記の必要性のうちの少なくとも1つを満たすことが期待される代替療法を提供する。

【0006】

本発明は、ヒトRANKLに結合する抗体であって、該抗体は軽鎖可変領域（LCVR）および重鎖可変領域（HCVR）を含み、該LCVRは相補性決定領域（CDR）LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含み、該HCVRはCDR HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含み、該LCDR1のアミノ酸配列が配列番号12であり、

10

20

30

40

50

該LCDR2のアミノ酸配列が配列番号13であり、該LCDR3のアミノ酸配列が配列番号14であり、該HCDR1のアミノ酸配列が配列番号9であり、該HCDR2のアミノ酸配列が配列番号10であり、該HCDR3のアミノ酸配列が配列番号11である、抗体を提供する。いくつかの特定の実施形態において、配列番号11で示されるアミノ酸配列の6位のXaaはAlaであり、配列番号11で示されるアミノ酸配列の14位のXaaはProであり、配列番号14で示されるアミノ酸配列の4位のXaaはTrpである。他の特定の実施形態において、配列番号11で示されるアミノ酸配列の6位のXaaはArgであり、配列番号11で示されるアミノ酸配列の14位のXaaはTyrであり、配列番号14で表されるアミノ酸配列の4位のXaaはAsnである。

【0007】

いくつかの特定の実施形態において、本発明は、LCVRが配列番号4または配列番号8で示されるアミノ酸配列を有し、HCDRが配列番号3または配列番号7で示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。いくつかの特定の実施形態において、LCVRは配列番号4で示されるアミノ酸配列を有し、HCDRは配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する。他の特定の実施形態において、LCVRは配列番号8で示されるアミノ酸配列を有し、HCDRは配列番号7で示されるアミノ酸配列を有する。

【0008】

いくつかの特定の実施形態において、本発明は、LCが配列番号2または配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する抗体を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、HCが配列番号1または配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する抗体を提供する。いくつかのそのような実施形態において、LCは配列番号2で示されるアミノ酸配列を有し、HCは配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する。いくつかのそのような実施形態において、LCは配列番号6で示されるアミノ酸配列を有し、HCは配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する。

【0009】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体はヒトRANKLに結合する。他のそのような実施形態において、本発明の抗体はマウスRANKLに結合する。他のそのような実施形態において、本発明の抗体はヒトRANKLおよびマウスRANKLに結合する。

【0010】

本発明はまた、本発明の抗体をコードする核酸分子および発現ベクターに関する。一実施形態において、本発明は、HCをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子であって、HCのアミノ酸配列が配列番号1である、DNA分子を提供する。いくつかのそのような実施形態によれば、該DNA分子は配列番号15で示されるポリヌクレオチド配列を有する。

【0011】

一実施形態において、本発明はまた、LCをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子であって、LCのアミノ酸配列が配列番号2である、DNA分子を提供する。いくつかのそのような実施形態によれば、該DNA分子は配列番号16で示されるポリヌクレオチド配列を有する。

【0012】

さらなる実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有するHCをコードするポリヌクレオチド配列を含み、配列番号2のアミノ酸配列を有するLCをコードするポリヌクレオチド配列を含む、DNA分子を提供する。特定の実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列を有するHCをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号15で示され、配列番号2のアミノ酸配列を有するLCをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号16で示される。

【0013】

本発明はまた、DNA分子で形質転換された哺乳動物細胞であって、該細胞は本発明のHCおよびLCを含む抗体を発現することができ、HCは配列番号1で示されるアミノ酸配列を有し、LCは配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する、哺乳動物細胞を提供す

10

20

30

40

50

る。本発明はまた、H CおよびL Cを含む抗体の作製方法であって、本発明の抗体が発現される条件下で哺乳動物細胞を培養することを含む方法を提供する。本発明はまた、該方法によって作製される抗体を提供する。本発明はまた、D N A分子で形質転換された哺乳動物細胞であって、該細胞は本発明の2つのH Cおよび2つのL Cを含む抗体を発現することができ、各H Cは配列番号1で示されるアミノ酸配列を有し、各L Cは配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する、哺乳動物細胞を提供する。本発明はまた、2つのH Cおよび2つのL Cを含む抗体の作製方法であって、本発明の抗体が発現されるような条件下で哺乳動物細胞を培養することを含む方法を提供する。本発明はまた、該方法によって作製される抗体を提供する。

【0014】

本発明はまた、本発明の抗体、および1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は骨関連障害の治療に使用することができ、かかる治療は、それを必要とする患者に治療有効量の本発明の医薬組成物を投与することを含む。いくつかのそのような実施形態において、骨関連障害は、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）のうちの1つ以上である。他のそのような実施形態において、本発明の医薬組成物は癌によって引き起こされる骨格異常の治療に使用することができ、かかる治療は、それを必要とする患者に治療有効量の本発明の医薬組成物を投与することを含む。特定の実施形態において、癌は、非小細胞肺癌および多発性骨髄腫のうちの1つ以上である。

【0015】

本発明はまた、骨関連障害または癌によって引き起こされる骨格異常の治療方法であって、それを必要とする患者に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む方法を提供する。いくつかのそのような実施形態において、骨関連障害は骨粗鬆症である。いくつかのそのような実施形態において、骨関連障害は骨減少症である。いくつかのそのような実施形態において、骨関連障害は関節炎である。より特定の実施形態において、骨関連障害は関節リウマチである。他のそのような実施形態において、骨関連障害は、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）のうちの1つ以上である。本発明はまた、非小細胞肺癌によって引き起こされる骨格異常および多発性骨髄腫によって引き起こされる骨格異常のうちの1つ以上の治療方法を提供する。

【0016】

本発明はまた、療法で使用するための、本発明の抗体またはその医薬組成物を提供する。より具体的には、本発明は、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）のうちの1つ以上の治療に使用するための、本発明の抗体またはその医薬組成物を提供する。本発明はまた、非小細胞肺癌によって引き起こされる骨格異常および多発性骨髄腫によって引き起こされる骨格異常のうちの1つ以上の治療において使用するための、本発明の抗体またはその医薬組成物を提供する。

【0017】

本発明はまた、骨関連障害または癌によって引き起こされる骨格異常の治療のための医薬の製造における、本発明の抗体またはその医薬組成物の使用を提供する。いくつかの特定の実施形態によれば、本発明は、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）のうちの少なくとも1つ以上の治療のための医薬の製造における、本発明の抗体またはその医薬組成物を提供する。本発明はまた、非小細胞肺癌によって引き起こされる骨格異常および多発性骨髄腫によって引き起こされる骨格異常のうちの1つ以上の治療のための医薬の製造における、本発明の抗体またはその医薬組成物を提供する。

【0018】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号17の残基89～97のうちの1つ以上および残基125～132のうちの1つ以上でヒトRANKLに結合する。別の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトRANKL上のエピトープに結合し、該エピトープは、配列番号17の残基89～97のうちの少なくとも1つのアミノ酸および残基125～132のうちの少なくとも1つのアミノ酸を含む。さらなる実施形態において、エピトー

10

20

30

40

50

プは、配列番号17の残基89～97のうちの少なくとも2つのアミノ酸および残基125～132のうちの少なくとも2つのアミノ酸を含む。別のさらなる実施形態において、エピトープは、配列番号17の残基89～97のうちの少なくとも3つのアミノ酸および残基125～132のうちの少なくとも3つのアミノ酸を含む。別のさらなる実施形態において、エピトープは、配列番号17の残基89～97のうちの少なくとも4つのアミノ酸および125～132の範囲内の少なくとも4つのアミノ酸を含む。他のさらなる実施形態において、エピトープは、配列番号17の残基89～97のうちの少なくとも5つのアミノ酸および残基125～132のうちの少なくとも5つのアミノ酸を含む。

【0019】

一実施形態において、本発明は、LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む抗体とヒトRANKLへの結合について競合することができる抗体であって、LCDR1のアミノ酸配列は配列番号12であり、LCDR2のアミノ酸配列は配列番号13であり、LCDR3のアミノ酸配列は配列番号14であり、HCDR1のアミノ酸配列は配列番号9であり、HCDR2のアミノ酸配列は配列番号10であり、HCDR3のアミノ酸配列は配列番号11である、抗体を提供する。より特定の実施形態において、配列番号11で示されるアミノ酸配列の6位のXaaはAlaであり、配列番号11で示されるアミノ酸配列の14位のXaaはProであり、配列番号14で示されるアミノ酸配列の4位のXaaはTrpである。別のより特定の実施形態において、配列番号11で示されるアミノ酸配列の6位のXaaはArgであり、配列番号11で示されるアミノ酸配列の14位のXaaはTyrであり、配列番号14で示されるアミノ酸配列の4位のXaaはAsnである。

【0020】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、ヒト、ヒト化、マウス、またはマウスラットのキメラであってもよい。抗体は、ジスルフィド結合によって相互連結された2つのHCおよび2つのLCを含む免疫グロブリン分子である。各HCおよびLCのアミノ末端部分は、可変領域中に含まれるCDRを介して抗原認識を主に担う、約100～120個のアミノ酸の可変領域を含む。CDRは、フレームワーク領域（「FR」）と呼ばれる、より保存された領域とともに点在している。各LCVRおよびHCVRは、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される。LCの3つのCDRは「LCDR1、LCDR2、およびLCDR3」と称し、HCの3つのCDRは「HCDR1、HCDR2、およびHCDR3」と称する。CDRは、抗原と特異的相互作用を形成する残基のほとんどを含む。特定の抗原に結合する抗体の機能的能力は、6つのCDRによって大きく影響される。本発明の抗体のLCVRおよびHCVR領域内のCDRドメインへのアミノ酸の割当ては、周知のKabat番号付け則（Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)）、およびNorth番号付け則（North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)）に基づく。本発明の抗体のCDRは表1に従って定義される。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 本発明の抗体の CDR を定義するために使用される CDR 番号付け則

CDR	以下によって定義される開始アミノ酸残基：	以下によって定義される終了アミノ酸残基：
HCDR 1	N o r t h	K a b a t
HCDR 2	K a b a t	K a b a t
HCDR 3	N o r t h	K a b a t
LCDR 1	K a b a t	K a b a t
LCDR 2	N o r t h	K a b a t
LCDR 3	K a b a t	K a b a t

10

【0021】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体（「mAb」）である。本発明の mAb は、2つの HC および 2つの LC を含有する完全 mAb である。本明細書で言及する場合、mAb は、例えば任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一コピーまたはクローン由来の抗体であり、それが作製される方法ではない。モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術、例えば、CDR グラフティング、または当該技術分野で既知のそのようなもしくは他の技術の組み合わせによって作製することができる。抗体の作製および精製方法は当技術分野で周知であり、例えば Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N. Y., chapters 5-8 and 15, ISBN 0-87969-314-2 に見出すことができる。

20

【0022】

本発明のモノクローナル抗体は、既知の方法を用いて調製および精製することができる。例えば、HC（例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列）および LC（例えば、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列）をコードする cDNA 配列をクローン化して、GS（グルタミンシンセターゼ）発現ベクター中に操作することができる。次いで、操作された免疫グロブリン発現ベクターを、CHO 細胞に安定してトランスフェクトすることができる。当業者が理解するように、抗体の哺乳動物発現により、典型的には Fc 領域中の高度に保存された N-グリコシル化部位で、グリコシル化がもたらされるであろう。安定したクローンを、RANKL に特異的に結合する抗体の発現について検証することができる。陽性クローンは、バイオリアクター中での抗体産生のために無血清培地で増殖させることができる。抗体が分泌された培地は、従来の技術によって精製することができる。例えば、培地をリン酸緩衝生理食塩水などの適合する緩衝液で平衡化したプロテイン A または G Sepharose FF カラムに好都合に適用にすることができる。カラムを洗浄して、非特異的結合成分を除去する。結合した抗体は例えば pH 勾配により溶出され、抗体分画は SDS-PAGE などによって検出され、その後プールされる。抗体は、一般的な技術を用いて濃縮および／または滅菌濾過することができる。可溶性凝集体および多量体は、サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む、一般的な技術によって効率的に除去することができる。生成物は、例えば -70℃ で直ちに凍結させてもよく、または凍結乾燥させてもよい。

30

40

【0023】

本発明のモノクローナル抗体は患者の治療に使用することができる。より具体的には、本発明の抗体は、骨粗鬆症、骨減少症、および関節炎（関節リウマチなど）などの骨関連障害、ならびに非小細胞肺癌および多発性骨髄腫などの癌によって引き起こされる骨格異

50

常を治療することが期待される。本明細書で互換的に使用される「治療 (treatment)」および／もしくは「治療すること (treating)」ならびに／または「治療する (treat)」は、本明細書に記載される障害の進行の遅延、妨害、抑止、制御、停止、または反転があり得る全ての方法を指すことを意図するが、全ての障害症状の完全な消失を必ずしも示さない。治療は、RANKL 活性の低下から利益を受ける、ヒトの疾患または状態の治療のための本発明の抗体の投与を含み、(a) 疾患の更なる進行を阻害すること、および (b) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患もしくは障害の退行を引き起こすか、またはその症状もしくは合併症を緩和することを含む。

【0024】

本明細書で使用する場合、「患者」という用語はヒトを指す。ある特定の実施形態において、患者は、RANKL 活性の低下から利益を受ける疾患、障害、または状態（例えば、骨関連障害）を有することをさらに特徴とする。

【0025】

本明細書で使用される場合、RANKL に「結合する (bind)」(または「結合する (binds)」) という用語は、抗体とヒト RANKL のエピトープとの相互作用を指す。好ましくは、「結合する」とは、水素重水素交換によって決定される本発明の抗体とエピトープとの相互作用を指す（例えば、実施例 4 を参照のこと）。好ましくは、エピトープはヒト RANKL の立体構造的 (conformational) エピトープである。一実施形態において、RANKL に「結合する (bind)」(または「結合する (binds)」) という用語は、ヒト RANKL の立体構造的エピトープとの相互作用を指し、該エピトープは、配列番号 17 の残基 89～97 のうちの 1 つ以上および残基 125～132 のうちの 1 つ以上である。別の実施形態において、エピトープは、配列番号 17 の残基 89～97 のうちの少なくとも 2 つのアミノ酸および残基 125～132 のうちの少なくとも 2 つのアミノ酸である。別の実施形態において、エピトープは、配列番号 17 の残基 89～97 のうちの少なくとも 3 つのアミノ酸および残基 125～132 のうちの少なくとも 3 つのアミノ酸である。別の実施形態において、エピトープは、配列番号 17 の残基 89～97 のうちの少なくとも 4 つのアミノ酸および 125～132 の範囲内の少なくとも 4 つのアミノ酸である。別の実施形態において、立体構造的エピトープは、配列番号 17 の残基 89～97 のうちの少なくとも 5 つのアミノ酸および残基 125～132 のうちの少なくとも 5 つのアミノ酸である。

【0026】

本明細書で使用される「エピトープ」という用語は、本発明のモノクローナル抗体によって認識される抗原の個別の (discrete) 三次元部位を指す。エピトープは、水素重水素交換、アラニンスクランニング、または X 線結晶学などの当技術分野において現在既知である方法によって決定することができる。本明細書で使用される場合、「競合する (competing)」または「競合 (competition)」は、本発明の抗体のうちのいずれか 1 つがヒト RANKL に結合するのを阻害または阻止することができる抗体を指す。例えば、別の抗体の存在下で本発明の抗体のうちのいずれか 1 つによるヒト RANKL への結合の減少または完全な喪失がある場合、該抗体は結合を阻害または阻止することができる。

【0027】

本発明のモノクローナル抗体は、当該技術分野で周知の方法によって調製することができる、本発明のモノクローナル抗体ならびに 1 つ以上の薬学的に許容される担体および／または希釈剤を含む、医薬組成物に組み込むことができる。

【0028】

本発明のモノクローナル抗体を含む医薬組成物は、本明細書に記載される疾患もしくは障害の危険性があるまたは該疾患もしくは障害を示す患者に非経口経路（例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、または経皮）によって投与することができる。本発明の医薬組成物は、本明細書中で互換的に使用される「有効」または「治療有効」量の、本発明のモノクローナル抗体を含む。有効量とは、所望の治療結果を達成するための（投与量および

10

20

30

40

50

投与期間、ならびに投与手段での) 必要な量を指す。モノクローナル抗体の有効量は、個人の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個人における所望の応答を誘発する抗体の能力などの要因に応じて変動し得る。有効量はまた、本発明のモノクローナル抗体の任意の毒性または有害効果よりも、治療上有益な効果が上回る量である。

【実施例】

【0029】

実施例1：抗体の発現および精製

本発明の例示的な抗体は、本質的に以下のように発現および精製される。配列番号15 (配列番号1の例示的な重鎖をコードする) および配列番号16 (配列番号2の例示的な軽鎖をコードする) で示されるポリヌクレオチド配列を含有するグルタミン合成酵素 (GS) 発現ベクターを使用して、エレクトロポレーションにより、チャイニーズハムスター細胞株 (CHO、GSノックアウト) にトランスフェクトする。発現ベクターは、SV Early (シミアンウイルス (Simian Virus) 40E) プロモーターおよびGS遺伝子をコードする。GSの発現は、CHO細胞によって必要とされるアミノ酸であるグルタミンの生化学的合成を可能にする。トランスフェクション後、細胞について50 μ M L-メチオニンスルホキシミン (MSX) を用いてバルク選択を行う。MSXによるGSの阻害を用いて、選択のストリンジェンシーを高める。発現ベクターcDNAが宿主細胞ゲノムの転写活性領域に組み込まれた細胞を、CHO野生型細胞に対して選択することができる。トランスフェクトされたプールを低密度でプレATINGして、安定した発現細胞のクローンに近い成長 (close-to-clonal outgrowth) を可能にする。マスターウェルを抗体発現についてスクリーニングし、次いで無血清懸濁培地中でスケールアップして、産生に使用する。

【0030】

例示的な抗体が分泌された清澄化培地を、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) などの適合する緩衝液で平衡化されたプロテインAアフィニティーカラムに適用する。カラムを洗浄して、非特異的結合成分を除去する。結合した抗体を例えばpH勾配によって溶出し、例えばpH8のトリス緩衝液で中和する。抗体画分をSDS-PAGEまたは分析的サイズ排除などによって検出し、次いでプールする。可溶性凝集体および多量体は、サイズ排除、疎水性相互作用、Captoマルチモーダルクロマトグラフィー、イオン交換、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む、一般的な技術によって効率的に除去することができる。抗体を一般的な技術を用いて濃縮および/または滅菌濾過する。これらのクロマトグラフィー工程後の例示的な抗体の純度は98%より高い (モノマー)。抗体は、-70°Cで直ちに凍結してもよく、または4°Cで数ヶ月間保存してもよい。

【0031】

実施例2：結合親和性

BIAcore (登録商標) 2000機器を用いて、結合親和性を測定する。すべての測定を25°Cで行う。2 μ g/mLの実施例1の例示的な抗体をHBS-E緩衝液 (150mM塩化ナトリウム、3mM EDTA、0.005% (w/v) 界面活性剤P-20、および10mM HEPES、pH 7.4) に溶解する。プロテインAを、アミン結合キットを用いて、500応答単位 (Rus) のレベルでCM4センサーチップのフローセル1~4に固定化する。

【0032】

複数の分析サイクルを用いて結合を評価する。各サイクルを20 μ L/分の流量で行う。約100~200 Rusの捕捉を目的として、約10 μ Lの実施例1の例示的な抗体を2 μ g/mLの濃度で注射する。250 μ LのヒトRANKL (5 nMで開始し、各サイクルについて2倍連続希釈を用いる) を注入し、解離のために10分間とり、10 μ LのpH 1.5の10mM塩酸グリシンを再生に使用する。各サイクルの会合および解離速度を、BIAevaluationソフトウェアの「物質移動を伴う1:1 (1:1 with mass transfer)」結合モデルを用いて評価する。

【0033】

10

20

30

40

50

実施例1の例示的な抗体の操作の際に、HCDR3の最後の位置から3番目のロイシン（例えば、配列番号11で示されるHCDR3の残基12）の存在は、本発明の抗体のヒトRANKLに対する操作された親和性の向上を与えるために必須であると同定された。例えば、定方向突然変異（directed mutation）分析では、ロイシンがHCDR3の最後の位置から3番目に存在しなかった（例えば、イソロイシンがロイシンに置換された）場合、本発明の抗体に対するさらなるアミノ酸変化はRANKLに対する親和性を増加させることができなかった。

【0034】

本質的に上記の手順に従い、抗体は、2.82 pMの K_D でヒトRANKLに結合し、34.43 pMの K_D でラットRANKLに結合し、6.64 pMの K_D でマウスRANKLに結合する。これらのデータは、実施例1の例示的な抗体が、10 pM未満の K_D の、ヒトおよびマウスのRANKLに対する高い親和性結合を有することを実証している。

【0035】

実施例3：インビトロでのRANKL誘導性NF- κ B駆動型ルシフェラーゼ活性の中和
ヒトRANKおよびNF- κ B駆動型ルシフェラーゼレポーターを安定して共発現するHEK293細胞を使用して、実施例1の例示的な抗体がRANKL活性を中和する能力を評価する。このHEK293細胞モデルにおいて、RANKは、ヒトRANKLによって結合されたときにNF- κ Bシグナル伝達を誘導し、これによりルシフェラーゼ発光がもたらされる。実施例1の例示的な抗体によるRANKへのRANKL結合の中和は、ルシフェラーゼ発光の低下によって測定される。

【0036】

HEK293細胞を、700 μ g/mL Geneticinの選択圧下で日常的に行うように培養する。25,000細胞/ウェルを、アッセイ培地（0.5% FBS、20 nM Hepes、1 $\times$ GlutaMax、および1 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシンを含有する50 μ LのDMEM/F12（1:3）培地）中、96ウェル組織培養プレートのウェルに加える。細胞を37°Cで（5% CO₂および95%湿度で）一晩インキュベートする。

【0037】

1 nMおよび10 nMの濃度のヒトRANKLを含むアッセイ培地を用いて、実施例1の例示的な抗体について10 nM~0.005 nM（1:3連続希釈）の用量範囲を調製し、該用量を室温で15分間インキュベートする。アッセイ培地は、「培地のみ」対照用に使用される。その後、50 μ Lの抗体を培養細胞を含有する50 μ Lの培地に添加し、37°Cで一晩インキュベートする。

【0038】

一晩インキュベーションした後、既存の成長培地を除去し、1 Lの1% Triton X-100溶解緩衝液（30 mLのTriton X-100、3 mLのMgCl₂、108.15 mLの1M Trizma HCl、41.85 mLの1M Trizma Base、および817 mLのH₂O）中の50 μ LのBug Lite（2.296 g DTT（Sigma）、1.152 gのコエンザイムA、および0.248 gのATP）に細胞を懸濁する。次いで、細胞をプレートシェーカーで5~10分間、穏やかに攪拌しながら溶解させる。細胞溶解後、発光をプレートリーダー（Envisionプレートリーダー）上で測定する。全ての処置群についてのIC₅₀値を、GraphPad Prism 6による3パラメータロジスティック回帰モデルを用いて算出する。

【0039】

本質的に上記の手順に従い、ヒトRANKLに結合する抗体のIC₅₀は0.069 nMであった。この結果は、実施例1の抗体の例示的な抗体が、ヒトRANKL誘導性NF- κ B駆動型ルシフェラーゼ発光を中和することを実証している。培地対照は、試験したいずれの濃度でも、HEK293細胞モデルにおいてヒトRANKL誘導性NF- κ B駆動型ルシフェラーゼ発光を中和しなかった。

【0040】

10

20

30

40

50

実施例 4：水素重水素交換によるエピトープマッピング

実施例 1 の例示的な抗体が RANKL タンパク質に結合する場所を決定するために、水素重水素交換質量分析 (Hydrogen deuterium exchange with mass spectrometry) (HDXMS) を行う。この方法を用いて、いくつかの抗体のエピトープをマッピングすることに成功している (Obungu et. al. 2009 Biochemistry, 48:7251-60 Lu et. al. 2005 Biochemistry 44:11106-14)。

【0041】

10 μ g のヒト RANKL 溶液を 10 μ g の実施例 1 の例示的な抗体と混合し、次いで 1 $\times$ PBS で希釈することにより、RANKL / 抗体複合体を作製した。タンパク質表面標識研究のための複合体を酢酸ヒドロキシスクシンイミドエステルで標識し、4 μ L の RANKL / 抗体複合体を 16 μ L の 100% D₂O (交換中 80% D) と混合し、混合物を周囲温度で 60 秒間保持することにより、HDXMS 分析を行う。交換を 0°C で 50 μ L の 0.1 N HCl を用いてクエンチし、直ちに 2 μ L の 2 mg/mL ペプシン溶液で 0°C で 3.5 分間処理し、次いで手動で RP-HPLC カラムに注入する。その後、Waters Acquity UPLC と組み合わせた Waters SYNAPT 質量分析により、消化物溶液について LC/MS/MS 分析を行う。

【0042】

20 本質的に上記の手順に従い、2 つのヒト RANKL ペプチド 239 ~ 272 および 281 ~ 290 は有意な負のデルタを示した。この分析により、実施例 1 の例示的な抗体の RANKL エピトープが立体構造的であり、配列番号 17 のアミノ酸 89 ~ 97 および 125 ~ 132 であることが実証された。最初の領域 (89 ~ 97) は、ヒトおよびげっ歯類の RANKL で同一である。他の領域 (125 ~ 132) は、げっ歯類 RANKL ではセリンがアラニンで置換されている 129 位の単一アミノ酸の違いを除き、ヒトおよびげっ歯類 RANKL の両方で同一である。

【0043】

実施例 5：インタクトな (intact) 雌マウスモデルを用いて、インビボでの骨量密度に対する効果を評価する。

30 20 ~ 22 週齢のインタクトな C57/B6 雌マウス (Charles River) を、12 時間の明/暗サイクルで、22°C で食餌 (0.72% Ca および 0.61% P、ビタミン D 0.99 IU/g を含む TD 2014、Teklad、Madison、WI) および水に自由にアクセスできるようにして維持する。

【0044】

マウスを、10 mg/kg の実施例 1 の例示的な抗体 (n = 6 動物) または PBS ビヒクル対照を毎週皮下注射した処置動物に分ける。4 週間目にマウスを犠牲死させる。遠位および中位大腿骨の骨量密度 (BMD) を、Aloka Latheta LTC-100 モデル CT 走査装置を使用する定量的コンピュータ断層撮影法 (qCT) によって監視する。

【0045】

40 本質的に上記の手順に従い、抗体で処置した動物では、対照動物と比較して、遠位大腿骨 BMD が 23% 増加し、中位大腿骨 BMD が 4% 増加した。これらの結果は、実施例 1 の例示的な抗体を毎週投与した動物では遠位大腿骨および中位大腿骨の両方における BMD が増加したことを実証している。

【0046】

実施例 6：卵巣摘出したマウスモデルにおけるインビボ有効性分析

50 卵巣摘出したマウスモデルを用いて、インビボでの骨量密度に対する効果を評価する。20 週齢の雌 C57/B6 マウス (Harlan、Indianapolis、IN) を卵巣摘出し (または偽手術した対照群)、12 時間の明/暗サイクルで、22°C で食餌 (0.72% Ca および 0.61% P、ビタミン D 0.99 IU/g を含む TD 2014、Teklad、Madison、WI) および水に自由にアクセスできるようにし

て維持する。骨減少症は、卵巣摘出したマウスを6週間にわたり骨量を喪失させることによって、マウスにおいて確立される。

【0047】

6週間の骨減少症確立期間後に、マウスを処置群（各群につき $n=6$ 動物）またはビヒクルPBS対照群に分ける。マウスの各処置群は、 3mg/kg または 10mg/kg の実施例1の例示的な抗体またはPBSを毎週皮下注射を受ける。4週間目にマウスを犠牲死させる。犠牲死させた後に、第5椎骨の骨格骨量密度（BMD）をAloka LaTeta LTC-100モデルCT走査装置を使用する定量的コンピュータ断層撮影法（qCT）によって評価する。

【0048】

本質的に上記の手順に従い、対照と比較して、 3mg/kg の抗体で処置した動物ではBMDが2%増加し、 10mg/kg の抗体で処置した動物ではBMDが11%増加した。これらの結果は、実施例1の例示的な抗体は、毎週投与した場合、卵巣摘出マウスにおいて椎骨のBMDの用量依存的増加をもたらすことを実証している。

【0049】

実施例7：精巣摘出したマウスモデルにおけるインビボ有効性分析

精巣摘出したマウスモデルを用いて、骨量密度および骨塩含量に対するインビボでの効果を評価する。16週齢の雄C57/B6マウス（Harlan、Indianapolis、IN）を精巣摘出し（またはビヒクル対照群、 $n=6$ ）、12時間の明/暗サイクルで、 22°C で食餌（0.72% Caおよび0.61% Pを含むTD 2014、Vit. D 0.99 IU/g、Teklad、Madison、WI）および水に自由にアクセスできるようにして維持する。骨減少症は、マウスを6週間にわたり骨量を喪失させることによって、精巣摘出したマウスにおいて確立される。

【0050】

6週間の骨減少症確立期間後、9匹のマウスに、 2mg/kg 用量の実施例1の例示的な抗体を週に2回皮下注射する。PBSを注射した動物を対照とする。2週間目にマウスを犠牲死させる。遠位大腿骨の骨量密度（BMD）および腰椎の骨塩含量（BMC）を、Aloka LaTeta LTC-100モデルCT走査装置を使用する定量的コンピュータ断層撮影法（qCT）によって評価する。

【0051】

本質的に上記の手順に従い、抗体で処置したマウスでは、対照動物と比較して、遠位大腿骨においてBMDが19%増加し、腰椎においてBMDが13%増加した。これらの結果は、実施例1の例示的な抗体による処置により、精巣摘出したマウスにおける遠位大腿骨および腰椎のBMDの増加がもたらされることを実証している。

配列

例示的なHC（配列番号1）

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTNYYIEWVRQAPGQGLEWMGVINPGWGDTNYPNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRDTAHGYALDPWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVKDKRVESKYGPCCPAPCAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

例示的なLC（配列番号2）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPK

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

例示的なH C V R（配列番号3）

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

例示的なL C V R（配列番号4）

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

例示的なH C（配列番号5）

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

例示的なL C（配列番号6）

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

例示的なH C V R（配列番号7）

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

例示的なL C V R（配列番号8）

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

例示的なH C D R 1（配列番号9）

K A S G Y A F T N Y Y I E

例示的なH C D R 2（配列番号10）

V I N P G W G D T N Y N E K F K G

例示的なH C D R 3（配列番号11）

A R R D T X H G Y Y A L D X

6位のXはA l aまたはA r gであり、14位のXはP r oまたはT y rである。

例示的なL C D R 1（配列番号12）

K A S Q N V G T N V A

10

20

30

40

50

例示的な L C D R 2 (配列番号 13)

Y S A S Y R Y S

例示的な L C D R 3 (配列番号 14)

Q Q Y X D Y P L T

4 位の X は T r p または A s n である。

配列番号 1 の H C タンパク質をコードする例示的な D N A (配列番号 15)

```
C A G G T G C A G C T G G T G C A G T C T G G G G C T G A G G T G A A G A A G C
C T G G G T C C T C A G T G A A G G T T T C C T G C A A G G C A T C T G G C T A
C G C C T T C A C C A A C T A C T A T A T C G A G T G G G T G C G A C A G G C C
C C T G G A C A A G G G C T T G A G T G G A T G G G A G T G A T C A A C C C C G
G C T G G G G C G A C A C G A A C T A C A A C G A G A A G T T C A A G G G C A G
A G T C A C C A T T A C C G C G G A C A A A T C C A C G A G C A C A G C C T A C
A T G G A G C T G A G C A G C C T G A G A T C T G A G G A C A C G G C C G T G T
A T T A C T G T G C G A G A C G C G A T A C G G C T C A C G G C T A C T A C G C
C C T T G A T C C G T G G G G C C A A G G A A C C A C G G T C A C C G T C T C C
T C A G C C T C C A C C A A G G G C C C A T C G G T C T T C C C G C T A G C G C
C C T G C T C C A G G A G C A C C T C C G A G A G C A C A G C C G C C C T G G G
C T G C C T G G T C A A G G A C T A C T T C C C C G A A C C G G T G A C G G T G
T C G T G G A A C T C A G G C G C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T
T C C C G G C T G T C C T A C A G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G
C A G C G T G G T G A C C G T G C C C T C C A G C A G C T T G G G C A C G A A G
A C C T A C A C C T G C A A C G T A G A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A
A G G T G G A C A A G A G A G T T G A G T C C A A A T A T G G T C C C C C A T G
C C C A C C C T G C C C A G C A C C T G A G G C C G C C G G G G G A C C A T C A
G T C T T C C T G T T C C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C T C T C A T G A
T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C G T G C G T G G T G G T G G A C G T
G A G C C A G G A A G A C C C C G A G G T C C A G T T C A A C T G G T A C G T G
G A T G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G C G G G
A G G A G C A G T T C A A C A G C A C G T A C C G T G T G G T C A G C G T C C T
C A C C G T C C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A C G G C A A G G A G T A C
A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G G C C T C C C G T C C T C C A T C G
A G A A A A C C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C A G C C C C G A G A G C C
A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C C C A G G A G G A G A T G A C C
A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T
A C C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A A A G C A A T G G G C A
G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C G C C T C C C G T G C T G G A C
T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A G G C T A A C C G T G G
A C A A G A G C A G G T G G C A G G A G G G G A A T G T C T T C T C A T G C T C
C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C A C A G A A G
A G C C T C T C C C T G T C T C T G G G T
```

配列番号 2 の L C をコードする例示的な D N A (配列番号 16)

```
G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C T C T G T C T G C A T
C T G T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C A A G G C C A G C C A
G A A T G T G G G C A C C A A C G T G G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C A
G G G A A A G C C C C T A A G C T C C T G A T C T A T A G C G C C A G C T A C A
G A T A C A G C G G G G T C C C A T C A A G G T T C A G T G G C A G T G G A T C
T G G G A C A G A T T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G T C T G C A A C C T
G A A G A T T T T G C A A C T T A C T A C T G T C A G C A G T A C T G G G A C T
A C C C C C T G A C C T T C G G C G G A G G G A C C A A G G T G G A G A T C A A
A C G G A C T G T G G C T G C A C C A T C T G T C T T C A T C T T C C C G C C A
```

10

20

30

40

50

TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GC

RANKL細胞外ドメイン（配列番号17）

MSKLEAQPF AHLTINATDIPSGSHKVSLS SWYHDRGWAKI
SNMTFSNGKLIVNQDGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYL
QLMVYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHFYSIN
VGGFFKLRS GEEISIEVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDID

【配列表】

0007246306000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 29/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)

F I

A 6 1 P 29/00 1 0 1
C 1 2 N 15/13

米国(US)

ンディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・ア
ンド・カンパニー内

(72)発明者

ビクター・エイチ・オブンゲ

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボ
ックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

合議体

審判長 阪野 誠司

審判官 田中 耕一郎

審判官 鳥居 敬司

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 1 2 5 2 5 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 3 0 7 0 1 (WO, A 1)

特許第 4 7 6 1 7 1 0 (JP, B 2)

欧州特許出願公開第 3 0 8 5 7 0 9 (EP, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 6 5 (US, A 1)

特表 2 0 0 4 - 5 2 0 0 1 1 (JP, A)

Oncology Reports, 2015, Vol. 34, pp. 3007-3016

日本薬理学雑誌, 2013, Vol. 141, pp. 22-26

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

PubMed

JSTPlus (JDreamIII)

UniProt/GeneSeq