

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-183176

(P2018-183176A)

(43) 公開日 平成30年11月22日 (2018. 11. 22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-142624 (P2018-142624)	(71) 出願人	513056606
(22) 出願日	平成30年7月30日 (2018. 7. 30)		アベクシジェン, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2016-501297 (P2016-501297) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, ショアウェイ ロード 75, スイート シー
原出願日	平成26年3月11日 (2014. 3. 11)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/786, 050		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 R A N K L 抗体および使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗 R A N K L 抗体及び使用方法の提供。

【解決手段】 (i) 特定の配列で表される、V H C D R 1 領域と V H C D R 2 領域と V H C D R 3 領域とを含む重鎖可変領域と、(i i) 特定の配列で表される、V L C D R 1 領域と V L C D R 2 領域と V L C D R 3 領域とを含む軽鎖可変領域とを含む、R A N K L に結合する単離抗体又はその抗原結合フラグメント、あるいは C D R 領域における 8 個までのアミノ酸置換を除いて、(i) 及び (i i) の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と同一の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体の改変体、又はその抗原結合フラグメント。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本明細書中に記載される発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2013年3月14日に出願された米国仮出願第61/786,050号（この出願は、その全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

10

【0002】

配列表に関する記載

本出願に関連する配列表は、ハードコピーの代わりにテキストフォーマットで提供し、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は、APEX_014_01WO_ST25.txtである。テキストファイルは117KBであり、2014年3月11日に作成され、EFS-Webにより電子出願した。

【0003】

背景

技術分野

本発明は、概して抗RANKL抗体、ならびにこれを使用する組成物および方法に関する。より詳しくは、本発明は、抗RANKL抗体およびそれらの製造および用途に関する。そのような抗体は、たとえば、骨転移等の種々の骨再吸収性疾患および腫瘍性疾患のいずれかを処置する方法において有用である。

20

【背景技術】

【0004】

関連技術の説明

骨の形態形成および再構築は、発達期および成人期を通して骨構造を代謝し、再構築する骨再吸収性破骨細胞および骨形成性骨芽細胞の協調作用により達成される。骨は、基本的多細胞単位と呼ばれる骨格内の特定の部位で、絶えず再吸収され、形成される。ヒトの体内の骨の総質量の10%が、毎年再構築されると推定される。活性化時、造血性単球／マクロファージ前駆体から区別する破骨細胞は、基本的多細胞単位に移動し、骨の一部を再吸収し、最後にはアポトーシスを起こす。続いて、前造骨性／間質細胞から発生する、新しく生成した骨芽細胞が、再吸収部位で骨を形成する。破骨細胞の発達は前造骨性細胞により制御され、その結果、骨の再吸収および形成のプロセスは強く協調され、したがって、骨形成の波を骨再吸収の各サイクルの後に続くようにする。骨芽細胞活性と破骨細胞活性との間のアンバランスにより、骨の質量の減少（骨粗鬆症）または増加（大理石骨病）を特徴とする、骨格異常になる可能性がある（Khosla、Endocrinology、2001、142、5050-5055、Nakashimaら、Curr. Opin. Rheumatol.、2003、15、280-287）。

30

【0005】

骨芽細胞と破骨細胞との間の情報交換は、サイトカインおよび細胞間接触を介して起こる。骨再構築において重要な調節的役割を担うサイトカインは、NF-κBリガンドの受容体活性化因子（RANKL）である。RANKLは、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーメンバーとして最初に同定され「腫瘍壊死因子関連活性化誘発サイトカイン（TRANCE）、破骨細胞分化抑制因子リガンド（OPGL）、ならびに破骨細胞分化因子（ODF）および腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリーメンバー11（TNFSF11）としても知られる」、続いて、インビトロで破骨細胞分化を誘発することができる因子として同定された（Andersonら、Nature、1997、390、175-179、Laceyら、Cell、1998、93、165-176、Wongら、J. Exp. Med.、1997、186、2075-2080、Yasudaら

40

50

、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998、95、3597-3602)。ヒトRANKL遺伝子は、染色体13q14に位置する。RANKLの最高発現レベルは、骨、骨髄およびリンパ系組織内で見いだされ（Andersonら、Nature、1997、390、175-179、Laceyら、Cell、1998、93、165-176、Wongら、J. Exp. Med.、1997、186、2075-2080、Yasudaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998、95、3597-3602）、脳、心臓、腎臓、骨格筋および皮膚でも検出可能である（Kartsogiannisら、Bone、1999、25、525-534）。

【0006】

RANKLは、3種のRANKLサブユニットから組み立てられ、機能的三量体分子を形成する。RANKLは、最初は、細胞膜に固着し、メタロプロテアーゼーディスインテグリンTNF- α 転換酵素（TACE）のタンパク質分解作用により細胞表面から放出されるタンパク質の小さな分画である（Lumら、J. Biol. Chem.、1999、274、13613-13618）。RANKLは、破骨細胞分化および活性を刺激するのに、および破骨細胞アポトーシスを抑制するのに必要充分である（Fullerら、J. Exp. Med.、1998、188、997-1001、Laceyら、Cell、1998、93、165-176、Lumら、J. Biol. Chem.、1999、274、13613-13618、Yasudaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998、95、3597-3602）。RANKは、前造骨性細胞および骨髄間質細胞の表面で発現する。その発現は、ビタミンD3、副甲状腺ホルモン（PTH）、インターロイキン1- β およびTNF- α をはじめとする種々のホルモン、サイトカイン、成長因子およびグルココルチコイドによって、正または負に調節可能で、これらは全て、RANKL発現を増加する（Kongら、Immunol. Today、2000、21、495-502）。

【0007】

骨再吸収および形成のサイクルの開始で、RANKLは前破骨（preosteoclast）細胞上のその機能的受容体RANKに結合する（Andersonら、Nature、1997、390、175-179、Laceyら、Cell、1998、93、165-176）。RANKLとRANKとの間のこの相互作用により、多核形成、骨再吸収機能、および系統特異的マーカー酒石酸塩抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）の発現を表現型的に特徴とする、成熟した破骨細胞の形成が刺激される（Burgessら、J. Cell. Biol.、1999、145、527-538、Hsuら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、1999、96、3540-3545、Lumら、J. Biol. Chem.、1999、274、13613-13618、Yasudaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998、95、3597-3602）。あるいは、RANKLは、主に骨髄間質細胞によって発現し、RANKLによる破骨細胞の成熟および活性化を抑制するように働く可溶性受容体破骨細胞分化抑制因子（OPG）に結合できる（Laceyら、Cell、1998、93、165-176、Yasudaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1998、95、3597-3602）。骨再構築の主要な制御因子であるPTHは、OPG発現を減少させ、同時にRANKL発現を増加させることによって、破骨細胞機能を刺激する（LeeおよびLorenzo、Endocrinology、1999、140、3552-3561）。前造骨性細胞が分化すると、RANKL mRNAレベルは有意に減少し、一方OPG mRNAレベルは増加する（Goriら、Endocrinology、2000、141、4768-4776）。このようなRANKLレベルとOPGレベルとの間の動的関係により破骨細胞活性の波、次いで骨芽細胞活性の波が起こるようにし、これにより骨の再吸収および形成のサイクルが完了する。

【0008】

RANKLは、細胞内ストアからのカルシウムの放出により、破骨細胞中のカルシウムの一過性上昇を誘発する（Komarovaら、J. Biol. Chem.、2003、

10

20

30

40

50

278、8286-8293)。T細胞では、T細胞受容体活性化誘発カルシウム流動は、RANKL発現の誘発を引き起こすだけである(Wangら、Eur. J. Immunol.、2002、32、1090-1098)。

【0009】

RANKL遺伝子の破壊に関しホモ接合体であるマウスは、予期される頻度で生まれるが、3週齢で離乳した後、重度の成長遅滞を示す。RANKL欠損マウスは、破骨細胞形成をサポートする骨芽細胞が無能であるため、重度の大理石骨病(骨の肥厚)、歯の萌出における欠陥、および破骨細胞の完全な欠乏を示す(Kongら、Immunol. Today、2000、21、495-502)。

【0010】

RANKL機能は、骨形態形成および再構築に限られない。RANKL欠損マウスも、Tリンパ球およびBリンパ球の初期分化において欠損を示し、全てのリンパ節を欠き、RANKLは、必須の破骨細胞分化因子であるほかに、リンパ節器官形成およびリンパ球発生の制御因子であることを実証する(Kongら、Immunol. Today、2000、21、495-502)。T細胞受容体刺激はRANKL遺伝子発現を誘発し、次いで、T細胞内のc-Jun N末端キナーゼの活性化を促す(Wongら、J. Biol. Chem.、1997、272、25190-25194)。また、RANKLは、骨髄由来樹状細胞でアポトーシスを阻害することによって、骨髄誘導樹状細胞の重要な生存因子として免疫系機能に関与する(Lumら、J. Biol. Chem.、1999、274、13613-13618、Wongら、J. Exp. Med.、1997、186、2075-2080)。さらに、RANKLは、マウスにおいて、妊娠期間中、小葉腺胞乳房構造の発達にも必要である(Fataら、Cell、2000、103、41-50)。

【0011】

RANKLによる破骨細胞の不適切な活性化により、骨の再吸収の過程間でアンバランスが生じ、その結果、骨の再吸収速度が骨形成の速度を超えることになる。局所または全身的な骨喪失は、閉経後骨粗鬆症および加齢性骨粗鬆症、歯周炎、家族性膨張性骨溶解症(familial expansile osteolysis)ならびにパジェット病をはじめとする、多くの骨減少性障害に観察される(Khosla、Endocrinology、2001、142、5050-5055)。RANKL mRNAの上方制御には、これらの疾患のいくつかが報告されている。

【0012】

パジェット病は、骨再吸収の増加を誘発する多数の異常破骨細胞を特徴とする。RANKL mRNA発現は、パジェット病患者に由来する細胞株および骨髄の両方において上昇する。さらに、パジェット病患者からの破骨細胞前駆体は、正常細胞に比べ非常に低いRANKL濃度で破骨細胞形成を起こす(Menaarら、J. Clin. Invest.、2000、105、1833-1838)。

【0013】

骨減少性病態を伴う他の疾患、たとえば、関節リウマチ、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病は、活性化T細胞および骨破壊を特徴とする(Kongら、Immunol. Today、2000、21、495-502)。関節リウマチは、進行性破骨細胞介在骨再吸収を特徴とする慢性炎症性疾患である。関節リウマチの関節液は、破骨細胞前駆体、RANKL発現T細胞、およびOPG生成B細胞を含む。関節リウマチの関節液からの培養マクロファージは、RANKL依存性過程において、破骨細胞に分化し得る(Itonagaら、J. Pathol.、2000、192、97-104)。ヒト関節リウマチの臨床的特徴の多くを模倣する実験的に誘発された関節炎のT細胞依存性ラットモデルにおいて、OPG処置によるRANKL機能の阻害は、骨破壊を防ぐ(Kongら、Nature、1999、402、304-309)。

【0014】

多発性骨髄腫は、骨粗鬆症および骨破壊が顕著な特徴の癌である。ミエローマ細胞株は

10

20

30

40

50

、RANKL発現を刺激し、一方、骨髄間質細胞によりOPG発現が阻害され、その結果、RANKLレベルとOPGレベルとの間のバランスが壊れ、破骨細胞の異常な生成および活性化が起こる（Pearseら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2001、98、11581-11586）。RANKLの分泌形も悪性の体液高カルシウム血症を引き起こす癌細胞によって発現される（Nagaiら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、2000、269、532-536）。OPG発現の同時減少に伴うRANKLの増加も、骨芽細胞系統細胞のグルコルチコイド処置後に観察され、これは、前記細胞の破骨細胞形成も刺激し、グルコルチコイドを全身的に使用することにより重度の骨粗鬆症になるメカニズムを示唆する（Hofbauerら、Endocrinology、1999、140、4382-4389）。

10

【0015】

これらの発見は、免疫機能と骨生理機能との間の連結を示し、また、免疫障害に関連する骨密度損失の分子的な説明を提供し、RANKL機能の阻害およびその結果としての破骨細胞の活性は、骨減少性症状を寛解させ得ることを示唆する（Kongら、Immunol. Today、2000、21、495-502）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Khosla、Endocrinology（2001）142、5050～5055

20

【非特許文献2】Nakashimaら、Curr. Opin. Rheumatol.（2003）15、280～287

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

多くの疾患におけるRANKL関与の結果として、RANKLの発現の上方制御が、非常に多くの異なる種類の骨減少性疾患に関連することを考えれば、骨破壊を特徴とする障害の処置にとりわけ重要である、RANKL機能を効果的に阻害し得る追加の薬剤の必要性が残っている。

【0018】

30

本発明は、RANKL機能を阻害する組成物および方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明の一態様は、（i）配列番号：3で表されるVHCDR1領域と、配列番号：4で表されるVHCDR2領域と、配列番号：5で表されるVHCDR3領域とを含む重鎖可変領域と、（ii）配列番号：6または15で表されるVLCDR1領域と、配列番号：7で表されるVLCDR2領域と、配列番号：8で表されるVLCDR3領域とを含む軽鎖可変領域とを含む、RANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント、または前記CDR領域における8個までのアミノ酸置換を除いて、（i）および（ii）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と同一の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む前記抗体の改変体、またはその抗原結合フラグメントを提供する。本明細書に記載の単離抗体、またはその抗原結合フラグメントの一実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含む。本明細書に記載の単離抗体、またはその抗原結合フラグメントの他の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含む。

40

【0020】

本発明の他の態様は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、RANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。一実施形態では、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列に対して少なくとも

50

90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域も含む。さらなる実施形態では、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域も含む。

【0021】

本発明の他の態様は、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトRANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。一実施形態では、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む単離抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号：1で表されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域も含む。

10

【0022】

ある実施形態では、本明細書の抗体はヒト化されている。例示的ヒト化抗体は、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号：10または11で表されるアミノ酸配列を含むVL領域とを含んでもよい。ある他の実施形態では、ヒト化抗体は、配列番号：226で表されるアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号：227で表されるアミノ酸配列を含むVL領域とを含んでもよい。他の実施形態では、ヒト化抗体は、配列番号：229で表されるアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号：230で表されるアミノ酸配列を含むVL領域とを含んでもよい。さらに他の実施形態では、ヒト化抗体は、配列番号：231で表されるアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号：232で表されるアミノ酸配列を含む(c o m p r i s e s) VL領域とを含んでもよい。

20

【0023】

ある実施形態では、本明細書の抗体は、単鎖抗体、ScFv、ヒンジ領域を欠く一価抗体、およびミニボディからなる群より選択されてもよい。一実施形態では、抗体は、FabまたはFab'フラグメントである。他の実施形態では、抗体は、F(ab')₂フラグメントまたは全抗体である。ある他の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、ヒトIgG定常ドメインを含む。一実施形態では、IgG定常ドメインは、IgG2 CH1ドメインを含む。他の実施形態では、IgG定常ドメインは、IgG2 Fc領域を含む。

【0024】

本発明の他の態様は、特定のヒトRANKLにおいて、RANKLに結合するために、本明細書に記載の抗体いずれかと競合する抗体を提供する。

30

【0025】

本発明の他の態様は、約0.16 nMまたはそれ未満のKDでRANKLを結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。ある実施形態では、本発明に記載の抗体は、約0.016 nMと0.36 nMとの間のKDでRANKLに結合する。ある実施形態では、本明細書に記載の抗体は、約0.026 nMと0.26 nMとの間のKDでRANKLに結合する。ある実施形態では、本明細書に記載の抗体は、約0.036 nMと0.36 nMとの間のKDでRANKLに結合する。ある実施形態では、本発明に記載の抗体は、約0.05 nM、0.06 nM、0.07 nM、0.08 nM、0.09 nM、0.1 nM、0.15 nM、0.16 nM、0.17 nM、0.18 nM、0.19 nM、0.2 nM、0.25 nM、0.3 nM、0.35 nM、または0.4 nMのKDでRANKLに結合する。

40

【0026】

本発明の他の態様は、(a) RANKLのRANKへの結合を妨害する、(b) RANKL誘発破骨細胞分化を阻害する、(c) 破骨細胞活性を阻害する、(d) 骨喪失を阻害し、骨密度を増やす、(e) ヒトおよびげっ歯類RANKLの両方を結合し、阻害する、または(f) a. ~ e. の任意の1つまたはそれより多くの組み合わせを行う、単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0027】

本発明の他の態様は、本明細書に記載するように、単離抗体をコード化する単離ポリヌ

50

クレオチド、またはその抗原結合フラグメントも提供する。本発明は、単離抗体をコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および該ベクターを含む単離宿主細胞も提供する。

【0028】

本発明の他の態様は、生理的に許容され得る担体と、治療的有效量の本明細書に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメントとを含む組成物を提供する。

【0029】

本発明のさらに他の態様は、骨減少性障害を持つ患者を処置する方法であって、該患者に、生理的に許容され得る担体と、治療的有效量の本明細書に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメントとを含む組成物を投与することにより骨減少性障害を処置することを含む方法を提供する。この点に関し、骨減少性障害は、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病、若年性パジェット病、破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失からなる群より選択される。

【0030】

本発明の他の態様は、(i) 図1に示すVH領域のいずれか1つのVHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む重鎖可変領域と、(ii) 図1に示す抗体のいずれか1つの対応VL領域のVLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3領域を含む軽鎖可変領域とを含む、RANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント、または前記CDR領域における8個までのアミノ酸置換を除いて、(i) および(ii) の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と同一の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む前記抗体の改変体、またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0031】

本発明のさらに他の態様は、図1に示すVH領域のいずれか1つを含む重鎖可変領域を含む、RANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。この点に関し、そのような抗体は、図1に示すような対応VL領域に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含んでもよい。他の実施形態では、そのような抗体は、図1に示すような対応軽鎖可変領域をさらに含んでもよい。

【0032】

本発明のさらなる態様は、図1に示すVL領域のいずれか1つを含む軽鎖可変領域を含む、RANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。この点に関し、そのような抗体は、図1に示すような対応VH領域に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をさらに含んでもよく、または図1に示すような対応重鎖可変領域をさらに含んでもよい。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

(i) 配列番号：3で表されるVHCDR1領域と、配列番号：4で表されるVHCDR2領域と、配列番号：5で表されるVHCDR3領域とを含む重鎖可変領域と、(ii) 配列番号：6または15で表されるVLCDR1領域と、配列番号：7で表されるVLCDR2領域と、配列番号：8で表されるVLCDR3領域とを含む軽鎖可変領域とを含む、RANKLに結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント、あるいは前記CDR領域における8個までのアミノ酸置換を除いて、(i) および(ii) の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と同一の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む前記抗体の改変体、またはその抗原結合フラグメント。

(項目2)

前記重鎖可変領域が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含む、項目1に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目3)

前記軽鎖可変領域が、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含む、項目1に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 4)

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、RANKL に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 5)

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、項目 4 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 6)

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、項目 4 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

(項目 7)

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト RANKL に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 8)

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目 7 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 9)

前記抗体がヒト化されている、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 10)

20

(a) 前記 VH 領域が配列番号：9 で表されるアミノ酸配列を含み、前記 VL 領域が配列番号：10 または 11 で表されるアミノ酸配列を含む、または (b) 前記 VH 領域が配列番号：226 で表されるアミノ酸配列を含み、前記 VL 領域が配列番号：227 で表されるアミノ酸配列を含む、項目 9 に記載の単離抗体。

(項目 11)

前記抗体が、単鎖抗体、ScFv、ヒンジ領域を欠く一価抗体、およびミニボディからなる群より選択される、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 12)

前記抗体が、Fab または Fab' フラグメントである、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 13)

30

前記抗体が、F(ab')₂ フラグメントである、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 14)

前記抗体が、全抗体である、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 15)

ヒト IgG 定常ドメインを含む、項目 1 に記載の単離抗体。

(項目 16)

前記 IgG 定常ドメインが、IgG2 C H1 ドメインを含む、項目 15 に記載の単離抗体。

(項目 17)

前記 IgG 定常ドメインが、IgG2 Fc 領域を含む、項目 15 に記載の単離抗体。

40

(項目 18)

ヒト RANKL への結合に関して、項目 1 に記載の抗体と競合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 19)

約 0.16 nM またはそれ未満の KD で RANKL を結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 20)

- a. RANKL の RANK への結合を妨害する、
- b. RANKL 誘発破骨細胞分化を阻害する、
- c. 破骨細胞活性を阻害する、

50

- d. 骨喪失を阻害し、かつ骨密度を増やす、
- e. ヒト、げっ歯類およびサル の RANKL を結合し、かつそれを阻害する、または
- f. a. ~ e. のうちの任意の 1 つまたはそれより多くの組み合わせを行う、
単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 2 1)

項目 1 または項目 1 0 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメントをコード化する、単離ポリヌクレオチド。

(項目 2 2)

項目 2 1 に記載の単離ポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

(項目 2 3)

項目 2 2 に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。

(項目 2 4)

生理的に許容され得る担体と、治療的有效量の項目 1 または項目 1 0 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメントとを含む、組成物。

(項目 2 5)

骨減少性障害にかかっている患者を処置するための方法であって、前記患者に、項目 2 4 に記載の組成物を投与することにより、前記骨減少性障害を処置することを含む、方法。

(項目 2 6)

前記骨減少性障害が、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病、若年性パジェット病、破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失からなる群より選択される、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

(i) 図 1 に示す V H 領域のいずれか 1 つの V H C D R 1、V H C D R 2、および V H C D R 3 を含む重鎖可変領域と、(i i) 図 1 に示す抗体のいずれか 1 つの対応 V L 領域の V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 領域を含む軽鎖可変領域とを含む、RANKL に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント、または前記 C D R 領域における 8 個までのアミノ酸置換を除いて、(i) および (i i) の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と同一の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む前記抗体の改変体、またはその抗原結合フラグメント。

(項目 2 8)

図 1 に示す V H 領域のいずれか 1 つを含む重鎖可変領域を含む、RANKL に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 2 9)

図 1 に示す対応 V L 領域に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、項目 2 8 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 3 0)

図 1 に示す対応軽鎖可変領域をさらに含む、項目 2 9 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 3 1)

図 1 に示す V L 領域のいずれか 1 つを含む軽鎖可変領域を含む、RANKL に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 3 2)

図 1 に示す対応 V H 領域に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をさらに含む、項目 3 1 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 3 3)

図 1 に示す対応重鎖可変領域をさらに含む、項目 3 1 に記載の単離抗体またはその抗原

10

20

30

40

50

結合フラグメント。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1-1】図1Aおよび図1Bは、それぞれ、40の抗-RANKLウサギ抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Cは、クローン23ウサギ親クローンおよびヒト化クローン23 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1に示されたVHおよびVL配列に関する配列番号は、配列番号：1、2、9～11および16～93で表される。下線が引かれたCDR配列は、配列番号：3～8、13～15および94～225で表される。図1Dは、クローン408ウサギ親クローンおよびヒト化クローン408 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Eは、クローンEBI51-22ウサギ親クローンおよびヒト化クローンEBI-51-22 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。

10

【図1-2】図1Aおよび図1Bは、それぞれ、40の抗-RANKLウサギ抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Cは、クローン23ウサギ親クローンおよびヒト化クローン23 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1に示されたVHおよびVL配列に関する配列番号は、配列番号：1、2、9～11および16～93で表される。下線が引かれたCDR配列は、配列番号：3～8、13～15および94～225で表される。図1Dは、クローン408ウサギ親クローンおよびヒト化クローン408 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Eは、クローンEBI51-22ウサギ親クローンおよびヒト化クローンEBI-51-22 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。

20

【図1-3】図1Aおよび図1Bは、それぞれ、40の抗-RANKLウサギ抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Cは、クローン23ウサギ親クローンおよびヒト化クローン23 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1に示されたVHおよびVL配列に関する配列番号は、配列番号：1、2、9～11および16～93で表される。下線が引かれたCDR配列は、配列番号：3～8、13～15および94～225で表される。図1Dは、クローン408ウサギ親クローンおよびヒト化クローン408 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Eは、クローンEBI51-22ウサギ親クローンおよびヒト化クローンEBI-51-22 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。

30

【図1-4】図1Aおよび図1Bは、それぞれ、40の抗-RANKLウサギ抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Cは、クローン23ウサギ親クローンおよびヒト化クローン23 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1に示されたVHおよびVL配列に関する配列番号は、配列番号：1、2、9～11および16～93で表される。下線が引かれたCDR配列は、配列番号：3～8、13～15および94～225で表される。図1Dは、クローン408ウサギ親クローンおよびヒト化クローン408 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。図1Eは、クローンEBI51-22ウサギ親クローンおよびヒト化クローンEBI-51-22 VHおよびVLのアミノ酸配列アラインメントを示す。

【図2】図2A～図2Dは、40抗RANKL抗体のRANKL-遺伝子導入された293細胞への結合を示すグラフである。

40

【図3-1】図3A～図3Gは、RANKLのその同族受容体（RANK）への結合を妨害する、抗RANKL抗体の能力を示す。

【図3-2】図3A～図3Gは、RANKLのその同族受容体（RANK）への結合を妨害する、抗RANKL抗体の能力を示す。

【図4】図4A～図4Dは、ヒトRANKLおよびマウスRANKLを有する抗RANKL抗体の交差反応性を示す棒グラフである。

【図5】図5は、RANKLで誘発された破骨細胞の細胞分化の抗RANKL抗体による阻害を示すグラフである。

【図6】図6Aおよび図6Bは、それらの親ウサギ抗体と比較した、293細胞の表面で

50

発現する RANKL へのヒト化抗 RANKL 抗体 23 および 408 の結合を示すグラフである。使用したクローン 23 ヒト化重鎖および軽鎖は、図で示すように、配列番号：10 (23Vk) または 11 (23Vkb) で表されるヒト化 VL のいずれかを有する、VH 23HZD-1 HC (VH 配列は、配列番号：9 で表される) であった。

【図 7】図 7A～図 7C は、ヒト化抗体 23、408 および EBI-51-22 は、それらの親ウサギクローンと比較して、RANK への RANKL 結合の同等の妨害活性を実証したことを示す。使用したクローン 23 ヒト化重鎖および軽鎖は、図示するように、配列番号：10 (23Vk) または 11 (23Vkb) で表されるヒト化 VL のいずれかを有する、VH 23HZD-1 HC (VH 配列は、配列番号：9 で表される) であった。

【図 8】図 8A および図 8B は、ヒト化抗 RANKL 抗体 23、408 および EBI-51-22 のヒト RANKL によって誘発された破骨細胞分化を阻害する能力を示す。使用したクローン 23 ヒト化重鎖および軽鎖は、図示するように、配列番号：10 (23Vk) または 11 (23Vkb) で表されるヒト化 VL のいずれかを有する、VH 23HZD-1 HC (VH 配列は、配列番号：9 で表される) であった。

【図 9】図 9A および図 9B は、ヒト化抗 RANKL 抗体 23、408 および EBI-51-22 のマウス RANKL によって誘発された破骨細胞分化を阻害する能力を示す。使用したクローン 23 ヒト化重鎖および軽鎖は、図示するように、配列番号：10 (23Vk) または 11 (23Vkb) で表されるヒト化 VL のいずれかを有する、VH 23HZD-1 HC (VH 配列は、配列番号：9 で表される) であった。

【図 10】図 10 は、ウサギ抗 RANKL 抗体 23 がインビボで有意に破骨細胞活性を阻害したことを示す。

【図 11】図 11 は、OVX マウスにおいて、抗 RANKL 抗体 23 が骨密度を有意に増加したことを実証する棒グラフである。使用したクローン 23 ヒト化重鎖および軽鎖は、配列番号：11 (23Vkb) で表されるヒト化 VL を有する VH 23HZD-1 HC (VH 配列は、配列番号：9 で表される) であった。

【図 12】図 12 は、h23n IgG2 ヒト化クローン 23 抗体を、図示するように、IgG1 または IgG2 を持つクローン 23 ヒト化 VH 23HZD-1 HC / ヒト化 Vkb 軽鎖と比較したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0034】

配列の簡単な説明

配列番号：1 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VH 領域のアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号：2 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VL 領域のアミノ酸配列である。

【0036】

配列番号：3 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VHCDR1 領域のアミノ酸配列である。

【0037】

配列番号：4 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VHCDR2 領域のアミノ酸配列である。

【0038】

配列番号：5 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VHCDR3 領域のアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号：6 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VLCDR1 領域のアミノ酸配列である。

【0040】

配列番号：7 は、クローン 23 ウサギ抗 RANKL 抗体の VLCDR2 領域のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列である。

【0041】

配列番号：8は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体のVLCDR3領域のアミノ酸配列である。

【0042】

配列番号：9は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体（23HZD-1 HC）のVH領域のヒト化配列のアミノ酸配列である。

【0043】

配列番号：10は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体のVL領域のヒト化配列のアミノ酸配列である。本明細書では、23LHZDまたはVkとも言う。

10

【0044】

配列番号：11は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体のVL領域の第2ヒト化配列のアミノ酸配列である。本明細書では、23LHZD__bまたはVkbとも言う。

【0045】

配列番号：12は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体（23HZD-2 HC）のVH領域の第2ヒト化配列のアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号：13は、23HZD-2ヒト化クローン23ウサギ抗RANKL抗体のVHCDR1のアミノ酸配列である。

【0047】

配列番号：14は、23HZD-2ヒト化クローン23ウサギ抗RANKL抗体のVHCDR2のアミノ酸配列である。

20

【0048】

配列番号：15は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体（VLbCDR1）の第2ヒト化VL配列のVLCDR1のアミノ酸配列である。

【0049】

【表 1 - 1】

VHアミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
7	16
20	17
37	18
68	19
91	20
130	21
147	22
174	23
191	24
193	25
210	26
220	27
227	28
238	29
246	30
256	31
270	32
299	33
318	34
327	35
379	36
383	37
388	38
408	39
411	40
415	41
416	42
420	43
447	44
476	45
480	46
547	47
565	48
EBI-51-1	49
EBI-51-2	50
EBI-51-4	51
EBI-51-11	52
EBI-51-22	53
EBI-51-23	54

10

20

30

【 0 0 5 0 】

【表 1 - 2】

VLアミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
7	55
20	56
37	57
68	58
91	59
130	60
147	61
174	62
191	63
193	64
210	65
220	66
227	67
238	68
246	69
256	70
270	71
299	72
318	73
327	74
379	75
383	76
388	77
408	78
411	79
415	80
416	81
420	82
447	83
476	84
480	85
547	86
565	87
EBI-51-1	88
EBI-51-2	89
EBI-51-4	90
EBI-51-11	91
EBI-51-22	92
EBI-51-23	93

10

20

30

【 0 0 5 1 】

【表 1 - 3】

VHCDR1 アミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
246	94
EBI-51-23	95
220, 256, 327	96
37	97
379	98
193	99
210	100
91, 227, 480	101
415	102
174	103
416	104
476	105
383	106
565	107
EBI-51-4	108
270	109
130, 388, 411	110
420, 447	111
20, 68, 318, 547	112
299	113
EBI-51-2	114
EBI-51-22	115
147, 408, EBI-51-11	116
238	117
7	118
191	119
EBI-51-1	120

10

20

【 0 0 5 2 】

【表 1 - 4】

VHCDR2アミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
383	121
476	122
EBI-51-1	123
130	124
388, 411	125
EBI-51-4	126
91, 220, 227, 256, 327, 415, 480	127
EBI-51-23	128
191	129
299	130
270	131
37	132
68	133
420, 447	134
210	135
7, 174, 238, 379	136
20	137
416, 565	138
246, 318, 547	139
408	140
147	141
193	142
EBI-51-11	143
EBI-51-2	144
EBI-51-22	145

10

20

【 0 0 5 3】

【表 1 - 5】

VHCDR3アミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
193	146
37, 270	147
EBI-51-2; EBI-51-4; EBI-51-11; EBI-51-22	148
191	149
130, 147, 388, 408, 411	150
EBI-51-23	151
318	152
379	153
68	154
20	155
7, 565	156
238, 246	157
416	158
210	159
174, 420, 447, 547	160
EBI-51-1	161
91, 227	162
220, 256, 327, 415	163
299	164
476	165
383	166
480	167

30

40

【 0 0 5 4】

【表 1－6】

VLCDR1アミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
20	168
476	169
EBI-51-2	170
7 91; 130; 147; 174; 220; 227; 238; 256; 327; 388; 408; 411; 415; 416; 420; 447; 480; 565; EBI-51-1; EBI-51-4; EBI-51-11; EBI-51-22; EBI-51-23;	171
270	172
383	173
37, 191, 210, 246, 379, 547	174
68, 193, 318	175
299	176

10

【 0 0 5 5 】

【表 1－7】

VLCDR2アミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
476	177
7, 210, 270, 318, 420, 447, 547	178
174, 238	179
130, 147, 388, 408, 411, 565, EBI-51-23	180
379	181
20	182
299, EBI-51-1, EBI-51-2, EBI-51-4, EBI-51-11, EBI-51-22	183
37, 191	184
383	185
193	186
68, 220, 246, 256, 327, 415, 416, 480	187
91, 227	188

20

30

【 0 0 5 6 】

【表 1－8】

VLCDR3アミノ酸配列	
クローン番号	配列番号:
7	189
20	190
37	191
68	192
91	193
130	194
147	195
174	196
191	197
193	198
210	199
220	200
227	201
238	202
246	203
256	204
270	205
299	206
318	207
327	208
379	209
383	210
388, 411	211
408	212
415	213
416	214
420, 447	215
476	216
480	217
547	218
565	219
EBI-51-1	220
EBI-51-2	221
EBI-51-4	222
EBI-51-11	223
EBI-51-22	224
EBI-51-23	225

10

20

30

40

50

配列番号：226は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体（h23n VH）のVH領域の第3ヒト化配列のアミノ酸配列である。

【0057】

配列番号：227は、クローン23ウサギ抗RANKL抗体（h23n VL）のVL領域の第3ヒト化配列のアミノ酸配列である。

【0058】

配列番号：228は、h23n VHCDR3のアミノ酸配列である。

【0059】

配列番号：229は、クローン408ウサギ抗RANKL抗体のヒト化VH領域のアミノ酸配列である。

【0060】

配列番号：230は、クローン408ウサギ抗RANKL抗体のヒト化VL領域のアミノ酸配列である。

【0061】

配列番号：231は、クローンEBI51-22ウサギ抗RANKL抗体のヒト化VH

領域のアミノ酸配列である。

【0062】

配列番号：232は、クローンEBI51-22ウサギ抗RANKL抗体用ヒト化VLのアミノ酸配列である。

【0063】

詳細な説明

本開示は、特定のエピトープ特異性および機能的特性を有する特定の抗体において、RANKLに特異的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントに関する。本発明の一実施形態は、RANKLに結合し、RANKとのRANKL結合を妨害し、RANK誘発下流域細胞のシグナル伝達および生物学的効果を阻害することができる特異的ヒト化抗体およびそのフラグメントを包含する。本発明のより詳しい実施形態では、本明細書に記載される抗体は、約0.16 nMの親和性でRANKLに特異的に結合し、RANKへのRANKLの結合を妨害する。さらなる実施形態では、本明細書に記載される抗体は、約0.05 nM～約0.25 nMの親和性でRANKLに特異的に結合し、RANKへのRANKLの結合を妨害する。他の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、約0.08、0.09、0.095、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、または約0.2 nM～約0.25 nMの親和性で、RANKLに特異的に結合する。さらなる実施形態では、本明細書に記載される抗体は、約0.16 nMまたはそれ未満の親和性でRANKLに特異的に結合し、RANKへのRANKLの結合を妨害する。

【0064】

本発明の実施形態は、RANKに関連する疾患および障害、またはその異常な発現の診断、判定および処置のための抗RANKL抗体またはその抗原結合フラグメントの使用に関する。対象抗体は、疾患の中でもとりわけ、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失を始めとする骨減少性障害の処置または予防において使用される。

【0065】

本発明の実践は、特に反対のことが示されない限り、当該技術範囲内のウィルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および組換えDNA技術の従来の方法を採用するであろう。その多くを、説明の目的のために以下に記載する。それらの技術は、下記文献に十分に説明されている。たとえば、以下を参照のこと。Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、New York、N. Y.（2009）、Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology、第3編、Wiley & Sons、1995、Sambrook and Russell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3編、2001）、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（1982）、DNA Cloning: A Practical Approach、I & II巻（D. Glover編）、Oligonucleotide Synthesis（N. Gait編、1984）、Nucleic Acid Hybridization（B. Hames & S. Higgins編、1985）、Transcription and Translation（B. Hames & S. Higgins編、1984）、Animal Cell Culture（R. Freshney編、1986）、Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning（1984）、および他の類似する文献。

【0066】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」およ

び「the」は、内容が明確に他のことを示していない限り、複数形のものを含む。

【0067】

文脈で他のことを要求しない限り、本明細書全体を通して、用語「含む“comprise”」またはその変形「含む“comprises”」または「含んでいる“comprising”」は、記載された1つの要件、または複数の要件あるいは完全体の完全体または群を含むことが含意され、任意の他の要件、または複数の要件あるいは完全体の完全体または群を排除するものではないことが理解されるだろう。

【0068】

本明細書の各実施形態は、他に明らかに記載がない限り、必要な変更を加えて、全ての他の実施形態に適用されるものである。

【0069】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換には、標準的な技術を使用してもよい（たとえば、エレクトロポレーション、リポフェクション）。酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従って、当該技術分野で既知の方法で、または本明細書に記載されるように行ってもよい。これらおよび関連する技術および手順は、当該分野で周知の従来の方法に従って、本明細書全体に引用され、検討されている種々の普遍的でより詳しい参考文献に記載のように、通例通りに行ってもよい。特に定義されていない限り、本明細書に記載される分子生物学、分析化学、合成有機化学、ならびに医学および薬学化学に関連して利用されている命名法およびそれらの実験法および技術は、当該分野で周知であり、よく使用されているものである。組換え技術、分子生物学的、微生物学的、化学的合成、化学分析、製剤、処方、および伝達、および患者の処置に関しては、標準的な技術を使用してもよい。

【0070】

本発明の実施形態は、RANKLに結合する抗体に関する。特に、本明細書に記載される抗体は、予測できないほど高い親和性でRANKLに特異的に結合し、RANKLへのRANKの結合を妨害し、RANK活性を妨害し、異常なRANK発現に関連する疾患の処置に治療的な有用性を有する。また、本明細書に記載される抗体は、種々のRANKL介在生物学的効果を阻害する能力等の有利な特性も持つ（たとえば、破骨細胞の細胞分化および／または活性、骨密度の喪失／減少）。また、本明細書に記載される抗体は、RANKL受容体内部移行に対する効果も持ち得る。

【0071】

ヒト化バージョンを含む、例示的抗体、抗原結合フラグメント、VH、VL、またはその相補性決定領域（CDR）の配列は、配列番号：1～232で表される。

【0072】

当該分野で周知のように、抗体は、イムノグロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つのエピトープ認知部位を介して、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等の標的に特異的に結合し得るイムノグロブリン分子である。本明細書で使用する用語は、無処理のポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけでなく、そのフラグメント（たとえば、dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv）、単鎖（ScFv）、その合成改変体、天然型改変体、求められる特性の抗原結合フラグメントを持つ抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、および任意の他の求められる特異性の抗原結合部位またはフラグメント（エピトープ認知部位）を含むイムノグロブリン分子の修飾構造体も包含する。「二重特異性抗体」、遺伝子融合により構築される多価または多選択性フラグメント（WO94/13804、P. Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、6444-6448、1993）も本明細書で検討する抗体の特定の形である。CH3ドメインに結合するscFvを含むミニボディも本発明に含まれる（S. Huら、Cancer Res.、56、3055-3061、1996）。たとえば、以下を参照のこと。Ward、E. S. ら、Nature 341、544-546（1989）、Birdら、Science、242、423-426、1988、Hustonら、PNAS USA、85、5879-5883、1988

8)、PCT/US92/09965、WO94/13804、P. Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、6444-6448、1993、Y. Reiterら、Nature Biotech、14、1239-1245、1996、S. Huら、Cancer Res.、56、3055-3061、1996。

【0073】

本明細書で使用される用語「抗原結合フラグメント」は、関心のある抗原、特にRANKLに結合するイムノグロブリン重および／または軽鎖のCDRを少なくとも1つ含むポリペプチドフラグメントを言う。この点に関し、本明細書に記載される抗体の抗原結合フラグメントは、RANKLを結合する抗体から、本明細書で表されるVHおよびVL配列の1、2、3、4、5または6個全てCDRを含んでもよい。本明細書に記載されるRANKL特異的抗体の抗原結合フラグメントは、RANKLに結合することができる。ある実施形態では、抗原結合フラグメントを含む抗原結合フラグメントまたは抗体は、RANKLへのRANK結合、続いて起こるシグナル伝達現象を防止または阻害する。ある実施形態では、抗原結合フラグメントは、ヒトRANKLの生物学的活性に、特異的に結合するおよび／または阻害または調節する。

【0074】

用語「抗原」は、抗体等の選択的結合剤によって結合され得る、およびさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を生成するために、動物において、使用され得る分子または分子の一部を言う。抗原は、1つまたはそれを超えるエピトープを有してもよい。

【0075】

用語「エピトープ」は、イムノグロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合し得る任意の決定要因、好ましくはポリペプチド決定要因を含む。エピトープは、抗体によって結合された抗原の領域である。ある実施形態では、エピトープ決定要因は、アミノ酸、糖鎖、ホスホリルまたはスルホニル等の分子の化学的に活性なサーフェスグルーピングが挙げられ、ある実施形態では、特異的な三次元構造特徴および／または特異的荷電特性を有してもよい。ある実施形態では、抗体は、タンパク質および／またはマクロ分子の混合物中でその標的抗原を優先的に認識すると、抗原を特異的に結合すると言われる。抗体は、平行解離定数が $\leq 10^{-7}$ または 10^{-8} Mで、抗原を特的に結合すると言われている。いくつかの実施形態では、平行解離定数は、 $\leq 10^{-9}$ Mまたは $\leq 10^{-10}$ Mであってもよい。

【0076】

ある実施形態では、本明細書に記載されるような抗体およびその抗原結合フラグメントは、それぞれ、CDRにサポートを提供し、互いに関連するCDRの空間的な関係を規定する、重鎖と軽鎖との間のフレームワーク領域(FR)セットに挟まれる重鎖および軽鎖CDRセットを含む。本明細書で使用される用語「CDRセット」は、重鎖V領域または軽鎖V領域の3つの高頻度可変領域を言う。これらの領域を、重鎖または軽鎖のN末端から進んで、それぞれ、「CDR1」、「CDR2」および「CDR3」と表す。したがって、抗原結合部位は、重鎖V領域および軽鎖V領域のいずれかからのCDRセットを含む、6つのCDRを含む。単一CDR(たとえば、CDR1、CDR2またはCDR3)を含むポリペプチドを、本明細書では、「分子認知ユニット」と言う。多数の抗原-抗体複合体の結晶学的分析は、CDRのアミノ酸残基が、結合抗原との広範囲な接触を形成することを実証し、ここで、最も広い抗原接触は、重鎖CDR3とのものである。したがって、分子認知ユニットは、主として、抗原結合部位の特異性の原因である。

【0077】

本明細書で使用される用語「FRセット」は、重鎖V領域または軽鎖V領域のCDRセットのCDRを形作る4つのフランキングアミノ酸配列を言う。いくつかのFR残基は、結合抗原と接触してもよいが、FRは主として、V領域を、抗原結合部位、特にCDRに直接隣接するFR残基に折り畳む原因となる。FR内では、あるアミノ残基およびある構造的特徴が非常に高く保存される。この点に関し、全てのV領域配列は、約90個のアミ

ノ酸残基の内部ジスルフィドループを含む。V領域が結合部位に折り畳まれると、CDRは、抗原結合表面を形成する、突き出たループモチーフとして表示される。CDRループの折り畳まれた形を、正確なCDRアミノ酸配列に関係なく、ある「規範的」構造にする、FRの保存された構造領域が存在することが一般的に認識されている。さらに、あるFR残基は、抗体重鎖および軽鎖の相互反応を安定化する非共役ドメイン間接触に関与することが知られている。

【0078】

イムノグロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabat, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第4編、US Department of Health and Human Services. 1987、およびそのアップデート、現在インターネットで入手可能 (immuno.bme.nwu.edu) を参照して決定してもよい。

【0079】

「モノクローナル抗体」は、均一な抗体集団を言い、ここで、モノクローナル抗体は、エピトープの選択的結合に関与するアミノ酸（天然型および非天然型）で構成される。モノクローナル抗体は、高特異的で、単一エピトープに対して向けられている。用語「モノクローナル抗体」は、無処理のモノクローナル抗体および全長モノクローナル抗体ばかりでなく、そのフラグメント（たとえば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv）、単一鎖（ScFv）、その改変体、抗原結合部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、および必要な特異性およびエピトープに結合する能力の抗原結合フラグメント（エピトープ認知部位）を含む他のイムノグロブリン分子の修飾構成体のいかなるものも包含する。抗体の供給源または（たとえば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、遺伝子導入動物、その他によって）それを作製する方法に関して、限定するものではない。該用語は、全イムノグロブリン、および「抗体」の定義の下に、先に記載したフラグメント等も含む。

【0080】

タンパク質分解酵素パパインは、IgG分子を優先的に切断して数種のフラグメントを生成し、その2つ（F(ab)フラグメント）は、それぞれ、無処理の抗原結合部位を含む共有結合性ヘテロ二量体を含む。酵素ペプシンは、IgG分子を切断して、両抗原結合部位を含むF(ab')₂フラグメントを始めとする、数種のフラグメントを提供することができる。本発明のある実施形態による使用のためのFvフラグメントは、IgM、まれにIgGまたはIgAイムノグロブリン分子の優先的タンパク質切断によって生成することができる。しかし、Fvフラグメントは、当該分野で公知の組換え技術を使用して誘導することがより一般的である。Fvフラグメントとして、多くの抗原認知および生来の抗体分子の結合性能を保持する抗原結合部位を含む、非共有結合V_H::V_Lヘテロ二量体を含む。Inbarら（1972）Proc. Nat. Acad. Sci. USA、69:2659-2662、Hochmanら（1976）Biochem 15:2706-2710、およびEhrlichら（1980）Biochem 19:4091-4096。

【0081】

ある実施形態では、単一鎖FvまたはscFv抗体を検討する。たとえば、カップパ体（Illら、Prot. Eng. 10:949-57（1997）、ミニボディ（Martinら、EMBO J 13:5305-9（1994）、二重特異性抗体（Holligerら、PNAS 90:6444-8（1993）、またはジャヌシン（Traunecckerら、EMBO J 10:3655-59（1991）およびTraunecckerら、Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52（1992）を、所望の特異性を持つ抗体の選択に関して本願の教示に従って、標準の分子生物学的技術を使用して調製してもよい。さらに他の実施形態では、本開示のリガンドを包含する二重特異性またはキメラ抗体を生成してもよい。たとえば、キメラ抗体は、CDRと、異なる抗体からのフレームワーク領域とを含んでもよく、一方、1つの結合ドメインを介してRAN

K Lに、および第2の結合ドメインを介して第2の分子に特異的に結合する二重特異性抗体を生成してもよい。これらの抗体は、組換え分子生物学的技術によって生成してもよいし、または物理的に一緒に組み合わせてもよい。

【0082】

単一鎖Fv (sFv) ポリペプチドは、ペプチドコード化リンカーによって連結されたV_H—およびV_L—コード化遺伝子を含む遺伝子融合から発現される、共有結合的に連結されたV_H::V_Lヘテロ二量体である。Hustonら(1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883。抗体V領域から自然に凝集した(しかし化学的に分離された)軽および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造に実質的に類似する、3次元構造に折り畳まれるであろうsFv分子に変換するため、化学構造を見分ける多数の方法が記載されている。たとえば、以下を参照のこと。米国特許第5,091,513号および第5,132,405号、Hustonら、および米国特許第4,946,778号、Ladnerら。

【0083】

ある実施形態では、本明細書に記載されるようなRANKL結合抗体は、二重特異性抗体の形態をしている。二重特異性抗体は、ポリペプチドの多量体であり、各ポリペプチドは、イムノグロブリン軽鎖の結合領域を含む第1ドメインと、イムノグロブリン重鎖の結合領域を含む第2ドメインとを含み、該2つのドメインは連結されている(たとえば、ペプチドリンカーによって)が、互いに一体となり抗原結合部位を形成することができない。抗原結合部位は、多量体内の1つのポリペプチドの第1ドメインと、該多量体内の他のポリペプチドの第2ドメインとの一体化によって形成される(WO94/13804)。

【0084】

抗体のdAbフラグメントは、VHドメインで構成される(Ward, E. S. ら、Nature 341, 544-546 (1989))。

【0085】

二重特異性抗体が使用される場合、これらは、従来の二重特異性抗体であってもよく、種々の方法(Holliger, P. およびWinter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993))で製造することができる。たとえば、化学的に、または複合型ハイブリドーマから、あるいは先に記載した二重特異性抗体フラグメントの任意のものから調製してもよい。二重特異性抗体およびscFvは、可変ドメインだけを使用してFc領域なしで構築することができ、抗イディオタイプの影響を減らすことができる。

【0086】

二重特異性全抗体に反するような二重特異性抗体は、簡単に構築され、大腸菌で発現するので、これらも、特に有用であり得る。適切な結合特異性の二重特異性抗体(および抗体フラグメント等の多くの他のポリペプチド)は、ファージディスプレイ(WO94/13804)を使用して、ライブラリから簡単に選択することができる。たとえば、二重特異性抗体の1つのアームが、抗原Xに対して向けられた特異性で一定に保たれる場合、ライブラリは、他のアームが変更され、適切な特異性の抗体が選択されると、作ることができる。二重特異性全抗体は、ノーブール技術により生成してもよい(J. B. B. Ridgewayら、Protein Eng., 9, 616-621, 1996)。

【0087】

ある実施形態では、本明細書に記載される抗体は、UniBody(登録商標)の形態で提供されてもよい。UniBody(登録商標)は、除去されたヒンジ領域を持つIgG4抗体である(GenMab Utrecht, The Netherlands 参照、また、たとえば、US20090226421も参照)。この独自の抗体技術は、現在の小抗体フォーマットより長い、予測された治療可能窓を持つ、安定で、より小さな抗体フォーマットを造りだす。IgG4抗体は、不活性で、したがって免疫系と相互作用しないと考えられる。全ヒトIgG4抗体は、抗体のヒンジ領域を排除することにより変性し、対応する無処理のIgG4に対して、特徴的な安定性特性を持つ半分子フラグメントを

得てもよい (GenMab、Utrecht)。IgG 4 分子の半減化により、同族抗原 (たとえば、疾患標的) に結合することができる UniBody (登録商標) の 1 領域しか残らないので、UniBody (登録商標) は、標的細胞上の 1 部位のみに一価で結合する。ある癌細胞表面抗原に関して、この一価結合は、同じ抗原特異性を持つ二価抗体を使用する場合に見られ得るような癌細胞増殖を刺激しないので、UniBody (登録商標) 技術は、従来の抗体による処置では治りにくいある種類の癌の処置選択肢に寄与し得る。小サイズの UniBody (登録商標) は、ある型の癌を処置する場合、非常に役立つことができ、より大きな固体腫瘍に対して分子をより良好に分布させ、効能を増加させる可能性がある。

【0088】

ある実施形態では、本開示の抗体は、ナノボディの形態を取ってもよい。Nanobodies (登録商標) は、単一遺伝子によってコード化され、ほとんど全ての原核および真核宿主、たとえば、大腸菌 (たとえば、米国特許第 6, 765, 087 号参照)、カビ (たとえば、Aspergillus または Trichoderma) および酵母 (たとえば、Saccharomyces、Kluyvermyces、Hansenula または Pichia (たとえば、米国特許第 6, 838, 254 号参照) で効果的に生成される。生成過程は大規模化することができ、数キログラムの量のナノボディを生産している。Nanobodies (登録商標) は、長い貯蔵有効期間を有する、すぐに使える溶液として処方してもよい。Nanoclone (登録商標) 方法 (たとえば、WO 06/079372 参照) は、B 細胞の自動高処理選択に基づく、所望の標的に対して Nanobodies (登録商標) を生成する独自方法である。

【0089】

ある実施形態では、本明細書に開示されるような抗 RANKL 抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト化されている。これを、キメラ分子と言い、一般的に組換え技術を使用して調製され、非ヒト種のイムノグロブリンに由来する抗原結合部位、およびヒトイムノグロブリンの構造および/または配列に基づく分子の残存イムノグロブリン構造を有する。抗原結合部位は、可変ドメインにおいて、定常ドメインに融合する完全可変ドメイン、または適切なフレームワーク領域にグラフトする CDR のみを含んでもよい。エピトープ結合部位は、野生型でも、1 またはそれを超えるアミノ酸置換で修飾されてもよい。これにより、ヒト個体において、免疫原として定常領域が排除されるが、外来性可変領域への免疫応答の可能性は残る (LoBuglio, A. F. ら、(1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:4220-4224、Queen ら、PNAS (1988) 86:10029-10033、Riechmann ら、Nature (1988) 332:323-327)。本明細書で開示する抗 RANKL 抗体のヒト化の例示的方法として、米国特許第 7, 462, 697 号に記載された方法が挙げられる。本発明のある実施形態による例示的ヒト化抗体は、配列番号: 9、10、19、20 および 226~232 で表されるヒト化配列を含む。

【0090】

他のアプローチでは、ヒト由来定常領域上だけでなく、可変領域を、修飾することおよびヒト型にできるだけ近くに作り直すように修飾することにも焦点を当てる。重鎖および軽鎖の両方の可変領域には、問題のエピトープへの応答が異なり、結合性能を決定する、3 つの相補性決定領域 (CDR) (これらは、ある種においては比較的保存され、CDR の足場材料を提供すると推定される 4 つのフレームワーク領域 (FR) によって隣接されている) が含まれていることが知られている。非ヒト抗体を特定のエピトープに应答して調製する場合、可変領域は、修飾すべきヒト抗体に存在する FR 上の非ヒト抗体に由来する CDR をグラフト化することによって、「作り直す」または「ヒト化」することができる。これらのアプローチの種々の抗体への適用は、以下に報告されている。Sato K. ら、(1993) Cancer Res 53:851-856、Riechmann L. ら、(1988) Nature 332:323-327、Verhoeyen M. ら (1988) Science 239:1534-1536、Kettlebor

ough C. A. ら (1991) Protein Engineering 4: 773-3783、Maeda H. ら、(1991) Human Antibodies Hybridoma 2: 124-134、Gorman S. D. ら (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 4181-4185、Tempest P. R. ら (1991) Bio/Technology 9: 266-271、Co M. S. ら、(1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 2869-2873、Carter P. ら、(1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-4289、および Co M. S. ら (1992) J Immunol 148: 1149-1154。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、全ての CDR 配列 (たとえば、マウス抗体からの 6 個全ての CDR を含むヒト化マウス抗体) を保存する。他の実施形態では、ヒト化抗体は、本来の抗体に関して変更された 1 個またはそれを超える CDR (1、2、3、4、5、または 6 個) を有し、本来の抗体からの 1 個またはそれを超える CDR 「に由来する」 1 個またはそれを超える CDR とも言う。

10

【0091】

ある実施形態では、本開示の抗体は、キメラ抗体であってもよい。この点に関し、キメラ抗体は、異なる抗体の異種 Fc 部分に動作可能に連結されたまたは融合された抗 RANKL 抗体の抗原結合フラグメントで構成されている。ある実施形態では、異種 Fc ドメインはヒト起源のものである。他の実施形態では、異種 Fc ドメインは、IgA (サブクラス IgA1 および IgA2 を含む)、IgD、IgE、IgG (サブクラス IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 を含む)、および IgM を含む親抗体からの異なる Ig クラスを形成してもよい。さらなる実施形態では、異種 Fc ドメインは、1 またはそれを超える異なる Ig クラスからの CH2 および CH3 ドメインで構成されてもよい。ヒト化抗体に関して先に記載したように、キメラ抗体の抗 RANKL 抗原結合フラグメントは、本明細書に記載される抗体の 1 またはそれを超える CDR のみを含んでもよく (たとえば、本明細書に記載される抗体の CDR の 1、2、3、4、5 または 6 個)、または可変ドメイン全体 (VL、VH または両方) を含んでもよい。

20

【0092】

ある実施形態では、RANKL 結合抗体は、本明細書に記載される抗体の 1 個またはそれを超える CDR を含む。この点に関し、所望の特異的結合を保持しながら、抗体の VH CDR3 だけの転移を行うことができることがあることが示されている (Barbas ら、PNAS (1995) 92: 2529-2533)。また、McLane ら、PNAS (1995) 92: 5214-5218、Barbas ら、J. Am. Chem. Soc. (1994) 116: 2161-2162 も参照。

30

【0093】

Marks ら (Bio/Technology、1992、10: 779-783) には、可変ドメイン領域の 5' 末端に向かうまたはこれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒト VH 遺伝子の第 3 フレームワーク領域へのコンセンサスプライマーと共に使用して、CDR3 が欠乏した VH 可変ドメインのレパートリーを得る、抗体可変ドメインのレパートリーを生成する方法が記載されている。Marks らは、さらに、このレパートリーをどのようにして特定の抗体の CDR3 と組み合わせるかについても記載する。類似した技術を使用して、本明細書で記載する抗体の CDR3 由来配列を、CDR3 が欠乏した VH または VL ドメインのレパートリー、および同族 VL または VH ドメインと組み合わせられた、シャッフルされた完全 VH または VL ドメインとシャッフルして、RANKL を結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを得てもよい。次いで、レパートリーを、WO92/01047 のファージディスプレイシステム等の適した宿主システムにおいて、適した抗体またはその抗原結合フラグメントが選択されるように、表示してもよい。レパートリーは、少なくとも約 10^4 個の個々のメンバー、上は数桁の大きさ、たとえば、約 $10^6 \sim 10^8$ 個、または 10^{10} 個もしくはそれを超えるメンバーで構成されてもよい。類似のシャッフルまたは組み合わせ技術は、 β -ラクタム分解酵素遺伝子に関する技術

40

50

を記載するが、該アプローチは抗体の生成のために使用されたことを認める、Stemmer (Nature、1994、370:389-391)にも開示されている。

【0094】

さらなる代替案は、1またはそれを超える選択されたVHおよび／またはVL遺伝子のランダム変異誘発を使用して、本明細書で記載する本発明の実施形態の1またはそれを超えるCDR-由来配列を持つ、新規なVHまたはVL領域を生成し、可変ドメイン全体の中に変異を造り出すことである。そのような技術は、間違いやすいPCRを使用した、Gramらが記載する(1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:3576-3580)。使用してもよい他の方法は、VHまたはVL遺伝子のCDR領域への変異誘発を示すものである。そのような技術は、Barbasら(1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:3809-3813)およびSchierら(1996、J. Mol. Biol. 263:551-567)によって開示される。

10

【0095】

ある実施形態では、本明細書に記載される抗体の特異的VHおよび／またはVLは、RANKLへの大きな親和性のような、所望の特性を持つ抗体を同定するために、相補的な可変ドメインのライブラリをスクリーニングするために、使用してもよい。そのような方法は、たとえば、Portolanoら、J. Immunol. (1993) 150:880-887、Clarksonら、Nature (1991) 352:624-628に記載されている。

20

【0096】

RANKLへの結合等の所望の結合活性を有する抗体を同定するために、CDRを混合し対応させる他の方法を使用してもよい。たとえば、Klimkaら、British Journal of Cancer (2000) 83:252-260は、マウスVLおよびマウスVHからの保持されたCDR3およびFR4を持つヒトVHライブラリを使用してスクリーニングする手順を記載する。抗体を得た後、VHをヒトVLライブラリに対してスクリーニングし、抗原を結合した抗体を得る。Beiboerら、J. Mol. Biol. (2000) 296:833-849は、マウス重鎖全体とヒト軽鎖ライブラリとを使用するスクリーニング手順を記載する。抗体を得た後、1つのVLを、マウスのCDR3を保持したヒトVHライブラリと組み合わせた。抗原を結合することができる抗体が得られた。Raderら、PNAS (1998) 95:8910-8915は、先に記載したBeiboerらと類似する手順を記載する。

30

【0097】

これらの正式に記載した技術は、それ自体、当該分野で公知である。しかし、当業者は、当該分野で日常的方法を使用し、本明細書に記載される本発明のいくつかの実施形態による、抗体またはその抗原結合フラグメントを得るために、前記技術を使用することができる。

【0098】

本明細書では、RANKL抗原に特異的な抗体抗原結合ドメインを得る方法も開示する。該方法は、本明細書で提示されるVHドメインのアミノ酸配列において、1個またはそれを超えるアミノ酸の付加、削除、置換または挿入により、VHドメインのアミノ酸配列改変体であるVHドメインを提供することと、場合によっては、このように生成したVHドメインを1またはそれを超えるVLドメインと組み合わせることと、VHドメインまたはVH/VL混合物あるいは複数の混合物を試験して、特異的結合メンバー、またはRANKLに特異的な抗体抗原結合ドメインを、場合によっては1またはそれを超える所望の特性とともに同定することを含む。VLドメインは、本明細書で実質的に表したアミノ酸配列を有してもよい。本明細書で開示するVLドメインの1またはそれを超える配列改変体を、1またはそれを超えるVHドメインと組み合わせた類似の方法を使用してもよい。

40

【0099】

50

抗体またはポリペプチドに「特異的に結合する」または「優先的に結合する」（本明細書で交換可能に使用される）エピトープは、当該分野でより理解されている用語であり、そのような特異的または優先的結合を決定する方法も当該分野で周知である。分子は、特定の細胞または物質と、それが代わりの細胞または物質と反応または会合する場合と比べて、より頻度が高く、より迅速に、より長い時間および／またはより大きな親和性で反応または会合する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと言われる。抗体は、他の物質との結合とに比べて、標的により大きな親和性で、結合活性で、より簡単に、および／またはより長い時間結合する場合、「特異的に結合する」または「優先的に結合する」。たとえば、RANKLエピトープに特異的にまたは優先的に結合する抗体は、それが他のRANKLエピトープまたは非RANKLエピトープに結合する場合に比べて、1つのRANKLエピトープに、より大きな親和性で、結合活性で、より容易に、および／またはより長い時間結合する抗体である。この定義を読むことによって、たとえば、第1標的に特異的にまたは優先的に結合する抗体（または部分やエピトープ）は、第2標的には特異的にまたは優先的に結合してもしなくてもよいことも理解される。このように、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも独占的結合である必要はない（含み得るが）。そうとは限らないが、一般的に、結合の記載は、優先的結合を意味する。

【0100】

免疫学的結合は、一般的に、イムノグロブリン分子と抗原との間に起こり、たとえば、静電的、イオンの、親水性および／または疎水性引力または反発、立体力、水素結合、ファンデルワールス力、および他の相互作用（これらは説明的なもので、これらに限定されない）の結果によりイムノグロブリンが特異的である種類の非共有結合相互作用を言う。免疫学的結合相互作用の強さまたは親和性は、相互作用の解離定数（ K_d ）によって表すことができ、 K_d が小さいほど親和性は大きい。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該分野で周知の方法を使用して定量化することができる。そのような方法の1つは、抗原結合部位／抗原複合体の形成および解離の速度の測定を必要とし、ここで、該速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向において速度に同じように影響する幾何学的パラメータに依存する。したがって、「結合速度定数」（ K_{on} ）および「解離速度定数」（ K_{off} ）の両方は、濃度の計算、ならびに結合および解離の実際の速度によって決定することができる。 K_{off}/K_{on} 比は、親和性に関連しない全てのパラメータの取消しを可能にし、したがって、解離定数 K_d と同じである。一般的には、Daviesら（1990）Annual Rev. Biochem. 59: 439-473を参照。

【0101】

ある実施形態では、本明細書に記載される抗RANKL抗体の親和性は、約100、150、155、160、170、175、180、185、190、191、192、193、194、195、196、197、198または199ピコモルであり、いくつかの実施形態では、抗体は、RANKLに関してさらに高い親和性を有してもよい。

【0102】

エピトープに関して、用語「免疫学的に活性」または「残存免疫学的に活性」は、抗体（たとえば、抗RANKL抗体）の、異なる条件下での、たとえばエピトープが還元または変性条件を受けた後、該エピトープに結合する能力を言う。

【0103】

本願のある好ましい実施形態による抗体またはその抗原結合フラグメントは、（i）抗原に特異的に結合し、かつ（ii）本明細書で開示するVHおよび／またはVLドメイン、または本明細書で開示するVHCDR3、またはこれらの任意の改変体を含む、本明細書に記載される任意の抗体と、RANKLへの結合に関し、競合するものであってもよい。抗体間での競合は、たとえば、ELISAを使用しておよび／または特異的リポーター分子の、他の標識化されていない抗体の存在下で検出することができる1抗体へのタグ付けによって、同じエピトープまたは重なりあうエピトープを結合する特異的抗体の同定を可能にすることによって、簡単にインビトロでアッセイしてもよい。したがって、本明細

書では、本明細書に記載される、RANKLに結合する抗体と競合するヒト抗体抗原結合部位を含む、特異的抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0104】

この点に関し、本明細書で使用される用語「と競合する」「結合を阻害する」、および「結合を妨害」（たとえば、RANKへのRANKLの結合の阻害／妨害、またはRANKLへの抗RANKL抗体の結合の阻害／妨害を参照）は、変更可能に使用され、部分的なおよび完全な阻害／妨害を包含する。RANKへのRANKL結合の阻害／妨害は、阻害または妨害なしでRANKLがRANKに結合した時に起こる細胞シグナル伝達の正常なレベルまたはタイプを減らすまたは変えることが好ましい。阻害および妨害は、ここで開示するような抗RANKL抗体と接触した時、抗RANKL抗体と接触していないRANKLと比べて、RANKへのRANKLの結合において、いかなる測定可能な減少も含むものであり、たとえば、RANKへのRANKL結合は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%妨害される。

10

【0105】

イムノグロブリンの定常領域は、可変領域より少ない配列多様性を示し、重要な生化学的事象を誘発するために、多数の天然タンパク質結合に関与する。ヒトにおいては、IgA（サブクラスIgA1およびIgA2を含む）、IgD、IgE、IgG（サブクラスIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む）、およびIgMを含む、5つの異なる抗体のクラスが存在する。これらの抗体クラスの間の際立った特徴は、より微妙な違いがV領域に存在するが、それらの定常領域である。

20

【0106】

抗体のFc領域は、多数のFc受容体およびリガンドと相互作用し、エフェクター機能と言われる重要な機能的性能のアレイを与える。IgGに関し、Fc領域は、Igドメイン、CH2およびCH3、ならびにCH2に続くN-末端ヒンジを含む。IgGクラスのFc受容体の重要なファミリーは、Fcガンマ受容体（FcγR）である。これらの受容体は、抗体と免疫系の細胞アームとの間の情報交換を媒介する（Raghavanら、1996、Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220、Ravetchら、2001、Annu Rev Immunol 19:275-290）。ヒトにおいて、このタンパク質ファミリーは、FcγRI（CD64）、たとえば、イソ型FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIc、FcγRII（CD32）、たとえば、イソ型FcγRIIa（たとえば、アロタイプH131およびR131）、FcγRIIb（たとえば、FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2）およびFcγRIIc、ならびに、FcγRIII（CD16）、たとえば、イソ型FcγRIIIa（たとえば、アロタイプV158およびF158）およびFcγRIIIb（たとえば、アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2）が挙げられる（Jefferysら、2002、Immunol Lett 82:57-65）。これらの受容体は、典型的には、Fcへの結合を媒介する細胞外ドメイン、膜架橋領域、および細胞内のあるシグナル伝達事象を媒介する細胞内ドメインを有する。これらの受容体は、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、肥満細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびT細胞を始めとする、様々な免疫細胞中で発現する。Fc/FcγR複合体の形成により、これらのエフェクター細胞は、結合した抗原の部位に補充され、典型的には、細胞内のシグナル伝達事象、および続いて起こる重要な免疫応答、たとえば、炎症メディエーターの放出、B細胞の活性化、エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、および細胞毒性攻撃を起こす。

30

40

【0107】

細胞障害性および食作用性エフェクター機能を媒介する能力は、抗体が標的細胞を破壊する可能性のあるメカニズムである。FcγRを発現する非特異的細胞障害性細胞が、標的細胞上の結合した抗体を認識し、次いで標的細胞の溶解を起こす細胞媒介反応を、抗体

50

依存性細胞媒介細胞障害性 (ADCC) と言う (Raghavanら、1996、Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220、Ghetieら、2000、Annu Rev Immunol 18:739-766、Ravetchら、2001、Annu Rev Immunol 19:275-290)。FcγRを発現する非特異的細胞障害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、次いで標的細胞の食作用を起こす細胞媒介反応を、抗体依存性細胞媒介食作用 (ADCP) と言う。全てのFcγRは、Fc上の同じ領域を、Cg2 (CH2) ドメインのN末端および先行するヒンジで結合する。この相互作用は、構造的によく特徴付けられ (Sondermannら、2001、J Mol Biol 309:737-749)、ヒトFcγRIIIbの細胞外ドメインへ結合するヒトFcのいくつかの構造は、解明されている (pdb登録コード1E4K) (Sondermannら、2000、Nature 406:267-273) (pdb登録コード1IISおよび1IIX) (Radaevら、2001、J Biol Chem 276:16469-16477)。

10

【0108】

異なるIgGサブクラスは、FcγRに関し、異なる親和性を有し、IgG1およびIgG3は、典型的には、IgG2およびIgG4より実質的に良好に受容体に結合する (Jefferysら、2002、Immunol Lett 82:57-65)。全てのFcγRは、異なる親和性で、IgG Fc上の同じ領域を結合する。すなわち、高親和性結合剤FcγRIは、IgG1に関しKdが 10^{-8} M^{-1} であり、一方、低親和性受容体FcγRIIおよびFcγRIIIは、一般に、それぞれ、 10^{-6} および 10^{-5} で結合する。FcγRIIIaおよびFcγRIIIbの細胞外ドメインは、96%同一であるが、FcγRIIIbは、細胞内シグナル伝達ドメインを有さない。さらに、FcγRI、FcγRIIIa/c、およびFcγRIIIaは、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ (ITAM) を有する細胞内ドメインを有することを特徴とする、免疫複合体が引き起こす活性化の陽性制御因子であるのに対し、FcγRIIIbは、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ (ITIM) を有し、したがって、阻害性である。したがって、前者を活性化受容体と言い、FcγRIIIbを阻害性受容体と言う。また、受容体は、発現パターンおよび異なる免疫系細胞におけるレベルが異なる。複雑さのさらに他のレベルは、ヒトプロテオームにおける多数のFcγR遺伝子多型の存在である。臨床的意義と特に関連のある遺伝子多型は、V158/F158 FcγRIIIaである。ヒトIgG1は、F158アロタイプより大きな親和性で、V158アロタイプに結合する。この親和性における違い、およびおそらくADCCおよび/またはADCPへのその効果は、抗CD20抗体リツキシマブ (IDEC製薬会社の登録商標であるRituxan (登録商標) の効能で、有意な決定要因であることが示されている。V158アロタイプの患者は、リツキシマブ処置に対し有利に応答するが、より低い親和性のF158アロタイプの患者はあまり応答しない (Carttronら、2002、Blood 99:754-758)。約10~20%のヒトがV158/V158ホモ接合型で、45%がV158/F158ヘテロ接合型で、35~45%のヒトがF158/F158ホモ接合型である (Lehrnbecherら、1999、Blood 94:4220-4232、Carttronら、2002、Blood 99:754-758)。したがって、80~90%のヒトが低い応答者であり、すなわち、F158 FcγRIIIaの少なくとも1つの対立遺伝子である。

20

30

40

【0109】

また、Fc領域は、補体カスケードの活性化に関与する。古典的補体経路では、C1は、C1qサブユニットとともに、抗原 (複数を含む) との複合体を形成しているIgGまたはIgMのFcフラグメントに結合する。本発明のある実施形態では、Fc領域への修飾は、本明細書に記載されるようなRANKL特異的抗体の、補体システムを活性化する能力を変更する (増強するまたは減らす) 修飾が含まれる (たとえば、米国特許第7, 740, 847号参照)。補体活性化を評価するために、補体依存性細胞障害性 (CDC) アッセイを行ってもよい (たとえば、Gazzano-Santoroら、J. Immu

50

n o l . M e t h o d s , 2 0 2 : 1 6 3 (1 9 9 6) 参照)。

【0110】

したがって、ある実施形態では、本発明は、変えられた機能的特性、たとえば、減少または増強されたCDC、ADCCまたはADCP活性、または特異的FcγRに関する増強された結合親和性、または増加した血清半減期を持つ修飾Fc領域を有する抗RANKL抗体を提供する。本明細書で検討する他の修飾Fc領域は、たとえば、発行された米国特許第7,317,091号、第7,657,380号、第7,662,925号、第6,538,124号、第6,528,624号、第7,297,775号、第7,364,731号、米国公開公報US2009092599号、US20080131435号、US20080138344号、および国際公開公報WO2006/105338号、WO2004/063351号、WO2006/088494号、WO2007/024249に記載されている。

10

【0111】

したがって、ある実施形態では、所望の結合特異性を持つ抗体可変ドメインは、イムノグロブリン定常ドメイン配列に融合する。ある実施形態では、融合は、ヒンジ、C_H2およびC_H3領域の少なくとも一部を含むIg重鎖定常ドメインによる。融合物の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1重鎖定常領域(C_H1)を有することが好ましい。イムノグロブリン重鎖融合物および、望ましい場合は、イムノグロブリン軽鎖をコード化するDNAは、別の発現ベクターに挿入され、適した宿主細胞に共遺伝子導入される。これにより、構築において使用される3種のポリペプチド鎖の不均等な比率が、所望の二重特異性抗体の最適収率を提供した場合、実施形態において3種のポリペプチドフラグメントの相互比率の調整において、より大きな柔軟性が提供される。しかし、少なくとも2種のポリペプチド鎖の同じ比率での発現が高い収率となる、または比率が所望の鎖の組み合わせの収率に有意な影響を与えない場合、2種または3種全部のポリペプチド鎖のコード化配列を単一発現ベクターに挿入することができる。

20

【0112】

本発明の抗体（ならびにその抗原結合フラグメントおよび改変体）は、たとえば、精製または診断用途に使用するために、エピトープタグまたは標識を含むように修飾されてもよい。抗体複合体を作るために、当該分野で知られている多くの連結基があり、たとえば、米国特許第5,208,020号、欧州特許第0425235B1号、およびChariら、Cancer Research 52:127-131(1992)に開示されるものが挙げられる。連結基として、先に記載した特許に開示されるような、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸性感応基、感光性基、ペプチダーゼ感応基、またはエステラーゼ感応基が挙げられ、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。

30

【0113】

他の検討した実施形態では、本明細書に記載されるようなRANKL特異的抗体は、他の治療化合物と複合または動作可能に連結されてもよく、これらを本明細書では複合物と言う。複合物は、細胞殺傷薬、化学療法薬、サイトカイン、血管新生阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、または毒素、放射性同位体、または他の治療的活性剤であってもよい。化学療法薬、サイトカイン、血管新生阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、および他の治療薬は、先に記載され、これらの先に記載した薬剤の全てに、抗体複合物の用途がある。

40

【0114】

代替実施形態では、抗体は、毒素に複合または動作可能に連結され、毒素として、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素および酵素的に活性な毒素、およびそのフラグメントおよび／または改変体が挙げられるが、これらに限定されない。小分子毒素として、サポリン(Kuroda Kら、The Prostate 70:1286-1294(2010)、Lip WL.ら、2007 Molecular Pharmaceutics 4:241-251、Quadros EV.ら、2010 Mol Cancer Ther、9(11)、3033-40、Polito L.ら、2009 British Journal of Haematology、147、710-7

50

18)、カリケアマイシン、メイタンシン(米国特許第5,208,020号)、トリコセン、およびCC1065が挙げられるが、これらに限定されない。毒素として、RNase、ゲロニン、エンジン、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン、Pseudomonas 細菌外毒素(PE40)、赤痢菌毒素、Clostridium perfringens 毒素、およびヤマゴボウ抗ウィルスタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0115】

一実施形態では、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、1個またはそれを超えるマイタンシノイド分子に複合されている。マイタンシノイドは、チュブリン重合を阻害することによって作用するマイトトキシシン阻害剤である。マイタンシンは、東部アフリカの灌木Maytenus serrataから初めて単離された(米国特許第3,896,111号)。続いて、ある微生物もマイタンシノイドを生成することが発見され、たとえば、マイタンシノールおよびC-3マイタンシノールエステル類がある(米国特許第4,151,042号)。合成マイタンシノール、ならびにその誘導体および類縁体は、たとえば、米国特許第4,137,230号、第4,248,870号、第4,256,746号、第4,260,608号、第4,265,814号、第4,294,757号、第4,307,016号、第4,308,268号、第4,308,269号、第4,309,428号、第4,313,946号、第4,315,929号、第4,317,821号、第4,322,348号、第4,331,598号、第4,361,650号、第4,364,866号、第4,424,219号、第4,450,254号、第4,362,663、および第4,371,533号に開示されている。マイタンシノイドを含む免疫複合物、およびそれらの治療的用途は、たとえば、米国特許第5,208,020号および第5,416,064号、欧州特許第0425235B1号、ヒト大腸癌に対して向けられたモノクローナル抗体C242に連結されたマイタンシノイド指定DM1を含む免疫複合物を記載する、Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996)に開示されている。複合物は、培養された大腸癌細胞に対して高い細胞障害性が見いだされ、インビボ腫瘍増殖アッセイで、抗腫瘍活性を示した。

【0116】

抗体-マイタンシノイド複合物は、抗体またはマイタンシノイド分子のいずれかの生物学的な活性を有意に減少することなく、抗体をマイタンシノイド分子に化学的に連結することにより調製される。毒素/抗体の1個の分子であっても、裸の抗体を使う場合を上回って、細胞障害性を増強することは期待されるが、抗体分子1個当たり平均で3~4個のマイタンシノイド分子が複合しているものは、抗体の機能または溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞の細胞障害性の増強において効力を示している。マイタンシノイドは、当該分野で周知であり、公知の技術により合成、または天然源から単離することができる。適したマイタンシノイドが、たとえば、米国特許第5,208,020号、ならびに、本明細書で先に記載した他の特許公報および非特許刊行物に開示されている。好ましいマイタンシノイドは、マイタンシノール、および芳香環において、または種々のマイタンシノールエステル類等のマイタンシノール分子の他の位置で修飾されているマイタンシノール類縁体である。

【0117】

関心のある他の複合物は、1個またはそれを超えるカリケアマイシン分子に複合した抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、サブピコモル濃度で、二重鎖DNA切断を作ることができる。カリケアマイシンの構造類縁体も使用してよい(Hinmanら、1993、Cancer Research 53:3336-3342、Lodeら、1998、Cancer Research 58:2925-2928)(米国特許第5,714,586号、米国特許第5,712,374号、米国特許第5,264,586号、米国特許第5,773,001号)。オーリスタチンE(AE)およびモノメチルオーリスタチンE(MMAE)等のドラスタチン10類縁体は、現在開示されてい

る抗体またはその改変体の複合物としての用途があり得る (Doroninaら、2003、Nat Biotechnol 21 (7) : 778-84、Franciscoら、2003 Blood 102 (4) : 1458-65)。有用な酵素的に活性な毒素として、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、菌体外毒素A鎖 (Pseudomonas aeruginosaから)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、アルファーサルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアチンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エコマイシンおよびトリコテセンが挙げられるが、これらに限定されない。たとえば、国際公開WO93/21232を参照のこと。本開示は、さらに、複合物または融合物が、本明細書に記載されるようなRANKL特異的抗体と、核酸分解活性を持つ化合物、たとえば、リボヌクレアーゼまたはデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) 等のDNAエンドヌクレアーゼとの間に形成する実施形態も検討する。

10

【0118】

代替実施形態では、本明細書で開示する抗体は、放射性同位体に複合または動作可能に連結し、放射性複合物を形成してもよい。種々の放射性同位体は、放射性複合抗体の製造で使用可能である。例として、 ^90Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At および ^{212}Bi が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0119】

本明細書に記載される抗体は、ある他の実施形態では、細胞毒素 (たとえば、細胞分裂阻害剤または細胞殺傷剤)、治療薬または放射性元素 (たとえば、アルファ放射体、ガンマ放射体、等) 等の治療部分に複合してもよい。細胞毒素または細胞殺傷剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。例として、パクリタキセル/パクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、およびこれらの類縁体または同族体が挙げられる。細胞毒素の好ましい例の1つは、サボリン (Advanced Targeting Systems、San Diego、CAから入手可能) である。治療薬として、代謝拮抗薬 (たとえば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン)、アルキル化剤 (たとえば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロフォスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (たとえば、ダウノルビシン (以前は、ダウノマイシン) およびドキソルビシン)、抗生物質 (たとえば、ダクチノマイシン (以前は、アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC)、ならびに有糸分裂阻害薬 (たとえば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン) が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0120】

さらに、RANKL特異的抗体 (抗原結合フラグメント等の本明細書で提供するその機能的フラグメントを含む) は、ある実施形態では、放射性物質または大環状キレート化剤等の、放射性金属イオンを複合するのに有用な治療部分に複合されてもよい。ある実施形態では、大環状キレート化剤は、リンカー分子を介して抗体に結合することができる1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸 (DOTA) であり得る。そのようなリンカー分子は、当該分野で一般的に知られ、Denar

50

donら、1998、Clin Cancer Res. 4:2483-90、Petersonら、1999、Bioconj. Chem. 10:553、およびZimmermanら、1999、Nucl. Med. Biol. 26:943-50に記載されている。

【0121】

さらに別の実施形態では、抗体-受容体複合物を患者に投与し、続いて、清澄剤を使用して結合していない複合物を循環から除去し、次いで、細胞殺傷剤（たとえば、放射性ヌクリオチド）に複合化された「リガンド」（たとえば、アビジン）を投与する、腫瘍前ターゲティングにおいて利用するために、抗体を、「受容体」（たとえば、ストレプトアビジン）に複合してもよい。代替実施形態では、抗体依存性酵素媒介プロドラッグ治療（ADEPT）を使用するために、抗体を酵素に複合または動作可能に連結する。ADEPTは、プロドラッグ（たとえば、ペプチジル化学治療薬、国際公開WO81/01145号を参照）を活性抗癌剤に変換するプロドラッグ活性酵素に、抗体を複合または動作可能に連結することによって使用してもよい。たとえば、国際公開WO88/07378号および米国特許第4,975,278号を参照のこと。ADEPTに有用な免疫複合物の酵素成分として、酵素をより活性で細胞障害性のある形に変換するような方法で、プロドラッグ上で作用することができる任意の酵素が挙げられる。これらのおよび関連する実施形態の方法において有用な酵素として、リン酸塩含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ、硫酸塩含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ、非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤に変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ、5-フルオロウラシル、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なプロテアーゼ、たとえば、セラチアプロテアーゼ、テルモリシン、ズブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（たとえば、カテプシンBおよびL）、D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ、炭水化物切断酵素、たとえば、 β -ガラクトシダーゼおよびグリコシル化プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なノイラミミダーゼ（neuraminidase）、 α -ラクタムで誘導された薬物を遊離の薬物に変換するのに有用なベーターラクタマーゼ、およびそのアミン窒素で、それぞれ、フェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基により誘導された薬物を、遊離の薬物に変換するのに有用なペニシリンアミダーゼ、たとえば、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、当該分野では「アブザイム」としても知られる酵素活性を持つ抗体も、プロドラッグを活性薬に変換するために使用してよい（たとえば、Massey、1987、Nature 328:457-458参照）。抗体-アブザイム複合物は、アブザイムの腫瘍細胞集団への送達のために調製することができる。

【0122】

免疫複合物は、種々の2官能性タンパク質カップリング剤、たとえば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート（SPDP）、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの2官能性誘導体（たとえば、アジプイミド酸ジメチルHCL）、活性エステル（たとえば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（たとえば、グルタルアルデヒド（glutaredialdehyde））、ビス-アジド化合物（たとえば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（たとえば、ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（たとえば、トルエン2,6-ジイソシアネート）、およびビス-活性フッ素化合物（たとえば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を使用して作成してもよい。ジスルフィド連結を提供するための特別のカップリング剤として、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート（SPDP）（Carlssonら、Biochem. J. 173:723-737 [1978]）およびN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート（SPP）が挙げられる。リンカーは、1またはそれを超える切断可能な成分の脱離を促進する「切断可能なリンカー」であってもよ

10

20

30

40

50

い。たとえば、酸に不安的なリンカーを使用してもよい（Cancer Research 52:127-131 (1992)、米国特許第5,208,020号）。

【0123】

本明細書では、本発明の抗体（およびポリペプチド）の他の修飾も検討する。たとえば、抗体は、種々の非タンパク質性ポリマー、たとえば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールの共重合体の1つに連結されてもよい。また、抗体を、たとえば、コロイド薬物送達システム（たとえば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）、またはマイクロエマルジョン中で、コアセルベーション技術によってまたは界面重合（たとえば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル）によって調製されたマイクロカプセル中に封入してもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16編、Oslo、A.編、(1980)に開示されている。

【0124】

本明細書で使用する「担体」は、使用される薬用量および濃度で、担体に暴露される細胞または哺乳類に対し無毒性である、医薬的に許容され得る担体、賦形剤、または安定剤が挙げられる。生理的に許容され得る担体は、pH緩衝水溶液であることが多い。生理的に許容され得る担体の例として、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸等の緩衝液、アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子（約10残基未満の）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、またはイムノグロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン等のアミノ酸、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール、ナトリウム等の塩形成対イオン、および／または非イオン性界面活性剤、たとえばポリソルベート20（TWEEN（商標））、ポリエチレングリコール（PEG）、およびポロキサマー（PLURONICS（商標））等が挙げられる。

【0125】

抗RANKL抗体の所望の機能的特性は、インビトロまたはインビボモデルを使用し、当業者に公知の種々の方法、親和性／結合アッセイ（たとえば、表面プラズモン共鳴、競合阻害アッセイ）、細胞障害性アッセイ、細胞生存率アッセイ、RANKLに応答する細胞増殖または分化アッセイ（たとえば、Raw細胞アッセイまたは他の破骨細胞分化アッセイ）、骨密度アッセイ、骨喪失の阻害の測定、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）活性アッセイ等を使用して評価してもよい。他のアッセイでは、本明細書に記載される抗体の、破骨細胞の細胞分化および／または活性等の正常RANK／RANKL媒介応答を妨害する能力を試験してもよいし、または骨密度の喪失のインビボ阻害を試験してもよい。また、本明細書に記載される抗体のRANKL受容体内部移行、インビトロおよびインビボ効力等への効果を試験してもよい。そのようなアッセイは、当業者に知られた、確立したプロトコル（たとえば、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY)、Current Protocols in Immunology (編集: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY)、または市販のキットを使用して行ってもよい。

【0126】

本発明は、ある実施形態では、さらに、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合フラグメントをコード化する単離された核酸、たとえば、本明細書に記載されるようなCDR、VHまたはVLドメインをコード化する核酸を提供する。核酸は、DNAおよびRNAを含む。これらおよび関連実施形態は、本明細書に記載されるRANKLを結

合する抗体をコード化するポリヌクレオチドを含んでもよい。本明細書で使用される用語「単離ポリヌクレオチド」は、ゲノム、cDNAまたは合成起源またはこれらのある組合せのポリヌクレオチドを意味すべきで、その起源のせいで、単離ポリヌクレオチドは、(1) 単離ポリヌクレオチドが自然界で発見されるポリヌクレオチドの全部または一部と随伴しない、(2) 自然界ではそれが連結していないポリヌクレオチドに連結する、(3) より大きな配列の一部として自然界では起こらない。

【0127】

用語「動作可能に連結された」は、この用語が適用されている成分が、適した条件下で該成分の生来の機能を実施できるようにする関係にあることを意味する。たとえば、タンパク質コード化配列に「動作可能に連結」された転写制御配列は、制御配列の転写活性と互換性のある条件下で、タンパク質コード化配列の発現を達成できるように、タンパク質コード化配列に結合されている。

10

【0128】

本明細書で使用される用語「制御配列」は、それらが結合または動作可能に連結しているコード化配列の発現、プロセッシングまたは細胞内局在化に影響することができるポリヌクレオチド配列を言う。そのような制御配列の性質は、宿主生物に依存するかもしれない。特定の実施形態では、原核生物の転写制御配列は、プロモーター、リボソーム性結合部位、および転写終結配列を含んでもよい。他の特定の実施形態では、真核生物の転写制御配列は、転写因子用の1個または複数の認知部位を含むプロモーター、転写促進配列、転写終結配列、およびポリアデニル化配列を含んでもよい。ある実施形態では、「制御配列」は、リーダー配列および／融合パートナー配列を含むことができる。

20

【0129】

本明細書で言う用語「ポリヌクレオチド」は、一重鎖または二重鎖核酸ポリマーを意味する。ある実施形態では、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかの種類のヌクレオチド修飾形態であり得る。当該修飾としては、プロモウリジン等の塩基性修飾、アラビノシドおよび2', 3'-ジデオキシリボース等のリボース修飾、およびホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート (phosphoranilate)、およびホスホロアミデート等のヌクレオチド間連結修飾が挙げられる。用語「ポリヌクレオチド」は、特に、DNAの一重および二重鎖形態を含む。

30

【0130】

用語「天然型ヌクレオチド」として、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドが挙げられる。用語「修飾ヌクレオチド」は、修飾または置換糖基等を持つヌクレオチドを含む。用語「オリゴヌクレオチド連結」として、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデート等のオリゴヌクレオチド連結が挙げられる。たとえば、以下を参照のこと。LaPlancherら、1986、Nucleic Acids Res.、14:9081; Stecら、1984、J. Am. Chem. Soc.、106:6077; Steinら、1988、Nucleic Acids Res.、16:3209; Zonら、1991、Anti-Cancer Drug Design、6:539; Zonら、1991、OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH、pp. 87-108 (F. Eckstein、編集)、Oxford University Press、Oxford England; Stecら、米国特許第5,151,510; Uhlmann and Peyman、1990、Chemical Reviews、90:543; これらの開示は、任意の目的のため、参照により本明細書に組み込まれる。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドまたはそのハイブリッド形成の検出を可能にする、検出可能な標識を含むことができる。

40

【0131】

50

用語「ベクター」は、コード化情報を宿主細胞に転移するために使用される任意の分子（たとえば、核酸、プラスミド、またはウイルス）を言うのに使用される。用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適し、関心のある異種核酸配列の発現に向かうおよび／または制御する核酸配列を含むベクターを言う。発現として、イントロンが存在する場合、転写、翻訳、およびRNAスライシング等のプロセッシングが挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】

当業者に理解されるように、ポリヌクレオチドは、ゲノム配列、ゲノム外およびプラスミドコード化配列、およびより小さく設計された、発現する、遺伝子断片を含んでもよく、またはタンパク質、ポリペプチド、ペプチド等を発現するように適応させてもよい。そのようなセグメントは、自然に単離、または当業者によって合成的に修飾してもよい。

10

【0133】

また、当業者に認識されるように、ポリヌクレオチドは、一重鎖（コード化またはアンチセンス）でも、二重鎖でもよく、また、DNA分子（ゲノム、cDNA、または合成の）でも、RNA分子でもよい。RNA分子として、イントロンを含み、1対1でDNA分子と対応するhnRNA分子、およびイントロンを含まないmRNA分子が挙げられる。追加のコード化または非コード化配列は、必要ではないが、本開示によるポリヌクレオチド内に存在してもよく、ポリヌクレオチドは、必要ではないが、他の分子および／または支持材料に連結してもよい。ポリヌクレオチドは、生来の配列を含んでもよいし、そのような配列の改変体または誘導体をコード化する配列を含んでもよい。

20

【0134】

したがって、これらおよび関連実施形態によれば、本開示は、本明細書に記載される抗RANKL抗体をコード化するポリヌクレオチドも提供する。ある実施形態では、本明細書に記載されるような抗体をコード化するポリヌクレオチド配列のいくつかのまたは全てと、そのようなポリヌクレオチドの補体とを含むポリヌクレオチドが提供される。

【0135】

他の関連実施形態では、ポリヌクレオチド改変体は、本明細書に記載される抗RANKL抗体をコード化するポリヌクレオチド配列に実質的な同一性を有してもよい。たとえば、ポリヌクレオチドは、少なくとも70%の、好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%またはそれを超える配列同一性を含むポリヌクレオチドであってもよく、ここで、配列同一性は、参照ポリヌクレオチド配列、たとえば、本明細書に記載される抗体をコード化する配列と、本明細書に記載される方法（たとえば、以下に記載するような、標準パラメータを使用するBLAST分析）を使用して比較される。当業者は、コドン縮退度、アミノ酸類似性、読取り枠位置決め等を考慮に入れ、2つのヌクレオチド配列によって、コード化されたタンパク質の対応する同一性を決定するために、これらの値を適切に調整することができることを理解するだろう。

30

【0136】

典型的には、ポリヌクレオチド改変体は、1またはそれを超える置換、付加、削除および／または挿入を、好ましくは、改変体ポリヌクレオチドによりコード化された抗体の結合親和性を本明細書で特異的に表されたポリヌクレオチド配列によってコード化された抗体に対して、実質的に減少しないように含むだろう。

40

【0137】

ある他の関連実施形態では、ポリヌクレオチドフラグメントは、本明細書に記載されるような抗体をコード化する配列に同一のまたは相補的な配列の種々の長さの連続した伸長を含み、または本質的にこれらからなってもよい。たとえば、少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、

50

300、400、500または1000個またはそれを超える、およびこれら数字の間にある全ての中間長さの連続する、本明細書で開示する抗体またはその抗原結合フラグメントをコード化する配列のヌクレオチドを含むまたはこれらから本質的になるポリヌクレオチドが提供される。この文脈における「中間長さ」は、例示された数字の間にある任意の長さ、たとえば、50、51、52、53、その他、100、101、102、103、その他、150、151、152、153、等、200～500、500～1,000等の全ての整数を含むことは容易に理解されるだろう。本明細書で記載するようなポリヌクレオチド配列は、生来の配列にはない、付加的なヌクレオチドによって、一端または両端で伸長してもよい。この付加的配列は、本明細書に記載される抗体をコード化するポリヌクレオチドの一端、または本明細書に記載される抗体をコード化するポリヌクレオチドの両端に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のヌクレオチドで構成されてもよい。

10

【0138】

他の実施形態では、中程度から高いストリンジェンシー条件下で、本明細書で提供される抗体、その抗原結合フラグメント、そのフラグメント、またはその相補的な配列をコード化するポリヌクレオチド配列にハイブリッドし得るポリヌクレオチドを提供する。ハイブリッド形成技術は、分子生物学の分野で周知である。説明の目的のために、本明細書で提供するポリヌクレオチドの他のポリヌクレオチドでのハイブリッド形成を試験するために適した中程度のストリンジェントな条件として、5X SSC、0.5% SDS、1.0 mMのEDTA (pH 8.0) の溶液中で予備洗浄をすることと、50℃～60℃で5X SSC、一晩ハイブリダイズすることと、次いで、それぞれ、0.1% SDSを含む2X、0.5Xおよび0.2X SSCで、65℃20分の洗浄を2回行うこととを含む。ハイブリッド形成のストリンジェンシーは、たとえば、ハイブリッド形成溶液の塩含有量および／またはハイブリッド形成を行う温度を変更することにより、簡単に操作できることを当業者は理解するだろう。たとえば、他の実施形態では、適した高ストリンジェントなハイブリッド形成条件として、ハイブリッド形成の温度を、たとえば、60℃～65℃、または65℃～70℃に上昇させた以外、先に記載した条件を含む。

20

【0139】

ある実施形態では、先に記載したポリヌクレオチド、たとえば、ポリヌクレオチド改変体、フラグメントおよびハイブリダイズ配列は、RANKLを結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントをコード化する。他の実施形態では、そのようなポリヌクレオチドは、RANKLおよびここで特異的に表した抗体配列に、少なくとも約50%、少なくとも約70%、ある実施形態では少なくとも約90%結合する、抗体あるいは抗原結合フラグメント、またはそのCDR、およびをコード化する。さらなる実施形態では、そのようなポリヌクレオチドは、本明細書で記載した抗体より大きな親和性で、たとえば、量的に少なくとも約105%、106%、107%、108%、109%または110%で、RANKLおよびここで特異的に表した抗体配列に結合する抗体あるいは抗原結合フラグメント、またはそのCDRをコード化する。

30

【0140】

本明細書の他に記載するように、代表的なポリペプチドの3次元構造（たとえば、本明細書で提示するような、RANKL特異的抗体の改変体、たとえば、ここで提示するような、抗原結合フラグメントを有する抗体タンパク質）の決定は、1個またはそれを超えるアミノ酸の置換、付加、削除または挿入等の日常的方法によって行ってもよく、ここで、選択された天然または非天然アミノ酸は、そのように誘導された構造的改変体が、現在開示されている種の空間充填特性を保持しているかどうかを決定する目的で、仮想的にモデル化することができる。たとえば、親和性が保たれるように、またはより良好な親和性を達成するように、抗体内で、適切なアミノ酸置換（または適切なアミノ酸配列をコード化するポリヌクレオチド）を決定するための種々のコンピュータプログラムが、当業者に知られている。

40

【0141】

50

本明細書に記載されるポリヌクレオチド、またはそのフラグメントは、そのコード化配列の長さに関わらず、他のDNA配列、たとえば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、付加制限酵素部位、多回クローニング部位、他のコード化部分等と、その全長がかなり変わるように組み合わせてもよい。したがって、ほとんどどんな長さの核酸フラグメントを使用してもよいことが考えられ、全長は、好ましくは、調製の容易さおよび意図する組換えDNAプロトコルの用途によって限定される。たとえば、全長が塩基ペアの長さで約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50の等（全ての間長さを含む）の例示的ポリヌクレオチド部分が有用であると考えられる。

【0142】

ポリヌクレオチド配列を比較する場合、以下に記載するように、最大一致を配列比較した場合、2つの配列でヌクレオチドの配列が同じなら、2つの配列は「同一」であると言う。2つの配列の間の比較は、典型的には、配列を比較窓上で比較することによって行われ、配列類似性の局所領域を同定、比較する。本明細書で使用される「比較窓」は、少なくとも約20の連続する位置、通常は30～約75、40～約50の部分を言い、2つの配列を最適に配列比較した後、配列を同じ数の連続する位置の参照配列と比較してもよい。

【0143】

比較のための配列の最適アラインメントは、Lasergene（登録商標）バイオ情報ソフトウェア揃い（DNASTAR社、Madison、WI）中でMegAlign（商標）プログラムを使用し、デフォルトパラメータを使用して行ってもよい。このプログラムには、以下の参照に記載する、数種のアラインメントスキームが盛り込まれている。Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships. Dayhoffでは、M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC第5巻、Suppl. 3, pp. 345–358、Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenies, pp. 626–645 (1990)、Methods in Enzymology第183巻、Academic Press社、San Diego, CA、Higgins, D. G. およびSharp, P. M., CABIOS 5:151–153 (1989)、Myers, E. W. およびMuller W., CABIOS 4:11–17 (1988)、Robinson, E. D., Comb. Theor 11:105 (1971)、Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4:406–425 (1987)、Sneath, P. H. A. およびSokal, R. R., Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973)、Wilbur, W. J. およびLipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726–730 (1983)。

【0144】

あるいは、比較のための配列の最適アラインメントは、スミスアンドウォーターマンの局所的同一性アルゴリズム、Add. APL. Math 2:482 (1981)、ニードルマンアンドブンシュの同一性アラインメントアルゴリズム、J. Mol. Biol. 48:443 (1970)、ピアソンアンドリップマンの類似性探索法 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実行、(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG)でのGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA、575 Science

10

20

30

40

50

Dr. Madison, WI)、または検査によって行ってもよい。

【0145】

配列一致度および配列類似度を決定するために適したアルゴリズムの好ましい1例は、BLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、それぞれ、Altschulら、Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)、およびAltschulら、J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0は、たとえば、本明細書に記載されるパラメータを用いて使用して、2またはそれを超えるポリヌクレオチドの中で、配列一致度を決定することができる。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、米国立バイオテクノロジー情報センターによって一般公開されている。例示的な1例では、ヌクレオチド配列に関し、パラメータM（一組のマッチング残余に関するリワードスコア、常に >0 ）およびN（非マッチング残余に関するペナルティスコア、常に <0 ）を使用して累積スコアを計算することができる。各方向におけるワードヒットの伸展は、累積アラインメントスコアが、その最大達成値からの量Xによって乖離した時、1またはそれを超えるネガティブスコアリング残余アラインメントの累積により、累積スコアが0またはそれ未満になった時、またはいずれかの配列の末端に到達した時、止められる。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）は、初期値として、11のワード長（W）、および10の期待値（E）、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)参照）アラインメント、50の（B）、10の期待値（E）、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。

【0146】

ある実施形態では、「配列一致度」は、2つの最適配列比較配列を、少なくとも20の位置の比較の窓の上で比較することにより決定され、ここで、比較窓内のポリヌクレオチド配列部分は、2つの配列の最適アラインメントの参照配列（添加または削除を含まない）と比較して、20パーセントまたはそれ未満、通常、5〜15パーセント、または10〜12パーセントの付加または削除（すなわち隙間）を含んでもよい。同一の核酸塩基が両配列で起こる位置の数を決定してマッチ位置の数を得、マッチ位置の数を参照配列中の位置の総数（すなわち窓サイズ）で割り、得られた数字に100を掛けて配列一致度を得ることにより、パーセンテージを計算することができる。

【0147】

遺伝コードの縮退の結果、本明細書に記載されるような抗体をコード化する多くのヌクレオチド配列が存在することは当業者には理解されるであろう。これらのポリヌクレオチドの中には、RANKLに結合する抗体をコード化する生来のまたは本来のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド配列に対して最小の配列一致を有する者もある。それでもかかわらず、コドン使用における違いにより変化するポリヌクレオチドを、本開示により、明確に検討する。ある実施形態では、哺乳類の発現のためにコドンを最適化した配列を特に検討する。

【0148】

したがって、本発明の他の実施形態では、本明細書に記載される抗体の改変体および／または誘導体の調製のために、部位特異的変異誘発等の変異誘発アプローチを使用してもよい。このアプローチにより、それらをコード化する基礎ポリヌクレオチドの変異誘発によって、ポリペプチド配列内での特異的修飾を行うことができる。これらの技術は、1またはそれを超えるヌクレオチド配列のポリヌクレオチドへの変化を導入することにより、たとえば1またはそれを超える前述の考えを組み込む、配列改変体を調製および試験する簡単なアプローチを提供する。

【0149】

部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコード化する特異的オリゴヌクレオチド配列および十分に大量の隣接するヌクレオチドを使用して変異体を生成することを可

能にし、十分なサイズのプライマー配列および配列複雑度を提供し、スキャンされる削除接合部の両端に安定な二本鎖を形成する。変異は、選択されたポリヌクレオチド配列において、ポリヌクレオチドそれ自身の特性を改良、変更、減少、修飾または他に変化させるおよび／またはコード化されたポリペプチドの特性、活性、組成、安定性または一次配列を変更するために使用してもよい。

【0150】

ある実施形態では、発明者らは、コード化されたポリペプチドの1またはそれを超える特性、たとえば、抗体またはその抗原結合フラグメントの結合親和性、特定のFc領域の機能、または特定のFcγRのためのFc領域の親和性を変更するために、本明細書で開示する抗体またはその抗原結合フラグメントをコード化するポリヌクレオチド配列の変異誘発を検討する。部位特異的変異誘発の技術は、当該分野で周知であり、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方の改変体を造るために広く使用される。たとえば、部位特異的変異誘発は、DNA分子の特異的部分を変更するためによく使用される。そのような実施形態では、長さが、典型的には、約14～約25ヌクレオチド等を含むプライマーを、変更される配列の接合部の両端上の約5～約10の残基とともに使用される。

【0151】

当業者に理解されるように、部位特異的変異誘発技術では、一重鎖および二重鎖形態の両方に存在するファージベクターがしばしば使用される。部位特異的変異誘発で有用な典型的なベクターとして、M13ファージ等のベクターが挙げられる。これらのファージは、簡単に商業的に入手でき、それらの使用は、一般的に、当業者に周知である。また、二重鎖プラスミドは、プラスミドからファージへの関心がある遺伝子を転移するステップを排除する部位特異的変異誘発において、日常的に使用される。

【0152】

一般的に、本発明による部位特異的変異誘発は、先ず、一重鎖ベクターを得る、またはその配列内の所望のペプチドをコード化するDNA配列を含む二重鎖ベクターの2つの鎖を別の一部を融解することにより行う。所望の変異配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーは、一般的に、合成的に調製される。次いで、このプライマーを一重鎖ベクターでアニールし、変異含有鎖の合成を完全にするために、大腸菌ポリメラーゼI (Klenowフラグメント等のDNA重合酵素で処理する。したがって、1本鎖が変異のない本来の配列をコード化し、第2鎖が所望の変異を有するヘテロ2本鎖が形成される。このヘテロ2本鎖ベクターは、次いで、大腸菌細胞等の適切な細胞を形質転換するために使用され、変異配列を持つ組換えベクターを含むクローンが選択される。

【0153】

部位特異的変異誘発を使用する、選択されたペプチドをコード化するDNA部分の配列改変体の調製は、有用な種を生成する可能性のある手段を提供するが、それらをコード化するペプチドおよびDNA配列の配列改変体を得られ得る他の方法があるので、限定を意味するものではない。たとえば、所望のペプチド配列をコード化する組換えベクターは、ヒドロキシアミン等の変異誘発剤で処置して、配列改変体を得てもよい。これらの方法およびプロトコルに関する詳細は、Malloyら、1994、Segal、1976、ProkopおよびBajpai、1991、Kuby、1994、およびManiatisら、1982の教示にあり、これらは、その目的に関して、参照により本明細書に組み込まれる。

【0154】

本明細書で使用される用語「オリゴヌクレオチド特異的変異誘発手順」は、その初期濃度に関連する特異的核酸分子の濃度を増加させることになる、または増幅等の検出可能なシグナルの濃度を増加させることになる、テンプレート依存型方法およびベクター媒介増殖を言う。本明細書で使用される用語「オリゴヌクレオチド特異的変異誘発手順」は、プライマー分子のテンプレート依存型伸長に関与する仮定を言うものである。用語テンプレート依存型方法は、核酸の新しく合成された鎖の配列が相補的塩基対形成の周知のルールによって記録されるRNAまたはDNA分子の核酸合成を言う（たとえば、Watson

、1987参照)。典型的には、ベクター媒介方法は、核酸フラグメントのDNAまたはRNAベクターへの導入、ベクターのクローン増幅、および増幅された核酸フラグメントの回収に關与する。そのような方法の例示は、米国特許第4,237,224号に提供され、これは、特に、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0155】

ポリペプチド改変体の生成に關する他のアプローチでは、米国特許第5,837,458号に記載されるような、繰返し配列組換えを使用してもよい。このアプローチでは、組換えおよびスクリーニングまたは選択の反復サイクルを行い、たとえば、増加した結合親和性を有する個々のポリヌクレオチド改変体を「進化」させる。また、ある実施形態は、本明細書に記載されるような少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、プラスミド、ベクター、転写または発現カセットの形態で構築物を提供する。

10

【0156】

多くの実施形態では、対象モノクローナル抗体コード化する核酸を宿主細胞に直接導入し、該細胞を、コード化された抗体の発現を誘発するのに十分な条件下でインキュベートする。当業者に周知の標準的な技術を、本明細書で提供するポリペプチドおよび核酸配列と組み合わせて使用して、この開示の抗体を調製する。開示される特定の抗体をコード化する適切な核酸配列を決定するために、ポリペプチド配列を使用してもよい。種々の発現システムのために、当業者に周知の標準方法に従って核酸配列を最適化し、特定のコドン「プリファランス」を反映させてもよい。

【0157】

ある関連する実施形態によれば、1またはそれを超える本明細書に記載されるような構築物と、任意の抗体、CDR、VHあるいはVLドメイン、またはその抗原結合フラグメントをコード化する核酸とを含む組換え宿主細胞、およびコード化核酸からの発現を含む、コード化された生成物を生成する方法が提供される。発現は、適切な条件下で、核酸を含む組換え宿主細胞を培養することにより、都合よく達成されるかもしれない。発現による生成の後、抗体またはその抗原結合フラグメントを、任意の適した技術を使用して、単離および／または精製してもよく、次いで、目的通りに使用される。

20

【0158】

本明細書で提供される抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびにコード化核酸分子およびベクターは、たとえば、それらの自然環境から、実質的に純粋あるいは均一な形態に、または核酸の場合、所望の機能を持つポリペプチドをコード化する配列以外は、起源の拡散または遺伝子のないあるいは実質的にない形態に単離されおよび／または精製されてもよい。核酸はDNAまたはRNAを含んでもよく、全体的または部分的に合成であってもよい。文脈で他のことを必要としない限り、本明細書で表したようなヌクレオチド配列対する参照は、特定配列を持つDNA分子を包含し、Tの代わりにUが置き換わる特定配列を持つRNA分子を包含する。

30

【0159】

種々の異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングおよび発現のシステムは、周知である。適した宿主細胞として、細菌、哺乳動物細胞、酵母およびバキュロウィルスシステムが挙げられる。異種ポリペプチドの発現のための当該分野で入手可能な哺乳動物細胞株として、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ヒーラ細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NSOマウスメラノーマ細胞、およびその他多くのものが挙げられる。一般的で、好ましい細菌宿主は大腸菌である。

40

【0160】

大腸菌等の原核における抗体および抗原結合フラグメントの発現は、当該分野で確立されている。参考のために、たとえば、Pluckthun、A. Bio/Technology 9:545-551 (1991)を参照。培養における真核細胞の発現も、抗体またはその抗原結合フラグメントの生成に關する選択肢として、当業者に利用可能である。最近のレビュー、たとえば、Ref、M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576、Trill J. J. ら (1995) Curr

50

. Opinion Biotech 6:553-560を参照のこと。

【0161】

適切な制御因子配列を含み、必要に応じて、プロモーター配列、終結配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および他の配列を含む、適正なベクターは、選択または構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウィルス性たとえばファージ、または、ファージミドで合ってもよい。さらなる詳細は、たとえば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第2編、Sambrookら、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press. を参照のこと。核酸の操作、たとえば、核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、細胞および遺伝子発現へのDNAの導入、およびタンパク質の分析に関する、多くの公知の技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology、第2編、Ausubelら、John Wiley & Sons、1992、またはこの最新版に詳細に記載されている。

10

【0162】

用語「宿主細胞」は、1またはそれを超える本明細書に記載する抗体をコード化する核酸配列を導入している、または導入し得る、および本明細書に記載する任意の抗体をコード化する遺伝子等の、関心のある選択された遺伝子をさらに発現する、または発現し得る細胞を言うために使用される。該用語は、親細胞の子孫を含み、選択された遺伝子が存在する限り、該子孫が、元の親と形態学または遺伝子体質的に同一であってもなくてもよい。したがって、そのような核酸を宿主細胞に導入することを含む方法も検討する。該導入は、任意の入手可能な技術を使用してよい。真核細胞に関し、適した技術として、リン酸カルシウム遺伝子導入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、レトロウィルスまたは他のウィルス、たとえば、ワクシニア、または昆虫細胞に関し、バキュロウィルスを使用するリポソーム媒介遺伝子導入および形質導入が挙げられる。細菌細胞に関し、適した技術として、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを使用する遺伝子導入が挙げられる。導入は、たとえば、遺伝子が発現する条件下で宿主細胞を培養することによって、核酸からの発現を起こすまたは核酸を発現させた後に続いて行ってもよい。一実施形態では、核酸は、宿主細胞のゲノム（たとえば、染色体）に組み込まれる。組込みは、標準の技術に従って、組換えを促進する配列をゲノムに封入することによって、促進してもよい。

20

30

【0163】

また、本発明は、ある実施形態で、特定のポリペプチド、たとえば、本明細書に記載されるようなRANKL特異的抗体を発現するために、発現システムにおいて、先に記載した構築物を使用することを含む方法を提供する。用語「形質導入」は、通常、ファージによって、1つの細菌から他のものにする遺伝子の転移を言うために使用する。また、「形質導入」は、レトロウィルスによる、真核細胞配列の獲得および転移を言う。用語「遺伝子導入」は、細胞による外来性または外因性DNAの取り込み言うために使用され、外因性DNAが細胞膜の内部に導入された場合、細胞は「遺伝子導入されている」。多数の遺伝子導入技術が当該分野で周知であり、本明細書に開示されている。たとえば、Grahamら、1973、Virology 52:456、Sambrookら、2001、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratories、Davisら、1986、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、Elsevier、およびChuら、1981、Gene 13:197を参照。このような技術を使用して、1またはそれを超える外因性DNA部分を適した宿主細胞に導入することができる。

40

【0164】

本明細書で使用される用語「形質転換」は、細胞の遺伝子特徴の変化であり、細胞が修飾されて新しいDNAを含む場合、細胞は形質転換されていると言う。たとえば、細胞が生来の状態から遺伝的に修飾されると、細胞は形質転換される。遺伝子導入または形質導

50

入の後、形質転換DNAは、細胞の染色体に物理的な組込みによって細胞のそれを組み換え、複製することなく、エピソード要素として、過渡的に維持され、またはプラスミドとして、独立して複製するかもしれない。DNAが細胞の分裂で複製される時、細胞は安定に形質転換されていると考えられる。核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞等の生物学的な物質と組み合わせて使用される場合、用語「天然型」または「生来の」は、天然にあり、ヒトによって操作されていない物質を言う。同様に、本明細書で使用される「非天然型」または「非生来の」は、天然にはない、またはヒトによって構造的に修飾され、もしくは合成された物質を言う。

【0165】

用語「ポリペプチド」「タンパク質」および「ペプチド」および「糖タンパク質」は、変更可能に使用され、いかなる特定の長さも限定されないアミノ酸のポリマーを意味する。該用語は、ミリスチル化、硫酸化、グルコシル化、リン酸エステル化、およびシグナル配列の付加または削除等の修飾を排除しない。用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、1またはそれを超えるアミノ酸の鎖を意味し、ここで、各鎖は、ペプチド結合によって共有結合で連結したアミノ酸を含み、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、ペプチド結合によって非共有結合的および／または共有結合的に互いに連結し、生来のタンパク質の配列、すなわち、天然型および特異的非組換え細胞、または遺伝視改変または組換え細胞によって生成されたタンパク質を有する複数の鎖、および生来のタンパク質のアミノ酸配列を有する分子、または1またはそれを超える生来の配列のアミノ酸からの削除、該アミノ酸への付加および／または該アミノ酸の置換を有する分子を含み得る。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、具体的には、本開示のRANKLに結合する抗体、または抗RANKL抗体の1またはそれを超えるアミノ酸から削除、該アミノ酸に付加および／または該アミノ酸の置換を持つ配列を包含する。したがって、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、1個（「モノマー」と呼ぶ）のまたは複数（「多量体」と呼ぶ）のアミノ酸鎖を含み得る。

【0166】

本明細書で言う用語「単離タンパク質」は、対象タンパク質が、（1）少なくともいくつかの、通常は自然界で見られる他のタンパク質を含まない、（2）同じ供給源から、たとえば、同じ種からの他のタンパク質を本質的に含まない、（3）異なる種からの細胞によって発現する、（4）少なくとも約50%ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または自然界でともに存在する他の物質から分離されている、（5）「単離タンパク質」と自然界でともに存在しているあるタンパク質の部分と結合（共有結合または非共有結合相互作用によって）していない、（6）自然界でともに存在していないポリペプチドに動作可能に結合（共有結合または非共有結合相互作用によって）している、または（7）自然界では起こらないことを意味する。そのような単離タンパク質は、場合によっては合成供給源のゲノムDNA、cDNA、mRNAまたは他のRNA、またはこれらの任意の組み合わせによってコード化され得る。ある実施形態では、単離タンパク質は、タンパク質またはポリペプチドまたはその使用（治療、診断、予防、研究、その他）を妨害する自然環境で見いだされる他の夾雑物を実質的に含まない。

【0167】

用語「ポリペプチドフラグメント」は、単量体または多量体が可能で、アミノ末端削除、カルボキシル末端削除および／または内部削除、または天然型または組換えで生成されたポリペプチドの置換を有するポリペプチドを言う。ある実施形態では、ポリペプチドフラグメントは、少なくとも5～約500のアミノ酸長のアミノ酸鎖を含むことができる。ある実施形態では、フラグメントは、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400または450アミノ酸長さであることが理解されるだろう。

特に有用なポリペプチドフラグメントは、抗原結合ドメインまたは抗体のフラグメントを含む機能的ドメインを含む。抗 R A N K L 抗体の場合、有用なフラグメントとして、C D R 領域、とりわけ重鎖または軽鎖の C D R 3 領域、重鎖または軽鎖の可変領域、2 個の C D R を含む抗体鎖の部分またはその可変領域等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

ポリペプチドは、タンパク質の N 末端にシグナル（またはリーダー）配列を含んでもよく、これは、タンパク質の転移に共翻訳的にまたは後翻訳的に関与する。シグナルペプチドを含む、本明細書で提供されるいかなるポリペプチドアミノ酸配列も、本明細書に記載される、そのようなシグナルまたはリーダーペプチドのない用途に関して検討される。当業者が認識しているであろうように、シグナルペプチドは、通常、プロセシングの間に切断され、活性な抗体タンパク質中には含まれない。また、ポリペプチドは、ポリペプチド（たとえば、ポリ-His）の合成、精製、または同定の容易性のため、またはポリペプチドの固体支持体への結合を増強するために、リンカーまたは他の配列に、インフレーム融合または複合してもよい。

【0169】

また、ペプチドリinker／スペーサー配列は、所望の場合は、各ポリペプチドのその第 2 および／または第 3 構造への折り畳みを確保するのに十分な距離で、複数のポリペプチド成分を分離するために使用してもよい。そのようなペプチドリinker配列は、当該分野で周知の標準技術を使用して、融合ポリペプチドに組み込むことができる。

【0170】

あるペプチドスペーサー配列は、たとえば、（1）それらの柔軟な伸長された立体構造を取る能力、（2）それらは、第 1 および第 2 ポリペプチド上の機能エピトープと相互作用できる第 2 構造を取ることができないこと、および／または（3）ポリペプチド機能エピトープと反応するかもしれない疎水性または荷電残基の喪失に基づいて選択してもよい。

【0171】

例示的な一実施形態では、ペプチドスペーサー配列が、たとえば、Gly、Asn および Ser 残基を含む。Thr および Ala 等の他の中性付近のアミノ酸も、スペーサー配列に含まれてもよい。

【0172】

スペーサーとして有用に使用できるかもしれない他のアミノ酸配列として、Marat e a ら、Gene 40:39 46 (1985)、Murphy ら、Proc. Nat l. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986)、米国特許第 4, 935, 233 号および米国特許第 4, 751, 180 号に開示されたものが挙げられる。

【0173】

他の例示的スペーサーとして、たとえば、Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp (Chaudhary ら、1990、Proc. Nat l. Acad. Sci. U. S. A. 87:1066-1070) (配列番号: 233) および Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp (Bird ら、1988、Science 242:423-426) (配列番号: 234) が挙げられる。

【0174】

いくつかの実施形態で、第 1 および第 2 ポリペプチドが、機能ドメインを分離し、立体障害を防止するために使用することができる、非必須 N 末端アミノ酸領域を有する場合は、スペーサー配列は必要ではない。2 つのコード化配列を、スペーサーなしで直接、または、たとえば、1～3 回繰り返される 5 量体 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号: 235) で構成される、柔軟なポリリンカーを使用することによって融合することができる。そのようなスペーサーは、VH および VL の間に挿入されることによって

、単鎖抗体（s c F v）の構築において使用されている（B i r dら、1 9 8 8、S c i e n c e 2 4 2：4 2 3－4 2 6、H u s t o nら、1 9 8 8、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5：5 9 7 9－5 8 8 3）。

【0175】

ある実施形態では、ペプチドスペーサーは、2枚の単鎖抗体の可変領域を形成するペータシートの上に、正しい相互作用を可能にするように設計される。

【0176】

ある例示的实施形態では、ペプチドスペーサーは、1～5の間のアミノ酸、5～10の間のアミノ酸、5～25の間のアミノ酸、5～50の間のアミノ酸、10～25の間のアミノ酸、10～50の間のアミノ酸、10～100の間のアミノ酸、または任意の上記数字の間の範囲のアミノ酸である。

【0177】

他の例示的实施形態では、ペプチドスペーサーは、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50またはそれを超えるアミノ酸長さである。

【0178】

本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列修飾（複数を含む）を検討した。たとえば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改良することが望ましいだろう。たとえば、適切なヌクレオチド鎖を抗体またはその鎖をコード化するポリヌクレオチドに導入することによって、またはペプチド合成によって、抗体のアミノ酸配列改変体を調製してもよい。そのような修飾として、たとえば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの削除および／または該残基への挿入および／または該残基の置換が挙げられる。最終構築物が所望の特性（たとえば、RANKLへの高い親和性結合）を持つ限り、最終抗体にたどり着くために、任意の削除、挿入および置換の組合わせを行ってもよい。また、アミノ酸の変化は、グルコシル化部位の数または位置の変更等の抗体の翻訳後のプロセスを変えてもよい。先に記載した本発明のポリペプチドのための任意の異形および修飾は、本発明の抗体にも含まれる。

【0179】

本開示は、本明細書で開示する抗体の改変体を提供する。ある実施形態では、そのような改変体抗体、またはその抗原結合フラグメントあるいはそのCDRは、RANKLおよび本明細書で特異的に表された抗体配列に、少なくとも約50%、少なくとも約70%、および、ある実施形態では、少なくとも約90%で結合する。さらなる実施形態では、改変体抗体あるいは抗原結合フラグメント、またはそのCDRは、RANKLおよび本明細書で特異的に表された抗体配列に、本明細書に記載する抗体より高い親和性で結合し、たとえば、量的に、少なくとも約105%、106%、107%、108%、109%または110%結合する。

【0180】

特定の実施形態では、対象抗体は、a) 本明細書に記載される抗RANKL抗体の重鎖可変領域に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、b) 本明細書に記載される抗RANKL抗体の軽鎖可変領域に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、またはa) およびb) の両方を有してもよい。例示的な重鎖および軽鎖領域のアミノ酸配列は、配列番号：1、2、9－12および16－93で表される。

【0181】

特定の実施形態では、抗体は、a) i. アミノ酸配列が本明細書に記載される選択された抗体の重鎖CDR1領域と同一のCDR1領域、ii. アミノ酸配列が選択された抗体の重鎖CDR2領域と同一のCDR2領域、およびiii. アミノ酸配列が選択された抗体の重鎖CDR3領域と同一のCDR3領域を含む重鎖可変領域と、b) i. アミノ酸配

列が選択された抗体の軽鎖CDR1領域と同一のCDR1領域、i i . アミノ酸配列が選択された抗体の軽鎖CDR2領域と同一のCDR2領域、およびi i i . アミノ酸配列が選択された抗体の軽鎖CDR3領域と同一のCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインとを含んでもよく、ここで、抗体は、選択された標的（たとえば、RANKL）を特異的に結合する。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、改変体は、VHおよびVL領域のCDR領域において、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上までのアミノ酸置換を除いて、選択された抗体と同一の重鎖および軽鎖を含む改変体抗体である。この点に関し、選択された抗体のCDR領域において、1、2、3、4、5、6、7、8または、ある実施形態では、9、10、11、12、13、14、15またはそれを超えるアミノ酸置換があってもよい。VH領域および／またはVL領域においていずれかのCDRにおける置換でもよい（たとえば、Muller、1998、Structure 6:1153-1167参照）。本明細書に記載される（および図1A～図1Dで示される）抗RANKL抗体のVHおよびVL CDRのアミノ酸配列は、配列番号：3-8、13-15、94-225および228で表される。

10

【0182】

代表的なポリペプチド（たとえば、本明細書で提供される改変体RANKL特異的抗体、たとえば、本明細書で提供される抗原結合フラグメントを有する抗体タンパク質）の三次元構造の決定は、1またはそれを超えるアミノ酸の置換、付加、削除または挿入等の日常的方法によって行ってもよく、ここで、選択された天然または非天然アミノ酸は、そのように誘導された構造的改変体が、現在開示されている種の空間充填特性を保持しているかどうかを決定する目的で、仮想的にモデル化することができる。たとえば、Donaterra、1994 Prot. Sci. 3:2378、Bradleyら、Science 309:1868-1871（2005）、Schueler-Furmanら、Science 310:638（2005）、Dietzら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1244（2006）、Dodsonら、Nature 450:176（2007）、Qianら、Nature 450:259（2007）、Ramanら、Science 327:1014-1018（2010）参照。本明細書で提供されるRANKL-特異的抗体、その抗原結合ドメインの合理的設計のためのような、これらのおよび関連する実施形態で使用してもよいコンピュータアルゴリズムのいくつかの付加的な非限定例示として、3-Dグラフィックおよびビルトインスクリプトを使用して、大きな生体分子系を表示する、アニメ化する、および分析するための分子視覚化プログラムであるVMDが挙げられる（Theoretical and Computational Biophysics Group、University of Illinois、Urbana-Champaignのウェブサイト、ks.uiuc.edu/Research/vmd/）。多くの他のコンピュータプログラムが、当該分野で公知であり、当業者に利用可能であり、エネルギー最小化形態の空間充填モデル（ファンデルワールス半径）、異なる化学基に関して高い親和性の領域を決定するために検索するGRIDから、原子寸法の決定を可能にし、これにより結合、Monte Carloサーチを強化し、数学的アラインメント、およびCHARMM（Brooksら（1983）J. Comput. Chem. 4:187-217）およびAMBER（Weinerら（1981）J. Comput. Chem. 106:765）を計算し、力場計算および分析を評価する（Eisenfieldら（1991）Am. J. Physiol. 261:C376-386、Lybrand（1991）J. Pharm. Belg. 46:49-54、Froimowitz（1990）Biotechniques 8:640-644、Burbamら（1990）Proteins 7:99-111、Pedersen（1985）Environ. Health Perspect. 61:185-190、およびKiniら（1991）J. Biomol. Struct. Dyn. 9:475-488も参照）。多くの適切な計算的なコンピュータプログラムも、たとえばSchroedinger（Munich、Germany）から市販されている。

20

30

40

50

【0183】

本発明の他の実施形態では、抗RANKL抗体およびそのヒト化バージョンは、ウサギモノクローナル抗体に由来し、特にRabMAb（登録商標）技術を使用して生成される。これらの抗体は、最小配列修飾を必要とするので有利であり、それにより、変異系統（MLG）ヒト化技術を使用して、ヒト化の後、機能的特性の保持を促進する（たとえば、米国特許第7,462,697号参照）。したがって、本開示の抗RANKL抗体を造る例示的な方法として、たとえば、米国特許第5,675,063号および第7,429,487号に記載されたRabMAb（登録商標）ウサギモノクローナル抗体技術が挙げられる。この点に関し、ある実施形態では、開示の抗RANKL抗体は、ウサギにおいて生成される。特定の実施形態では、ウサギ脾臓細胞と融合可能なウサギ由来の不死性Bリンパ球を、抗体を生成するハイブリッド細胞を生成するために使用する。この不死性Bリンパ球は、内因性イムノグロブリン重鎖を検出可能に発現せず、ある実施形態では、変化したイムノグロブリン重鎖コード化遺伝子を含むかもしれない。

10

【0184】

組成物および使用方法

本開示は、RANKL特異的抗体、その抗原結合フラグメントを含む組成物、および種々の治療的設定でのそのような組成物の投与を提供する。

【0185】

純粋な形または適切な医薬組成物での本明細書に記載されるRANKL特異的抗体の投与は、類似する有用性を与える薬剤の投与の許容されたモードのいかなるものによっても行うことができる。医薬組成物は、抗体または抗体含有組成物を、適切な生理的に許容され得る担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせることによって調製され、固体、半固体、液体またはガス状形態の製剤、たとえば、錠剤、カプセル、粉末剤、顆粒剤、軟膏、溶液、座薬、注射剤、吸入剤、ゲル、小球体および噴霧剤に処方してもよい。さらに、他の医薬活性成分（本明細書の他で記載する他の抗癌剤）および／または塩類、緩衝液および安定剤等の適した賦形剤を組成物内に存在させてもよいが、これらは必要ではない。投与は、種々の異なる経路、たとえば、経口的、非経口的、経鼻的、静脈内、皮内、皮下または局所的に達成してもよい。投与の好ましいモードは、処置または防止すべき症状の性質に依存する。投与後に癌の進行および／または転移を減らす、阻害する、防止するまたは遅らせる量は効果的と考えられる。

20

30

【0186】

ある実施形態では、たとえば、腫瘍質量の少なくとも50%の減少等の、生存腫瘍の量の統計的に有意な減少、またはスキャン寸法の変化（たとえば、統計的に有意性で減少）によって示された場合、投与量は腫瘍退縮を起こす結果となるのに十分な量である。他の実施形態では、投与量は、たとえば、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）、破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症に関連する骨喪失および成人性および小児性白血病、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失を始めとする骨減少性障害に関連する症候において、臨床的に有用な減少を起こす結果となるのに十分な量である。そのような臨床的に関連する症候は、当業者に知られ、骨喪失、背部痛、歯肉の腫れ、赤いまたは紫色の歯肉、歯肉の圧痛、歯の間の膿、口臭、圧痛、ほてり、腫れ、関節腫脹、数時間続く朝のこわばり、腕の皮膚の下組織の硬いコブ（リウマトイド結節）、疲労、熱および体重減少が挙げられるが、これらに限定されない。当業者には理解されるように、兆候および症候は、重症度および患者間で変化するかもしれない。

40

【0187】

正確な薬用量および処置期間は、処置される疾患の関数であり、公知の試験プロトコルを使用して、または当該分野で公知のモデル系における組成物を試験し、推定することにより、経験的に決定されてもよい。また、対象臨床試験を行ってもよい。薬用量は、緩和すべき症状の重症度によっても変化するかもしれない。医薬組成物は、一般的に、望ましくない副作用を最小限に抑えながら、治療的に有用な効果を発揮するように、処方され、

50

投与される。組成物は、一度に投与してもよいし、多数の小さな用量に分け、時間を空けて投与してもよい。特定の対象全てに関して、特異的薬用量レジメンを、個々の必要に従って、時間をかけて調整してもよい。

【0188】

RANKL特異的抗体含有組成物は、単独で、または他の公知の癌の処置、たとえば、放射線治療、化学療法、移植術、免疫治療、ホルモン治療、光線力学的治療等と組み合わせて投与してよい。また、組成物は、抗生物質と組み合わせて投与してもよい。

【0189】

したがって、これらおよび関連する医薬組成物を投与する典型的な経路は、経口的、局所的、経皮的、吸入、非経口的、舌下の、頬側の、直腸、経腔的および鼻腔内経路が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される、用語非経口的は、皮下注射、静脈内、筋肉内、内部胸骨内注射または点滴技術を含む。本発明のある実施形態による医薬組成物は、組成物を患者に投与した時に、該組成物内に含まれる活性成分が、生物学的に利用可能になるように処方される。対象または患者に投与されるであろう組成物は、たとえば、錠剤が単一の用量単位の場合、1またはそれを超える用量単位の形態を取ってもよく、本明細書で記載するRANKL特異的抗体の噴霧剤形の容器は、複数の用量単位を保ってもよい。そのような剤形を調製する実際の方法は、当業者に公知または明らかになるだろう。たとえば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20編 (Philadelphia College of Pharmacy and Science、2000) 参照。いずれにしても、投与すべき組成物は、本明細書の技術に従って、関心のある疾患または症状の処置のために、治療的有効量の本開示の抗体を含む。

【0190】

医薬組成物は、固体または液体の形態であってもよい。一実施形態では、担体（複数を含む）は粒子状であり、組成物は、たとえば、錠剤または粉末形態になる。担体（複数を含む）は、液体でもよく、組成物は、たとえば、経口油、注射可能な液体または噴霧剤であり、これは、たとえば、吸入投与に有用である。経口的投与を意図する場合、医薬組成物は、固体または液体のどちらかの形態が好ましく、ここで、半固体、半液体、懸濁液およびゲル形態は、固体または液体として本明細書で考える形態内に含まれる。

【0191】

経口的投与用の固体組成物として、医薬組成物は、粉末、顆粒、圧縮錠剤、ピル、カプセル、チューインガム、ウェーハ等に処方してもよい。そのような固体組成物は、典型的には、1種またはそれを超える不活性希釈剤または食用担体を含むだろう。さらに、1種またはそれを超える以下のものが存在してもよい。カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロース、トラガントガムまたはゼラチン等の結合剤、デンプン、ラクトースまたはデキストリン等の賦形剤、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、プリモゲル、トウモロコシデンプン等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムまたはステロテックス等の潤滑剤、コロイド状二酸化ケイ素等の滑剤、サッカロースまたはサッカリン等の甘味剤、ペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジフレーバー等の香味料、および着色剤。医薬組成物をカプセル、たとえばゼラチンカプセルの形態とする場合、該組成物は、先に記載した種類の物質に加えて、ポリエチレングリコールまたは油等の液体担体を含んでもよい。

【0192】

医薬組成物は、液体の形態、たとえば、エリキシル、シロップ、溶液、乳液、または懸濁液であってもよい。液体は、2例として、経口的投与または注射による送達のためであってもよい。経口的投与を意図する場合、好ましい組成物は、本発明の化合物に加えて、1種またはそれを超える甘味剤、保存料、顔料／着色剤、および風味増強剤を含む。注射による投与を意図する組成物では、1種またはそれを超える界面活性剤、保存料、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定剤、および等張化剤が含まれてもよい。

【0193】

溶液、懸濁液または他の類似する形態であろうと、液体医薬組成物は、1種またはそれを超える以下のアジュバントを含んでもよい。無菌希釈剤、たとえば、注射用水、食塩水、好ましくは、生理食塩水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム、溶剤または懸濁溶媒として作用し得る合成モノまたはジグリセリド等の不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶剤、抗菌剤、たとえば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン、抗酸化剤、たとえば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム、キレート化剤、たとえば、エチルレンジアミン四酢酸、緩衝液、たとえば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩、および等張性調整剤、たとえば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。非経口製剤はガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て型注射器、または多人数用バイアルに封入することができる。生理食塩水は、好ましいアジュバントである。注射可能な医薬組成物は無菌であるのが好ましい。

10

【0194】

非経口的、経口的投与のいずれかを意図する液体医薬組成物は、適した薬用量が得られるような量の、本明細書で開示するRANKL特異的抗体を含むべきである。典型的には、この量は組成物中、少なくとも0.01%の抗体である。経口投与を意図する場合、この量は、組成物の重量の0.1と約70%との間で変化してよい。ある経口医薬組成物は、約4%と約75%との間の抗体を含む。ある実施形態では、本発明による医薬組成物および製剤は、希釈前、非経口用量単位が、0.01と10重量%の抗体を含むように調製される。

【0195】

医薬組成物は、局所的投与を意図してもよく、この場合、担体は、溶液、乳液、軟膏またはゲル基剤を含むのが適切である。基剤は、たとえば、1またはそれを超える以下のものを含んでもよい。ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、ミツロウ、鉱物油、水およびアルコール等の希釈剤、ならびに乳化剤および安定剤。増粘剤を局所的投与用の医薬組成物に存在させてもよい。経皮的投与を意図する場合、組成物は、経皮パッチまたはイオン泳動デバイスを含んでもよい。医薬組成物は、たとえば、直腸内で溶けて薬物を放出する座薬の形態で、直腸投与を意図してもよい。直腸投与用組成物は、適した非刺激性賦形剤として、油性基剤を含んでもよい。そのような基材として、ラノリン、ココアバターおよびポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0196】

医薬組成物は、固体または液体用量単位の物理的形態を変形する種々の材料を含んでもよい。たとえば、組成物は、活性成分の周りに被覆シェルを形成する材料を含んでもよい。被覆シェルを形成する材料は、典型的には、不活性で、たとえば、糖、シェラック、および他の腸溶コーティング剤から選択してもよい。あるいは、活性成分を、ゼラチンカプセルに入れてもよい。固体または液体形態の医薬組成物は、本発明の抗体に結合し、化合物の送達の手助けをする薬剤を含んでもよい。この能力で作用する、適した薬剤として、他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体、1種またはそれを超えるタンパク質またはリポソームが挙げられる。医薬組成物は、噴霧剤として投与することができる用量単位から本質的になるものであってもよい。用語噴霧剤は、コロイド状性質のシステムから加圧パッケージからなるシステムの及ぶ種々のシステムを示すために使用する。送達、液化または圧縮されたガスによるもの、または活性成分を分配するのに適したポンプシステムによるものでもよい。噴霧剤は、活性成分（複数を含む）を送達するために、単相、2相、または3相システムで送達してもよい。噴霧剤の送達には、必要な容器、アクティベーター、バルブ、サブ容器等が含まれ、これらが一緒になって、キットを形成してもよい。当業者であれば、過度の実験を行うことなく、好ましい噴霧剤を決定するだろう。

30

40

【0197】

医薬組成物は、医薬分野で周知の方法によって調製してもよい。たとえば、注射による投与を意図する医薬組成物は、本明細書に記載されるRANKL特異的抗体と、場合によっては、1種またはそれを超える塩、緩衝液および／または安定剤とを含む組成物と、無菌の希釈水とを、溶液を形成するように組み合わせることによって調製することができる

50

。界面活性剤を加えて、均一な溶液または懸濁液の形成を促進してもよい。界面活性剤は、水性送達システムにおいて、抗体の溶解または均一な懸濁を促進するように、非共有結合的に抗体組成物と相互作用する化合物である。

【0198】

組成物は、種々の要因、たとえば、使用される特異的化合物（たとえば、RANKL特異的抗体）の活性、化合物の代謝安定性および作用の長さ、患者の年齢、体重、健康状態、性別および食習慣、投与のモードおよび期間、排泄速度、薬物の組合わせ、特定の障害または症状の重症度、および患者が受ける治療により変化する治療の有効量で投与してもよい。一般的に、治療的に有効な一日量（70 kgの哺乳類に関し）は、約0.001 mg/kg（すなわち0.07 mg）～約100 mg/kg（すなわち7.0 g）、好ましい治療の有効量（70 kgの哺乳類に関し）は、約0.01 mg/kg（すなわち0.7 mg）～約50 mg/kg（すなわち3.5 g）、さらに好ましい治療の有効量（70 kgの哺乳類に関し）は、約1 mg/kg（すなわち70 mg）～約25 mg/kg（すなわち1.75 g）である。

【0199】

また、本開示のRANKL特異的抗体を含む組成物は、1種またはそれを超える他の治療薬の投与と同時に、その前にまたはその後に投与してもよい。そのような併用療法として、本発明の化合物と1種またはそれを超える追加の活性剤とを含む単一医薬的投与製剤の投与、および本発明の抗体と各活性剤とを、それぞれ、それ自身の医薬的投与製剤で含む組成物の投与が挙げられる。たとえば、本明細書に記載されるような抗体および他の活性剤を、一緒に、錠剤またはカプセル等の単一経口投与組成物として、または投与される各薬剤を別々の経口投与製剤として患者に投与することができる。同様に、本明細書に記載されるような抗体および他の活性剤は、一緒に、たとえば、食塩水または他の生理的に許容され得る溶液の単一経口投与組成物として、または投与される各薬剤を別々の経口投与製剤として患者に投与することができる。別々の投与製剤を使用する場合、抗体と1種またはそれを超える付加的活性剤を含む組成物は、本質的に同じ時間に、すなわち同時に、または別々の食い違った時間に、すなわち経時的に任意の順番で投与することができ、併用療法は、全てのこれらのレジメンを含むと理解される。

【0200】

したがって、ある実施形態では、1種またはそれを超える他の治療薬と組み合わせたこの開示の抗RANKL抗体組成物の投与も検討する。そのような治療薬は、関節リウマチ、炎症または癌等の、本明細書に記載されるような特定の疾患状態の標準的処置として、当該分野で許容されている。検討した代表的な治療薬として、サイトカイン、成長因子、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症剤、化学療法剤、放射線治療剤、または他の活性剤および補助剤が挙げられる。

【0201】

ある実施形態では、本明細書で開示する抗RANKL抗体は、任意の数の化学治療薬と共に投与してもよい。化学治療薬の例として、アルキル化剤、たとえば、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（商標））、スルホン酸アルキル、たとえば、ブスルファン、インプロスルファンおよびビボスルファン、アジリジン誘導体、たとえば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ、エチレンイミンおよびメチルアメラミン、たとえば、アルトレートアミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスファオルアミド（triethylenethiophosphoramidate）およびトリメチルオロメラミン、ナイトロジェンマスタード、たとえば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード、ニトロソ尿素（nitrosureas）、たとえば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、抗生物質、たとえば、アクラシノマイシン（aclacinomysins）、アクチノマイシ

ン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン、代謝拮抗薬、たとえば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)、葉酸類縁体、たとえば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート、プリン類縁体、たとえば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、ピリミジン類縁体、たとえば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU、アンドロゲン、たとえば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、抗副腎剤、たとえば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン、葉酸補充剤、たとえば、フロリン酸、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、アムサクリン、ベストラブシル、ビスアントレン、エダトラキセート、デフォファミン、デメコルシン、ジアジコン、エルフォルミチン、酢酸エリプチニウム、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール、ニトラクリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルビシン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、PSK(RTM)、ラゾキサン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジコン、2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン、アラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、たとえば、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)およびドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France)、クロラムブシル、ゲムシタビン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、白金類縁体、たとえば、シスプラチンおよびカルボプラチン、ビンブラスチン、白金、エトポシド(VP-16)、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビンノレルビン、ナベルビン、ノバントロン、テニポシド、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、CPT-11、トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000、ジフルオロメチルオミチン(DMFO)、レチノイン酸誘導体、たとえば、Targretin(商標)(ベキサロテン)、Panretin(商標)(アリトレチノイン)、ONTAK(商標)(デニロイキンジフチトクス)、エスペラミシン、カペシタビン、ならびに上に記載した任意のものの医薬的に許容され得る塩、酸または誘導体が挙げられる。またこの定義には、腫瘍上のホルモン作用を調整または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれ、たとえば、抗エストロゲン、たとえば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アリマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリソトン、およびトレミフェン(フェアストン)、および抗アンドロゲン、たとえば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセリレン、ならびにおよび上に記載した任意のものの医薬的に許容され得る塩、酸または誘導体が挙げられる。

【0202】

種々の他の治療薬は、本明細書に記載される抗RANKL抗体と共に使用してもよい。一実施形態では、抗体は、抗炎症剤とともに投与される。抗炎症剤または抗炎症薬として、ステロイドおよびグルココルチコイド(たとえば、ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン)、非ステロイド性抗炎症

10

20

30

40

50

薬（NSAIDs）、たとえば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミドおよびミコフェノール酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0203】

代表的なNSAIDは、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、Cox-2阻害剤、たとえば、VIOXX（登録商標）（ロフェコキシブ）およびCELEBREX（登録商標）（セレコキシブ）、およびシアル酸付加物からなる群より選択される。代表的な鎮痛剤は、アセトアミノフェン、オキシコドン、塩酸プロボルキシフェン（propoxyphene）のトラマドールからなる群より選択される。代表的なグルココルチコイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾンまたはプレドニゾンからなる群より選択される。代表的な生物学的応答調整物質として、細胞表面マーカーに対する分子（たとえば、CD4、CD5、その他）、サイトカイン阻害剤、たとえば、TNF拮抗剤（たとえば、エタネルセプト（ENBREL（登録商標））、アダリムマブ（HUMIRA（登録商標））およびインフリキシマブ（REMICADE（登録商標）））、ケモカイン阻害剤および接着分子阻害剤が挙げられる。生物学的応答調整物質として、モノクローナル抗体および分子の組換え形が挙げられる。代表的なDMARDとして、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、Gold（経口的（オーラノフィン）および筋肉内）、およびミノサイクリンが挙げられる。

【0204】

ある実施形態では、本明細書に記載される抗体は、サイトカインと共に投与される。本明細書で使用される「サイトカイン」は、細胞間メディエーターとして他の細胞で作用する1つの細胞集団によって放出されるタンパク質の総称を意味する。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および昔からのポリペプチドホルモンである。サイトカインの中には、成長ホルモン、たとえば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、リラキシン、プロリラキシン、糖タンパク質ホルモン、たとえば、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）、肝臓成長因子、繊維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子-アルファおよび-ベータ、ミューラー管阻害物質、マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮成長因子、インテグリン、トロンプロポイエチン（TPO）、神経成長因子、たとえば、NGF-ベータ、血小板成長因子、形質転換成長因子（TGF）、たとえば、TGF-アルファおよびTGF-ベータ、インスリン様成長因子-Iおよび-II、エリスロポエチン（EPO）、骨誘発因子、インターフェロン、たとえばインターフェロン-アルファ、ベータおよび-ガンマ、コロニー刺激因子（CSF）、たとえば、マクロファージ-CSF（M-CSF）、顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）、および顆粒球-CSF（G-CSF）、インターロイキン（IL）、たとえば、IL-1、IL-1alpha、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、腫瘍壊死因子、たとえば、TNF-アルファまたはTNF-ベータ、ならびにLIFおよびkitリガンド（KL）等の他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で使用される用語サイトカインには、天然源からのまたは組換え細胞培養からのタンパク質、および生来の配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

【0205】

本明細書に記載するRANKL-特異的抗体を含む組成物は、本明細書に記載される疾患に罹患する個体に投与してもよい。該疾患として、たとえば、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癆性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）、破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失を始めとする骨

減少性障害が挙げられるが、これに限定されない。ヒト疾患の処置のためのインビボ用途では、一般的に、投与の前に、本明細書に記載される抗体を医薬組成物に取り入れる。医薬組成物は、1種またはそれを超える本明細書に記載される抗体を、本明細書の他で記載したような、生理的に許容され得る担体または賦形剤と組み合わせて含む。医薬組成物を調製するために、有効量の1種またはそれを超える化合物を、投与の特定のモードに適することが当業者に公知の任意の医薬的担体（複数を含む）または賦形剤と混合する。医薬的担体は、液体、半液体または固体でもよい。非経口的、皮内的、皮下または局所的用途のために使用される溶液または懸濁液は、たとえば、無菌希釈剤（たとえば、水）、食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶剤、抗菌剤（たとえば、ベンジルアルコールおよびメチルパラベン）、抗酸化剤（たとえば、アスコルビン酸および亜硫酸水素ナトリウム）、キレート化剤（たとえば、エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA））、緩衝液（たとえば、酢酸塩、クエン酸塩、およびリン酸塩）が挙げられる。静脈内投与の場合は、適した担体として、生理食塩水またはリン酸緩衝食塩水（PBS）、およびグルコース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、およびこれらの混合物等の増粘剤および安定化剤含む溶液が挙げられる。

10

【0206】

本明細書に記載されるRANKL特異的抗体を含む組成物は、時間放出製剤または被覆等の、抗体が体から素早く除去をされることを防ぐ担体で調製されてもよい。そのような担体として、徐放性製剤が挙げられ、たとえば、移植およびマイクロカプセル化送達システム、ならびにエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、および当業者に公知の他のポリマー等の生分解性、生体適合性ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0207】

本明細書では、RANKLを結合する抗体を使用する処置方法が提供される。一実施形態では、本発明の抗体を、RANKLの不適切な発現に関与する疾患を持つ患者に投与し、これは、本開示の文脈において、たとえば、存在するタンパク質の量、変異体タンパク質の存在、またはその両方における変化（たとえば、統計的に有意な増加または減少）のため、異常なRANKL発現または活性を特徴とする疾患および障害を含むことを意味する。過剰は、分子レベルでの過剰発現、作用部位での長いまたは蓄積された出現、または正常に検出可能なRANKLの活性と比較して活性が増加すること（たとえば、統計的に有意な方法において）を含む（これらに限定されない）いかなる原因でも起こる。そのようなRANKLの過剰は、正常な発現、出現、またはRANKLシグナル伝達事象の活性と比較して測定することができ、該測定は、本明細書に記載される抗体の開発および／または臨床試験において、重要な役割を担うだろう。

30

【0208】

特に、本発明の抗体は、RANKLの発現に関連する種々の骨減少性障害の処置に有用である。たとえば、本発明の一実施形態は、障害、たとえば（これに限定されない）、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失を始めとする骨減少性障害を、治療的有效量の本明細書で開示するRANKL特異的抗体を癌患者に投与することによる処置の方法を提供する。投与後、統計的に有意な方法（たとえば、当業者に知られるであろう適切な制御）で、癌の進行および／または転移を阻害、防止、または遅らせる量は、有効であると考えられる。

40

【0209】

他の実施形態は、骨減少性障害、たとえば（これらに限定されない）骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテアーゼ周囲の骨喪失の進行を、

50

進行の防止を必要とする患者に、治療的有効量の本明細書で開示する RANKL 特異的抗体（たとえば、投与後、統計的に有意な方法、すなわち、当業者に知られるであろう適切な制御と比較して、癌の転移を阻害、防止、または遅らせる量）を投与することにより、防止する方法を提供する。

【0210】

他の実施形態は、骨減少性障害、たとえば（これらに限定されない）骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテゼ周囲の骨喪失を、1またはそれを超えるこれらの障害を持つ患者に、治療的有効量の本明細書で開示する RANKL 特異的抗体を投与することにより、防止する方法を提供する。

10

【0211】

他の実施形態は、骨減少性障害、たとえば、骨粗鬆症、歯周炎、癌関連骨転移、多発性骨髄腫、関節リウマチ、乾癬性関節炎、家族性膨張性骨溶解症、パジェット病（若年性パジェット病を含む）破骨細胞腫、慢性ウィルス感染症ならびに成人性および小児性白血病に関連する骨喪失、ならびにプロテゼ周囲の骨喪失の進行または予防を、1またはそれを超えるこれらの疾患に罹患している患者に、治療的有効量の本明細書で開示する RANKL 特異的抗体を投与することにより、処置、阻害する方法を提供する。

【0212】

他の実施形態では、本発明の抗 RANKL 抗体は、結合抗原、たとえば、構造エピトープの構造を決定するために使用され、該構造は、次いで、この構造を持つまたは模倣する化合物を、たとえば、化学的モデリングおよび SAR 方法によって、開発するために使用してもよい。

20

【0213】

本発明の種々の他の実施形態は、一部、RANKL を発現する細胞または組織の存在を検出するための診断用途に関する。したがって、本開示は、試料において RANKL を検出する方法、たとえば、RANKL を発現する細胞または組織の検出を提供する。そのような方法は、種々の公知の検出フォーマット、たとえば、免疫組織化学的検査（IHC）、免疫細胞化学的検査（ICC）、in situ ハイブリッド形成（ISH）、ホルマウント in situ ハイブリッド形成（WISH）、蛍光性 DNA in situ ハイブリッド形成（FISH）、流動細胞計測法、酵素免疫アッセイ（EIA）、および酵素連結免疫アッセイ（ELISA）（これらに限定されない）に適用することができる。

30

【0214】

ISH は、標識化された相補的な DNA または RNA 鎖（すなわち、一次結合剤）を使用して、細胞または組織（in situ）の一部に、または組織が充分充分小さければ、組織全体（ホルマウント ISH）に、特異的 DNA または RNA 配列を局在化させる種類のハイブリッド形成である。これは、抗体を一次結合剤として使用して、組織中にタンパク質を局在化する免疫組織化学的検査とは種類が異なることは、当業者であれば理解するだろう。DNA ISH は、染色体の構造を決定するために、ゲノム DNA で使用することができる。蛍光性 DNA ISH（FISH）は、たとえば、染色体完全性を評価するために、医療診断において使用することができる。RNA ISH（ハイブリッド形成組織化学的検査）は、mRNA および他の転写物を測定または組織の部分またはホルマウント内に局在化するために使用される。

40

【0215】

種々の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、直接または間接的に検出され得る検出可能な標識に複合されている。この点に関し、抗体「複合物」は、検出可能な標識に共有結合で連結している抗 RANKL 抗体と言う。本発明では、DNA プロブ、RNA プロブ、モノクローナル抗体、その抗原結合フラグメント、およびその抗体誘導体、たとえば、単一鎖-可変-フラグメント抗体またはエピトープタグを付けた抗体は、全

50

て、検出可能な標識に共有結合で連結可能である。「直接検出」では、1個のみの検出可能な抗体、すなわち一次検出可能抗体が使用される。したがって、直接検出は、検出可能な標識に複合した抗体は、第2の抗体（二次抗体）を添加する必要なく、それ自体で検出され得ることを意味する。

【0216】

「検出可能な標識」は、試料における標識の存在および／または濃度を示す、検出可能な（たとえば、視覚的、電子光学的、その他）シグナルを造りだせる分子または物質である。抗体に複合する場合、該検出可能な標識は、特異的抗体が向かう標的を配置するおよび／または定量するために使用することができる。こうして、試料中の標的の存在および／または濃度は、検出可能な標識により造りだされるシグナルの検出により検出することができる。検出可能な標識は、直接または間接的に検出することができ、数種の異なる検出可能な標識が複合した、異なる特異的抗体の組合わせを、1種またはそれを超える標的を検出するために使用することができる。

10

【0217】

直接検出することができる検出可能な標識の例として、蛍光色素、放射性物質および金属粒子が挙げられる。一方、間接的検出では、一次抗体を適用した後、1種またはそれを超える追加の抗体、すなわち二次抗体の適用を必要とする。したがって、検出は、二次抗体または結合剤の検出可能な一次抗体への検出によって行われる。二次結合剤または抗体の添加を必要とする検出可能な一次結合剤または抗体の例として、検出可能な酵素結合剤および検出可能なハプテン結合剤または抗体が挙げられる。

20

【0218】

いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、第1結合剤を含む、核酸ポリマーに複合する（たとえば、ISH、WISHまたはFISHプロセスにおいて）。他の実施形態では、検出可能な標識は、第1結合剤を含む抗体に複合する（たとえば、IHCプロセスにおいて）。

【0219】

本開示の方法で使用される抗体に複合してもよい検出可能な標識の例として、蛍光標識、酵素標識、放射性同位体、化学発光性標識、電気化学発光性標識、生物発光性標識、ポリマー、ポリマー粒子、金属粒子、ハプテン、および色素が挙げられる。

【0220】

蛍光標識の例として、5-（および6）-カルボキシフルオレセイン、5-または6-カルボキシフルオレセイン、6-（フルオレセイン）-5-（および6）-カルボキシアミドヘキサ酸、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、テトラメチルローダミン、およびCy2、Cy3、およびCy5等の色素、AMCAを含む、場合によっては置換されたクマリン、PerCP、R-フィコエリトリン（RPE）およびアロフィコエリトリン（APC）を含むフィコビリタンパク質、テキサスレッド、プリンスンレッド、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびその類縁体、ならびにR-フィコエリトリンまたはアロフィコエリトリンの複合物、無機蛍光標識、たとえば、被覆CdSeナノ微結晶等の半導体材料に基づく粒子が挙げられる。

30

【0221】

ポリマー粒子標識の例として、ポリスチレン、PMMAまたはシリカのマイクロ粒子またはラテックス粒子（これらは、蛍光色素で埋め込むことができ）、または色素、酵素または基材を含むポリマーミセルまたはカプセルがある。

40

【0222】

金属粒子標識の例として、金粒子および被覆金粒子が挙げられ、これらは、銀染色により変換することができる。ハプテンの例として、DNP、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ビオチン、およびジゴキシゲニンが挙げられる。酵素標識の例として、ホスホラデュッシュパーオキシダーゼ（HRP）、アルカリ性ホスファターゼ（ALPまたはAP）、 β -ガラクトシダーゼ（GAL）、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、 β -N-アセチルグルコサミダーゼ（acetylglucosamin

50

idase)、 β -グルクロニダーゼ、インペルターゼ、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼおよびグルコースオキシダーゼ(GO)が挙げられる。ホスホラデュッスーパーオキシダーゼ用の通常使用される基材の例として、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)、ニッケル強化ジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、ベンジジンジヒドロクロライド(BDHC)、Hanker-Yates試薬(HYR)、インドファンプルー(IB)、テトラメチルベンジジン(TMB)、4-クロロ-1-ナフトール(CN)、アルファーナフトールプロニン(アルファーNP)、o-ジアニシジン(OD)、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(BCIP)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)、2-(p-ヨードフェニル)-3-p-ニトロフェニル-5-フェニルテトラゾリウムクロライド(INT)、テトラニトブルーテトラゾリウム(TNBT)、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルーベーターD-ガラクトシド/フェローフェリシアニド(BCIG/FF)が挙げられる。

【0223】

アルカリフォスフォターゼのためによく使われる基質の例として、ナフトール-AS-B1-ホスフェート/ファーストレッドTR(NABP/FR)、ナフトール-AS-MX-ホスフェート/ファーストレッドTR(NAMP/FR)、ナフトール-AS-B1-ホスフェート/ファーストレッドTR(NABP/FR)、ナフトール-AS-MX-ホスフェート/ファーストレッドTR(NAMP/FR)、ナフトール-AS-B1-ホスフェート/ニューフクシン(NABP/NF)、プロモクロロインドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム(BCIP/NBT)、5-Bromo-4-クロロ-3-インドリル-b-d-ガラクトピラノシド(BCIG)が挙げられる。

【0224】

発光標識の例として、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、1,2-ジオキセタン、およびピリドピリダジンが挙げられる。電気化学発光性標識の例として、ルテニウム誘導体が挙げられる。放射性標識の例として、ヨウ化物、コバルト、セレン、トリチウム、炭素、イオウおよびリンの放射性同位体が挙げられる。

【0225】

検出可能な標識は、本明細書に記載される抗体、または関心のある生物学的マーカー、たとえば、抗体、核酸プローブ、またはポリマーに特異的に結合する他の任意の分子に連結してもよい。さらに、検出可能な標識は、第2および/または第3および/または第4および/または第5結合剤または抗体、その他にも複合することができることは、当業者であれば、理解するだろう。さらに、当業者は、関心のある生物学的マーカーを特徴付けるために使用される追加の結合剤または抗体は、それぞれ、シグナル増幅ステップとして役立つかもしれないことを理解するだろう。検出可能な物質がたとえば、色素、コロイド状金粒子、発光試薬である場合、生物学的マーカーを、たとえば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を使用して視覚的に検出してもよい。生物学的マーカーに結合する視覚的に検出可能な物質を、分光光度計を使用して検出してもよい。検出可能な物質が放射性同位体の場合、検出は、オートラジオグラフィによって視覚的に、またはシンチレーションカウンターを用いて非視覚的に行うことができる。たとえば、Larsson、1988、Immunocytochemistry: Theory and Practice、(CRC Press、Boca Raton、Fla.)、Methods in Molecular Biology、第80巻1998、John D. Pound (編集)(Humana Press、Totowa、N. J.)参照。

【0226】

本発明は、さらに、試料中のRANKLまたはRANKLを発現する細胞または組織を検出するキットも提供し、ここで、キットは、本明細書に記載されるような、少なくとも1個の抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞を含む。ある実施形態では、キットは、緩衝液、酵素、標識、基質、ビーズ、または本発明の抗体が付着している他の表面等と、使用のための指示書とを含んでもよい。

【実施例】

【0227】

実施例 1

抗 RANKL 抗体の生成とヒト化

4 匹のニュージーランドホワイトウサギを、完全フロイントアジュバント中の組換えヒト R a b F c - R A N K L で皮下免疫化した。最も高い血清力価および R A N K L 中性化活性を持つウサギを、細胞融合のための脾摘出術の 4 日前に、P B S 中の R a b F C - R A N K L で静脈内追加免疫した。

【0228】

抗体生成

脾細胞を免疫化ウサギから採取し、P E G 4 0 0 0 (S i g m a C h e m i c a l 、 S t . L o u i s 、 M O) を使用して、ウサギプラズマ細胞腫細胞 2 4 0 E - W 2 で融合した。H A T (ハイボキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン) による選択の後、元の 9 6 - ウェルプレート内で成長するハイブリドーマクローンを、溶媒変更で、新しい 9 6 - ウェルプレートに移した。ハイブリドーマ上澄み液を収集し、直接 E L I S A における R A N K L への特異的結合に関してスクリーニングした。E L I S A 結合アッセイで陽性の 1 2 0 個のハイブリドーマを、機能的スクリーニングのために選択した。

【0229】

ハイブリドーマの機能的スクリーニング

初期機能的スクリーニングに関し、確認した 1 2 0 個の陽性クローンからの上澄み液を、F A C S により R A N K L 結合を、および E L I S A により中和 R A N K L / R A N K 結合を試験した。これらの実験により、5 6 個のユニーク陽性クローンが同定され、さらに、これらの機能的活性を R A W 細胞アッセイで試験した。R A W 細胞アッセイにより、R A N K L により誘発された R A W 細胞破骨細胞分化の阻害を測定する。5 6 個のクローンは R A N K L 活性を中和することが分かった。R A N K L 活性を中和したトップの 4 0 個のクローンを、さらなる機能的特徴付けのための分子クローニングおよび組換え発現のために、さらに選択した。図 1 A および図 1 B は、それぞれ、トップ 4 0 個のクローンの V H および V L のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

【0230】

組換え抗 RANKL 抗体

トップ 4 0 個のクローンからのウサギ I g G の L 鎖の D N A フラグメントおよび H 鎖の可変領域 (V H) を、P C R によって増幅した。L 鎖フラグメントを、I 部位ではなく、H i n d I I I で、p T T 5 ベクターにクローン化し、H i n d I I I および K p n I 部位で、V H フラグメントを、H 鎖ビルトイン p T T 5 ベクターの定常領域にクローン化した。各ハイブリドーマについて、L または H 鎖の 3 個の D N A クローンを配列決定し、コンセンサス配列を持つプラスミドを、同定し、組換え発現のために使用した。組換え抗体を発現するために、L および H 鎖プラスミドを、2 9 3 - 6 E 細胞 (N a t i o n a l R e s e a r c h C o u n c i l C a n a d a) に共遺伝子導入した。5 日後、上澄み液を採取し、機能的アッセイの前に、E L I S A アッセイを使用して定量化し、I g G 濃度を測定した。

【0231】

組換え抗 RANKL 抗体の機能的スクリーニング

上述のように同定された、選択された抗 R A N K L 抗体の潜在的効力を特徴付けるために、多くのアッセイを使用した。図 2 に示すように、流動細胞計測法を使用して、選択された抗 R A N K L 抗体の細胞表面上の R A N K L の結合を試験した。4 0 個の抗 R A N K L 抗体は全て、2 9 3 個の細胞の表面で発現した R A N K L に特異的に結合し、クローン 2 3、4 0 8 および E B I - 5 1 - 2 2 は、4 0 個のクローンの中で最も良好な結合を示した。さらに、図 3 で示すように、選択された抗 R A N K L 抗体の R A N K L の受容体への R A N K L 結合の妨害を試験した。特に、R & D (8 u g / m l) から購入したヒト R A N K を、実験の 1 6 時間前に、9 6 - ウェルプレートに塗布した。続いて、プレートを、種々の濃度の組換え抗 R A N K L 抗体でプレインキュベートした、0 . 5 u g / m l の

RANKLを用い、37℃で30分処理した。マウス抗ヒトRANKL抗体を使用して塗布RANKに結合したRANKLを検出し、二次ヤギ抗マウスHRPを使用してシグナルを検出した。40個の抗RANKL抗体は、全て、RANKへのRANKLの結合を特異的に妨害し、クローン23、408およびEBI-51-22は、最も良好な妨害剤であった。

【0232】

さらなる実験では、選択された抗RANKL抗体のマウスRANKLへの交差反応性を試験した（図4参照）。以下の表1に結果をまとめ、これは、とりわけ、クローン7、37、193、20、210、23、220、227、246、256、270、299、318、327、379、383、416、420、447、476、480、547、565、EBI-51-4およびEBI-51-23が、マウスRANKLへの強い交差反応性を有することを示す。

【0233】

【表1-9】

表1：マウスRANKLを持つ選択された抗RANKL抗体の交差反応性

交差反応性	反応性を示すクローン
強い交差 (24クローン)	7、37、193、20、210、23、220、227、246、256、270、299、318、327、379、383、416、420、447、476、480、547、565、EBI-51-4、EBI-51-23
交差なし (7クローン)	68、147、174、238、EBI-51-1、EBI-51-22、AMG162
弱い交差 (9クローン)	91、130、191、388、408、411、415、476、EBI-51-2、EBI-51-11

さらに、RANKLによって刺激された破骨細胞分化の阻害を試験するRAW細胞（RAW246.7細胞）アッセイを使用して、抗RANKL抗体を評価した。Raw264.7細胞株は、ネズミ科白血病ウィルス誘発腫瘍に由来した、ネズミ科マクロファージ細胞株である。要するに、RAW264.7細胞は、RANKLの存在下で破骨細胞様細胞に分化し、該破骨細胞分化は、破骨細胞の特性であるTRAP活性により測定することができる。RAW264.7細胞を、細胞培養培地中、一定量のRANKL（40ng/ml）および種々の量の抗RANKL抗体の存在下、4日間インキュベートした。4日間の最後に、酒石酸塩抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）活性について、細胞を、透過処理および酸性化により染色し、次いで、パラニトロフェニルホスフェートで5分間処理した。0.5MのNaOH溶液50ulを加えることにより、反応を止めた。このアッセイでは、TRAP活性により、パラニトロフェニルホスフェートはパラニトロフェノールに変換され、これは、405nmでの光学密度測定により定量化することができる。AMG162ベンチマーク抗体と比較した、トップクロンの光学密度のプロット対抗RANKL濃度のプロットを図5に示し、IC50を以下の表2にまとめる。クローン23、EBI-51-22、327、408、91および383では、AMG162と比べて、RANKL誘発破骨細胞分化を強く妨害したことを示した。

【0234】

本発明の研究では、AMG162をベンチマークとして使用した。これは、RANKL（TNFα/b、TRAIL、CD40Lに結合していない）に関して特異的な完全ヒトIgG2抗体である。この抗体を、HuIg-TGマウス（リンパ節融合）で、CHO-RANKL（全長）細胞免疫化によって生成した。これは、ヒトRANKLに関して高い親和性を有する（ $K_d = 3 \times 10^{-12}$ M）。これは、IC50 RANKL結合の阻害：9.4ng/ml、およびIC50破骨細胞様細胞形成の阻害、50ng/mlを示す。AMG162は、ヒト（サル）特異的であるが、ネズミ科RANKLへの結合は示さない。長

い P K および P D プロファイルを有し、骨粗鬆症、骨転移および関節リウマチ（R A）の処置に使用されてきた。その副作用として、おそらく T、B および D C 細胞機能の干渉による潜在的な感染が挙げられる。

【0235】

【表2】

表2：RAW細胞アッセイにおける選択された抗RANKL抗体のIC50

クローン No.	23	EBI-51-22	327	408	91	383	AMG162
IC50 ng/ml	1.711	3.602	7.496	6.438	4.88	2.005	9.963

10

選択されたトップ抗RANKL抗体の親和性を、表面プラズモン共鳴を使用して試験した。それを以下の表3にまとめる。結果は、クローン#23は、ベンチマーク抗体AMG162に類似する結合親和性を有することを示した。クローン#23は、破骨細胞分化の強い阻害、高い結合親和性、およびマウスRANKLとの交差反応性を示し、したがって、これをインビボ研究およびヒト化のトップリード候補として選択した。

【0236】

【表3】

表3：表面プラズモン共鳴を使用する親和性測定のとまとめ

	クローンNo.	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	chi2
1	23	9.50E+05	1.54E-04	0.162	0.182
2	91	4.64E+05	2.73E-04	0.589	0.0656
3	327	1.41E+05	3.00E-04	2.13	0.0595
4	408	6.07E+05	2.62E-04	0.432	0.0322
5	EBI-51-22	8.80E+05	2.75E-04	0.312	0.164
6	AMG-162	1.33E+06	1.57E-04	0.118	0.318

20

30

また、クローン#408および#51-22も破骨細胞分化の強い阻害、高い結合親和性を示し、マウスRANKLとの交差反応性は示さなかった。これらのクローンを、ヒト化のバックアップ候補として選択した。

【0237】

ヒト化設計

C D Rをヒト生殖系列にグラフトすることにより、クローン23、408およびEBI-51-22をヒト化した。まず、クローンの重鎖（VH）および軽鎖（VK）可変領域配列を、ヒト生殖系列VHおよびVKデータベースに対してブラストした。最も近いヒト生殖系列配列を同定し、ヒト化テンプレートとして使用した。次に、C D R接触または鎖間接触に潜在的に関与するフレームワーク領域内のウサギ残基を、ヒトおよびマウス抗体からの知識に基づいて同定した。抗体の構造的活性に重要でないと考えられる残基を、先のヒト化ウサギ抗体からの知識に基づいて同定した。

40

【0238】

クローン23のヒト化VHおよびVL領域のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号：9、12、226、10-11および227で表される。なお、3つの異なるヒト化VHおよび3つの異なるヒト化VL領域が構築された。ヒト化VH 23HZD-1 HCは配列番号：9で表され、配列番号：10（#23VL）および11（#23VLb）で表されるヒト化VL両方で試験した（以下でさらに検討する図6～9、11および12参照）

50

。最も高い親和性を持つヒト化 2 3 クローンは、それぞれ、配列番号：2 2 6 および 2 2 7 で表される h 2 3 n V H および V L であった（図 1 2 参照）。h 2 3 n クローンの V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 は、それぞれ、配列番号：3、4 および 2 2 8 で表される。h 2 3 n クローンの V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号：1 5、7 および 8 で表される。図 1 C は、クローン 2 3 親ウサギ、ならびにヒト化 V H および V L のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

【0 2 3 9】

クローン 4 0 8 のヒト化 V H および V L 領域のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号：2 2 9 および 2 3 0 で表される。クローン 4 0 8 親ウサギ、ならびにヒト化 V H および V L のアミノ酸配列のアラインメントを、図 1 D に示す。

10

【0 2 4 0】

クローン E B I 5 1 - 2 2 のヒト化 V H および V L 領域のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号：2 3 1 および 2 3 2 で表される。クローン E B I 5 1 - 2 2 親ウサギならびにヒト化 V H および V L のアミノ酸配列のアラインメントを、図 1 E に示す。

【0 2 4 1】

ヒト化クローン（複数を含む）の発現

M u t a t i o n a l L i n e a g e G u i d e d (M L G) 法を使用して、クローン 2 3 を、カップ軽鎖を持つヒト I g G 2 サブクラスにヒト化し、4 0 8 および E B I - 5 1 - 2 2 を、ヒト I g G 1 サブクラスおよびカップ軽鎖にヒト化した。M L G 法は、ネズミ科由来抗体のヒト化で使用する C D R グラフト法とは、概念的および技術的両方で異なる。機能的抗体のパネルの生物学的および配列情報によりガイドされるヒト化は、ヒト化抗体において、完全な抗体活性の保持を可能にする。M L G では、フレームワークにおける残基ばかりでなく、抗体の C D R 領域における残基もヒト化される。D N A コード化ヒト化 V K（クローン 2 3 の V K - H Z D または V K - H Z D - b）および V H - H Z D は、M C L a b（S o u t h S a n F r a n c i s c o、C A、U S A）により合成した。ヒト化抗体を発現するために、ヒト化 V K フラグメントを H i n d I I I および N h e I でヒト C K ビルトイン p T T 5 ベクターに、およびヒト化 V H を H i n d I I I および B s i W I 部位でヒト I g G 2 C H ビルトイン p T T 5 ベクターにクローン化した。ヒト C K および I g G 2 C H の D N A およびアミノ酸配列を、定常領域に関して選択した。抗体のヒト化バージョンを、2 9 3 - 6 E 細胞中で発現させ、タンパク質 A カラムにより精製し、P B S 緩衝液に対して透析した後、U V 2 8 0 により定量化した。

20

30

【0 2 4 2】

ヒト化候補抗 R A N K L 抗体クローン 2 3 の機能的スクリーニング

上述のように同定されたクローン 2 3、4 0 8 および E B I - 5 1 - 2 2 ヒト化候補抗 R A N K L 抗体の潜在的効力を特徴付けるために、多くのアッセイを使用した。特に、遺伝子導入された 2 9 3 細胞を使用して、ウサギ抗 R A N K L 抗体およびそれらのヒト化対応物の R A N K L を発現する細胞への結合を試験した（図 6 参照）。ヒト化 2 3 および 4 0 8 の結合親和性は、それらの親ウサギ抗体に近い。

【0 2 4 3】

さらに、ヒト化候補の E L I S A において受容体ーリガンド結合を妨害する能力を試験した（図 7 参照）。要するに、実験の 1 6 時間前に、R A N K（8 u g / m l）を 9 6 - ウェルプレートに塗布した。続いて、プレートを、種々の濃度のヒト化抗 R A N K L 抗体でインキュベートした、0. 5 u g / m l の R A N K L で、3 7 ° C 3 0 分間処理した。マウス抗ヒト R A N K L 抗体を使用して R A N K L を検出し、二次ヤギ抗マウス H R P を使用してシグナルを検出した。A M G 1 6 2 を陽性コントロールとして使用した。結果は、ヒト化抗体は、全て、それらの親ウサギクローンと比べてそれと匹敵する妨害活性を有し、全て、ベンチマーク A M G 1 6 2 より強力であることを実証した。

40

【0 2 4 4】

さらなる実験では、ヒト化抗体の R A N K L によって誘発される R A W 細胞破骨細胞分

50

化を阻害する能力を試験した（図8および9（マウス）を参照）。要するに、RAW264.7細胞を、細胞培養培地中、一定量のヒトRANKL（40 ng/ml）および種々の量のウサギおよびヒト化抗RANKL抗体の存在下、4日間インキュベートした。4日間の最後に、酒石酸塩抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）活性について、細胞を、透過処理および酸性化により染色し、次いで、パラニトロフェニルホスフェートで5分間処理した。0.5 MのNaOH溶液50 μ lを加えることにより、反応を止めた。TRAP活性により、パラニトロフェニルホスフェートはパラニトロフェノールに変換され、これを、405 nmでの光学密度測定により定量化した。ヒト化23の2つのバージョンの破骨細胞阻害を図8Aに示し、ヒト化抗RANKL 408およびヒト化EBI-51-22を図8Bに示す。結果は、ヒト化抗体は全て、ヒトRANKLに応答して、匹敵する破骨細胞分化への阻害効果を有し、全て、AMG162と比較して、より強力なまたは劣らない活性を示した。図9Aおよび図9Bに示すように、ヒト化23 vkbは、マウスRANKL-誘発破骨細胞の細胞分化の強い阻害効果を示し、一方、ヒト化408およびEBI-51-22はより少ない効果を示した。AMG162はマウスRANKLに結合しないので、マウスRANKL誘発破骨細胞分化を阻害しなかった。

10

【0245】

ヒト化候補抗RANKL抗体クローン23のインビボ効力

インビボ効力をネズミ科骨粗鬆症モデルで評価した。4月齢の雌C57/BL6マウスを、卵巣切除（OVX）し、8匹の追加のマウスには偽手術した。次いで、ヒト化クローン23の試験のために、マウスを、以下の表4にまとめるように、8匹の6グループに分けた。

20

【0246】

【表4】

表4：インビボ効力-骨粗鬆症モデル設計

グループNo.	グループタイトル	動物No.	時点	手術	用量
1	OVX+ビヒクル	8	4週	OVX	---
2	OVX+RabMAb 23	8	4週	OVX	10mg/kg、SC M & F/週
3	OVX+ヒト化23 VKB	8	4週	OVX	10mg/kg、SC M & F/週
4	OVX+アレンドロネート	8	4週	OVX	28ug/kg、SC M & F/週

30

グループ2～6の動物に、ビヒクルコントロール、ビスホスホネート陽性コントロール（アレンドロネート）、または試験品を、1週間に2回を4週間、合計で8用量を皮下注射した。骨密度シトメトリ分析のために、量的コンピュータ断層撮影（pQCT）骨密度シトメトリ機を使用した。右近位脛骨のBMDを4週モニターした。検死で集めた右大腿骨の骨密度を、対応する組織診断を用い、12週でスキャンした。PDマーカを、1、2、3および4週で試験した。処置の間、血液を、処置の24時間前、毎週、眼窩後出血により集めた。インビボ破骨細胞活性のバイオマーカーであるTRAP-5b血清濃度を、ELISAにより測定した。

40

【0247】

図10に示すように、特に、親23ウサギ抗体の単一投与後（1週）、23処置グループでは、TRAP5b（破骨細胞活性のバイオマーカーである酒石酸塩抵抗性酸性ホスファターゼ5b）に関し、コントロールグループに比べて有意に大きな減少が観察され、これは、試験グループでのより強い破骨細胞活性の阻害（90%阻害）を示す。

【0248】

pQCT結果は、ウサギおよびヒト化抗RANKL 23両方による処置は、小柱状BM

50

Dに関し、OVXビヒクル処置マウスの骨質量に比べて、4週で、有意に高い骨質量を得る結果となることを示した。一方、陽性コントロールであるアレンドロネートは、骨質量の保存への限界効果を示しただけであった（図11参照）。

【0249】

追加の実験では、クローン23のh23n IgG2ヒト化バージョンのRANKLへの結合を、h23 IgG1およびh23 IgG2と比較した。この実験のために、HCおよびLCの両方を293細胞に共遺伝子導入（*co-transfected*）し、排泄された抗体を精製した。ELISAアッセイを使用して、h23n IgG2のRANKLタンパク質への結合親和性をh23 IgG1およびh23 IgG2と比較した。図12に示す結果は、h23nヒト化抗体は、クローン23の他のヒト化バージョンと比較して、改良された結合親和性を有することを示した。

10

【0250】

要約すると、これらの実験は、RANKLへの高い結合親和性（ $K_d = 0.16 \text{ nM}$ ）を持つRANKLに対するヒト化IgG2モノクローナル抗体の開発を記載する。ヒト化クローン23は、ヒト、サルおよびマウスRANKLと交差反応性である。これによりインビボで抗体の直接評価を可能にし、バイオマーカー開発を容易にする。この抗体は、強力なRANKL中和活性を発揮し、RANK受容体へのRANKL結合を妨害し、RANKL誘発破骨細胞分化を阻害し、マウスにおけるインビボでのOVX誘発骨喪失を阻害する。また、ヒト化23抗RANKL抗体は、デノスマブ（AMG162）とは異なるエпитープに結合し、安全性および効力プロフィールにおける改良をもたらし得る。

20

【0251】

上述の種々の実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書および／または出願データシートに記載された全ての米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国の特許、外国の特許出願、および非特許文献は、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。種々の特許、出願および公報の概念を使用し、さらなる実施形態を提供するために、必要であれば、実施形態の態様を変更することができる。

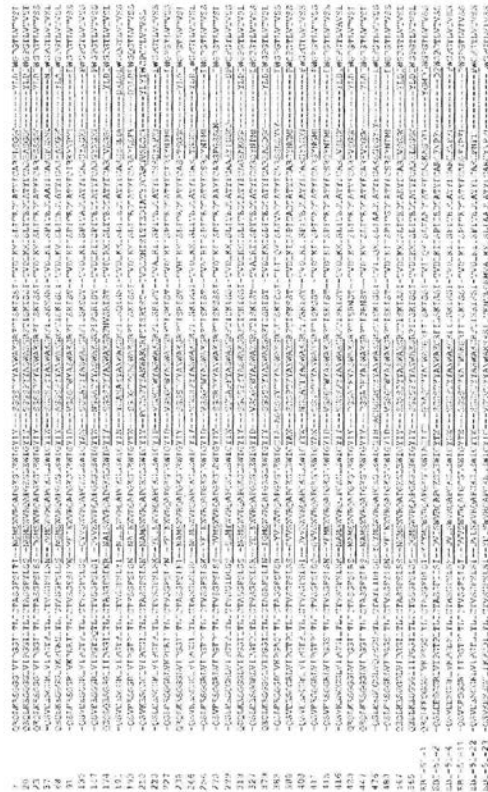
【0252】

これらおよび他の変更は、先に詳述した開示に沿って、実施形態に行うことができる。一般的に、以下の特許請求の範囲において使用された用語は、特許請求の範囲を、明細書および特許請求の範囲に開示された特定の実施形態に限定するように解釈されるべきではなく、特許請求の範囲に記載するものと等価の全範囲とともに、全ての可能性のある実施形態を含むと解釈すべきである。したがって、特許請求の範囲は、開示により限定されない。

30

【図 1 - 1】

Figure 1: RANKに対するウサギ抗体アゴニスト
Figure 1A: 重鎖可変領域のアミノ酸アラインメント



【図 1 - 2】

Figure 1B: 軽鎖可変領域のアミノ酸アラインメント



【図 1 - 3】

Figure 1C: ウサギ抗RANKL抗体クローン23にヒトアミノ酸アラインメント
クローン23重鎖



【図 1 - 4】

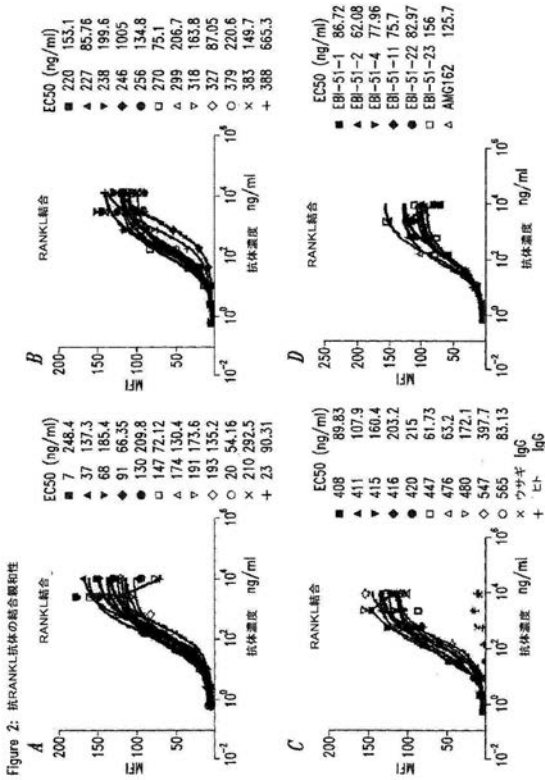
Figure 1D: ウサギ抗RANKL抗体クローン408にヒトアミノ酸アラインメント
クローン408重鎖



Figure 1E: ウサギ抗RANKL抗体クローンEB1-22にヒトアミノ酸アラインメント
クローンEB1-51-22重鎖



【図 2】



【図 3 - 2】

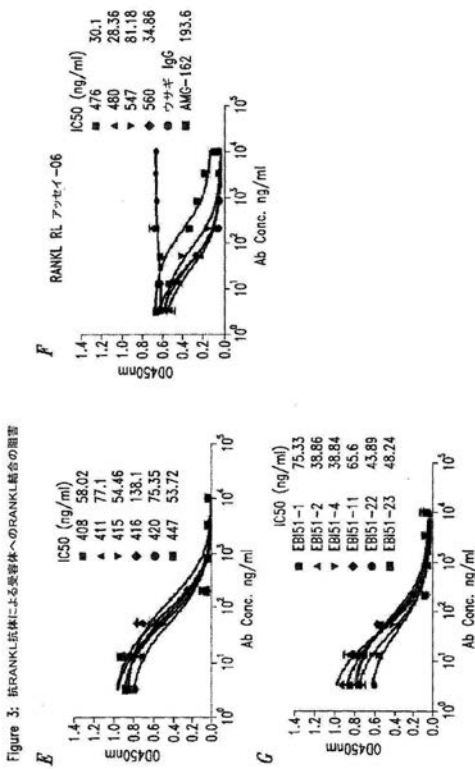
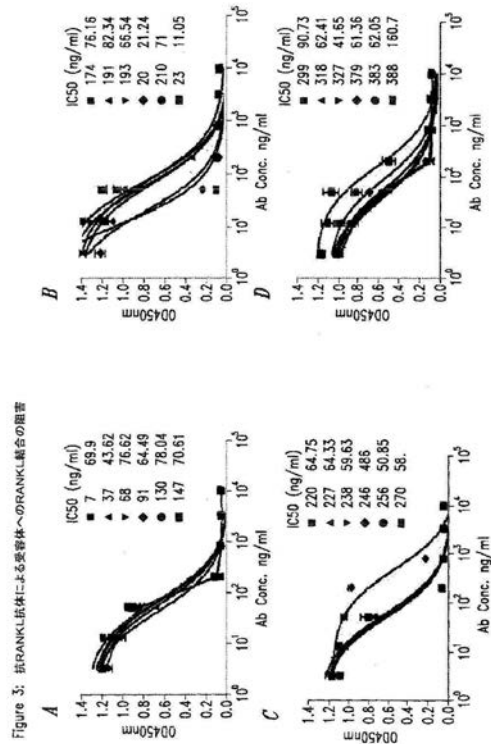
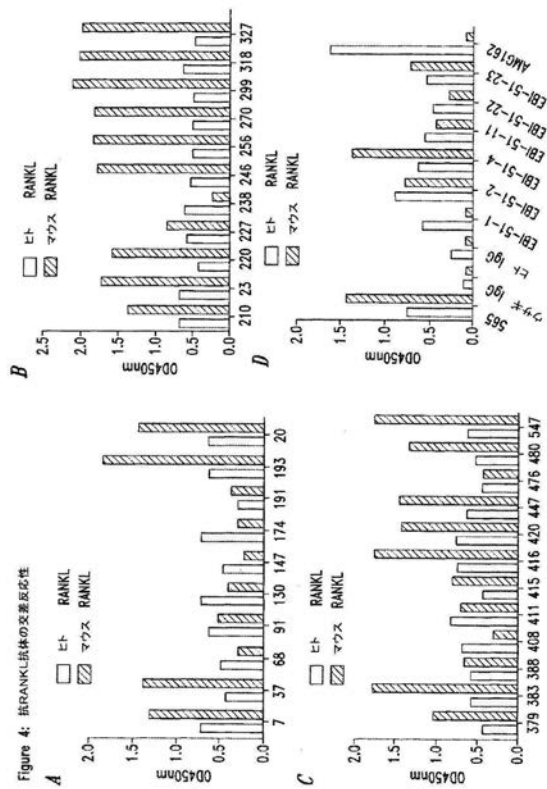


Figure 3: 抗RANKL抗体による受容体へのRANKL結合の阻害

【図 3 - 1】

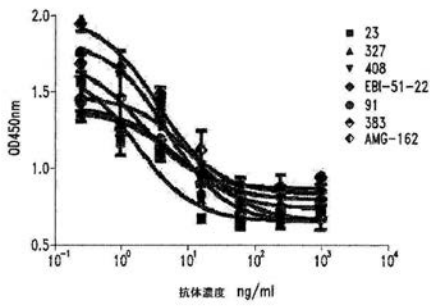


【図 4】



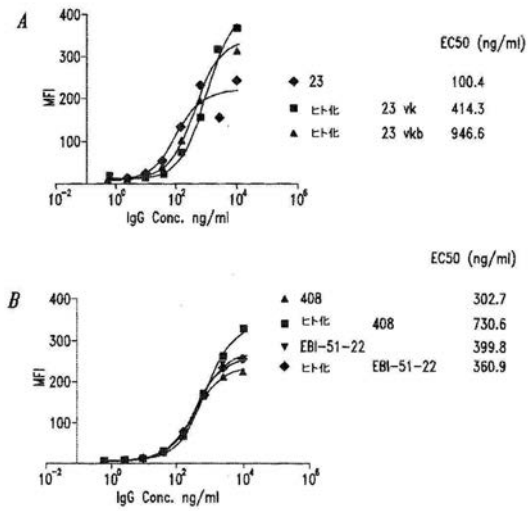
【図 5】

Figure 5: RANKLによって誘発された破骨細胞の細胞分化の阻害



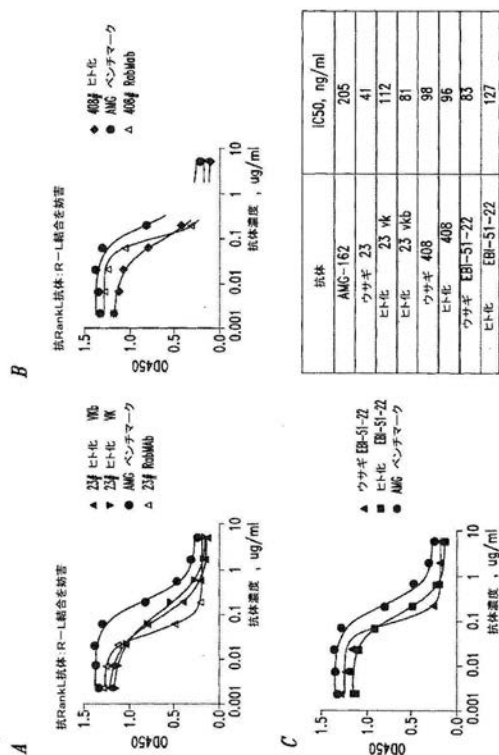
【図 6】

Figure 6: ヒト化23および408は、細胞表面RANKLへ結合する



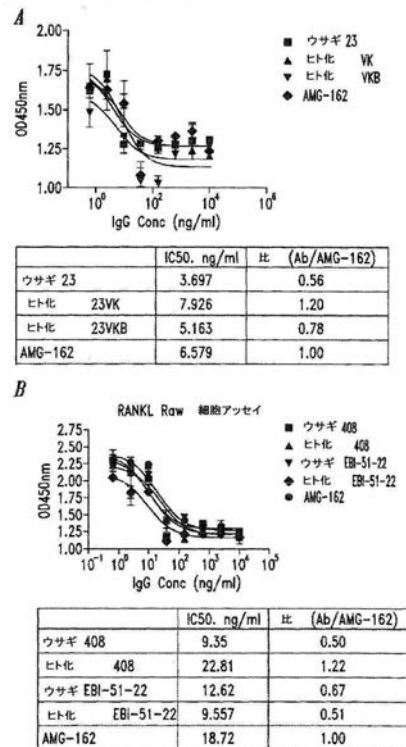
【図 7】

Figure 7: ヒト化抗RANKL抗体はRANKLのRANKへの結合を阻害する



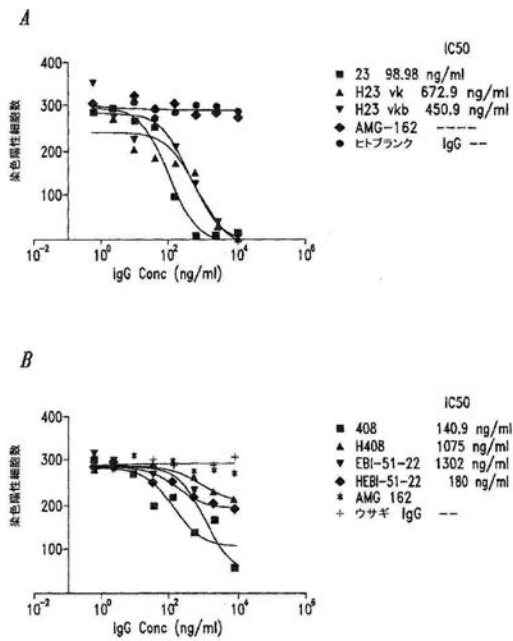
【図 8】

Figure 8: ヒト化抗RANKL抗体は破骨細胞分化を阻害する



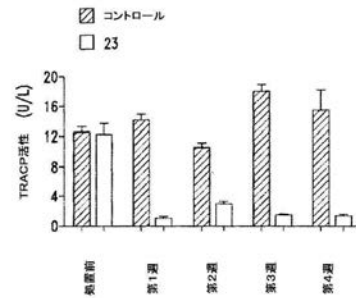
【図 9】

Figure 9: インビトロでのマウスRANKL誘発Raw細胞分化の阻害



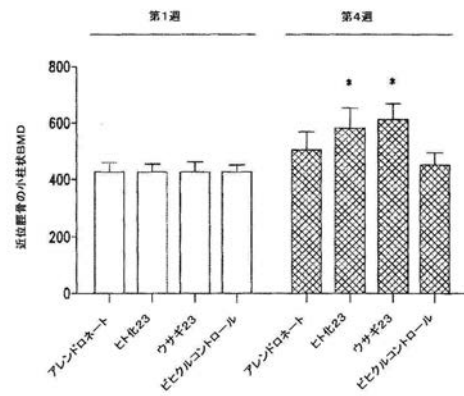
【図 10】

Figure 10: 抗RANKL抗体はインビボで破骨細胞活性を有意に阻害した



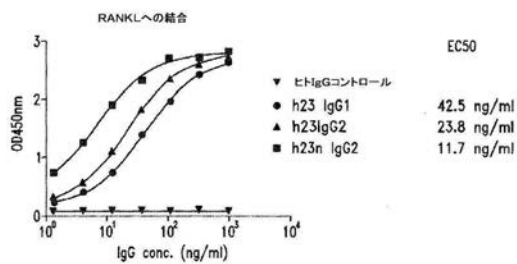
【図 11】

Figure 11: 抗RANKL抗体は、OVXマウスで骨密度を有意に増加した



【図 12】

Figure 12: クローン23のh23n IgG2ヒト化バージョンと他のクローン23ヒト化バージョンとの比較



【配列表】

2018183176000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 ヨンケ ジャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3, パロ アルト, ストックトン プレイス 1
1 9

(72)発明者 シャオドン ヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 6, パロ アルト, エル ドラド アベニュー
2 5 0

(72)発明者 グオーリャン ユウ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, トーナメント ドライブ 1 0
2 5

(72)発明者 ウエイミン ズウ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2, サンフランシスコ, 4 0 ティーエイチ アベ
ニュー 1 8 7 0

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC15 CC24 CE06 CE12 DA01
4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AB04 AC14 BA02 BD14 BD17
CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB17 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26

【外国語明細書】
2018183176000001.pdf