

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580011060.2

[51] Int. Cl.

*G12N 15/09 (2006.01)*

*C07K 16/28 (2006.01)*

*C12P 21/08 (2006.01)*

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*G01N 33/50 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2007年4月4日

[11] 公开号 CN 1942581A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/15 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61P 19/08 (2006.01)*

*A61P 19/10 (2006.01)*

*A61P 29/00 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[22] 申请日 2005.2.9

[21] 申请号 200580011060.2

[30] 优先权

[32] 2004. 2. 12 [33] JP [31] 035216/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/002373 2005.2.9

[87] 国际公布 WO2005/078087 日 2005.8.25

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.12

[71] 申请人 三共株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 野见山尚之 久木田敏夫 昼间由晴

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 吴娟

权利要求书 5 页 说明书 70 页 序列表 36 页  
附图 12 页

[54] 发明名称

针对破骨细胞相关蛋白质的抗体

[57] 摘要

本发明涉及使用在破骨细胞细胞中强烈表达的基因的骨代谢异常检测方法、具有骨代谢异常治疗和/或预防效果的化合物的筛选方法、以及用于骨代谢异常的治疗和/或预防的药物组合物。即,本发明提供以人 DC - STAMP 基因的表达为指标的骨代谢异常的检测方法,以及含有特异性识别人 DC - STAMP、具有抑制破骨细胞的形成的活性的抗体的药物组合物。

1. 抗体，该抗体与 DC-STAMP 特异性结合，抑制破骨细胞的形成。

2. 抗体，该抗体与选自下述的至少一种蛋白质特异性结合，抑制破骨细胞的形成：所述蛋白质是含有序列表的 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质和含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体，其特征在于：该抗体为单克隆抗体。

4. 权利要求 1-3 中任一项的抗体，其特征在于：该抗体是人源化抗体。

5. 权利要求 1-4 中任一项的抗体，其特征在于：该抗体是完全人抗体。

6. 权利要求 1-6 中任一项的抗体，其特征在于：该抗体是 IgG 抗体。

7. 骨代谢异常的检测方法，该方法包含下述步骤 1)-4):

1) 从由受试者采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

2) 从由正常人采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

3) 测定上述来自步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分中下述 a)或 b)中任一项的多核苷酸的表达量：

a) 具有 SEQ ID NO.1、3 和 5 中至少其中之一所示的核苷酸序列的多核苷酸；

b) 与含有上述 a)的多核苷酸的互补序列的多核苷酸在严格条件下杂交的多核苷酸；

4) 对通过上述步骤 3)测定的来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸表达量的差进行分析，检测上述步骤 1)的受试者的骨代谢异常的步骤。

8. 骨代谢异常的检测方法，该方法包含下述步骤 1)-3):

1) 对于由受试者采集的检样，测定具有 SEQ ID NO.2、4 和 6 中至少其中之一所示的氨基酸序列的蛋白质的表达量的步骤；

2) 对于由正常人采集的检样，测定上述步骤 1)中的至少其中之一的蛋白质的表达量的步骤；

3) 对在上述步骤 1)中检测的蛋白质的表达量和在上述步骤 2)中测

定的该蛋白质的表达量的差进行分析，检测受试者的骨代谢异常的步骤。

9. 权利要求 7 或 8 的方法，其特征在于：骨代谢异常是骨质疏松症、类风湿性关节炎和/或癌性高钙血症。

10. 权利要求 7 或 8 的方法，其特征在于：骨代谢异常是骨质疏松症。

11. 权利要求 7 或 8 的方法，其特征在于：骨代谢异常是类风湿性关节炎。

12 权利要求 7 或 8 的方法，其特征在于：骨代谢异常是癌性高钙血症。

13. 权利要求 7、9-12 中任一项的方法，其特征在于：测定多核苷酸的表达量的方法是 RNA 印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法、RT-PCR、核糖核酸酶保护测定或连缀分析。

14. 权利要求 7、9-12 中任一项的方法，其特征在于：测定多核苷酸的表达量的方法是：使用由来自检样的互补 DNA 组或者含有所述 DNA 组各 DNA 的部分序列的 DNA 制备的基因芯片或阵列。

15. 权利要求 8-12 中任一项的方法，其特征在于：蛋白质的表达量的测定方法采用与该蛋白质特异性结合的抗体或配体。

16. 权利要求 8-12 中任一项的方法，其特征在于：蛋白质的表达量的测定方法为蛋白质印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法或固相酶联免疫定量法。

17. 骨代谢异常检测试剂盒，该试剂盒含有选自下述 1)-3)中的至少一种：

1) 15-30 个碱基长度的连续寡核苷酸引物，该引物用于特异性扩增含有序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 中至少一个所示的核苷酸序列的多核苷酸；

2) 15 个核苷酸或以上的连续多核苷酸探针，该探针与含有序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 中的至少一个所示的核苷酸序列的多核苷酸在严格条件下杂交、用于检测该多核苷酸；

3) 固定有多核苷酸的固相化试样，其中所述多核苷酸含有序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 中至少一个所示的核苷酸序列。

18. 包含下述 1)和 2)的检测骨代谢异常的试剂盒，该试剂盒包含：

1) 抗体, 该抗体与含有序列表的 SEQ ID NO.2、4 和 6 中至少一个所示的氨基酸序列的蛋白质特异性结合, 用于检测该蛋白质;

2) 可与上述 1) 的抗体结合的二次抗体。

19. 权利要求 17 或 18 的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症、类风湿性关节炎或癌性高钙血症。

20. 权利要求 17 或 18 的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症。

21. 权利要求 17 或 18 的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为类风湿性关节炎。

22. 权利要求 17 或 18 的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为癌性高钙血症。

23. 用于治疗骨代谢异常的药物组合物, 其特征在于: 该组合物含有权利要求 1-6 中的至少一种抗体。

24. 用于治疗骨代谢异常的药物组合物, 其特征在于: 该组合物含有权利要求 1-6 的抗体的至少一种, 以及选自二膦酸盐、活性维生素 D<sub>3</sub>、降钙素及其衍生物、雌二醇等激素制剂、选择性雌激素受体调节剂 SERMs、依普黄酮、维生素 K<sub>2</sub>, 即四烯甲萘醌、钙制剂、甲状旁腺激素 PTH 制剂、非甾体性抗炎剂、抗 TNF $\alpha$  抗体、抗甲状旁腺激素相关蛋白 PTHrP 抗体、IL-1 受体拮抗剂、抗 RANKL 抗体和破骨细胞生成抑制因子 OCIF 的至少一种。

25. 用于治疗骨代谢异常的药物组合物, 该组合物含有具有序列列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 所示核苷酸序列的其中之一或互补于所述序列的部分序列的核苷酸序列。

26. 权利要求 23-25 中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症、类风湿性关节炎或癌性高钙血症。

27. 权利要求 23-25 中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症。

28. 权利要求 23-25 中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为类风湿性关节炎。

29. 权利要求 23-25 中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为癌性高钙血症。

30. 对骨代谢异常具有治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方

法，该方法包含下述步骤 1)-4):

1) 从来自哺乳动物的培养细胞中提取总 RNA 组分的步骤，其中所述培养细胞在添加了受试物质的培养基上培养；

2) 从来自哺乳动物的培养细胞中提取总 RNA 组分的步骤，其中所述培养细胞在未添加受试物质的培养基上培养；

3) 对于来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分测定选自下述多核苷酸中的至少一种多核苷酸或其部分多核苷酸的表达量的步骤，所述多核苷酸是：含有序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸和含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

4) 对通过上述步骤 3)测定的来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸表达量差异进行分析，判定受试物质对于骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

31. 具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-4):

1) 从采自给予了受试物质的哺乳动物个体的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

2) 从采自未给予受试物质的哺乳动物个体的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

3) 对于来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分测定选自下述多核苷酸中的至少一种多核苷酸或其部分多核苷酸的表达量的步骤，所述多核苷酸指：含有序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸和含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

4) 通过上述步骤(3)对测定来自上述步骤权利要求 1 的总 RNA 组分和来自上述步骤(2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸的表达量，对其差进行分析，判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

32. 具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-3):

1) 测定来自哺乳动物的培养细胞中下述其中之一的蛋白质或其部分多肽的表达量的步骤，其中所述培养细胞在添加有受试物质的培养

基上培养：上述蛋白质指含有 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质以及含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质；

2) 使用与在未添加受试物质的培养基上培养的来自哺乳动物培养细胞的上述步骤 1) 中任一项的蛋白质特异性结合的抗体或配体，检测该蛋白质的表达量的步骤；

3) 对在上述步骤权利要求 1 中检测的蛋白质表达量和在上述步骤 2) 中检测的该蛋白质的表达量的差异进行分析，判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

33. 具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-3):

1) 对采自给予了受试物质的哺乳动物个体的检样，测定下述其中之一蛋白质或其部分多肽的表达量的步骤：其含有序列表的 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质以及含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质；

2) 对采自未给予受试物质的哺乳动物个体的检样中的上述步骤权利要求 1 中任一项的蛋白质或其部分多肽的表达量进行测定的步骤；

3) 对在上述步骤 1) 中检测的蛋白质表达量和在上述步骤 2) 中检测的该蛋白质的表达量的差异进行分析，判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

34. 权利要求 30 或 31 的方法，其特征在于：测定多核苷酸的表达量的方法有 RNA 印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法、RT-PCR、核糖核酸酶保护测定或连缀测定。

35. 权利要求 30 或 31 的方法，其特征在于：测定多核苷酸的表达量的方法是使用由来自动物组织或动物细胞的互补的 DNA 组或含有所述 DNA 组各 DNA 的部分序列的 DNA 制备的基因芯片或阵列。

36. 权利要求 32 或 33 的方法，其特征在于：蛋白质表达量的测定方法采用与该蛋白质特异性结合的抗体或配体。

## 针对破骨细胞相关蛋白质的抗体

### 技术领域

本发明涉及可用作骨代谢异常的治疗和/或预防药剂的物质、可用作骨代谢异常的治疗和/或预防药剂的物质的筛选方法、骨代谢异常的检查方法以及骨代谢异常的治疗或预防方法。

### 背景技术

已知骨骼为维持其本身的形态变化或血钙浓度而总是重复形成和吸收，进行重建的动态性器官。正常的骨骼中存在由成骨细胞进行的骨形成和由破骨细胞进行的骨吸收的平衡关系，使骨量保持恒定。如果骨形成和骨吸收的平衡关系被破坏，则产生骨质疏松症等骨代谢异常(Endocrinological Review 13, 66-80 页, 1992; Principles of Bone Biology 87-102 页, 1996, (Academic Press, New York)).

有很多报道指出：调节骨代谢的因子有全身性激素或局部性细胞因子，通过这些因子的共同作用而进行着骨的形成和维持(Endocrinological Review 13, 66-80 页, 1992; Endocrinological Review 17, 308-332 页, 1996)。已知老龄化导致的骨组织的变化是骨质疏松症的发病，但是该发病机理有性激素的分泌低下或其受体异常、老化基因的表达、破骨细胞或成骨细胞的分化或功能不全等诸多方面，难以理解为老龄化的生理现象。骨质疏松症主要分为由于雌激素的分泌低下导致的绝经后骨质疏松症和老龄化导致的老年性骨质疏松症，为了了解其发病机理和开发治疗药物，必须在骨吸收和骨形成的调节机制方面加强基础研究。

破骨细胞是来自造血干细胞的多核细胞，通过在与骨的粘附面上释放氯离子和氢离子，使细胞与骨粘附面间隙成为酸性(American Journal of Physiology 260, C1315-C1324, 1991)。结果，引发磷酸钙的分解和酸性蛋白酶的活化，进行骨吸收。

还已知：破骨细胞的前体细胞受在骨表面的成骨细胞/基质细胞的细胞膜上表达的 RANKL (NF- $\kappa$ B 受体活化因子配体)的刺激，分化为破骨细胞(Proceedings of the National Academy of Science of the United

States of America 95, 3597-3602, 1998; Cell 93, 165-176, 1998)。还已知 RANKL 是成骨细胞/基质细胞所产生的膜结合因子, 其表达受骨吸收因子的调节, 以及 RANKL 诱导由破骨细胞前体细胞向多核破骨细胞的分化等(Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 95, 3597-3602, 1998; Journal of Bone and Mineral Research 23, S222, 1998)。并且还发现敲除 RANKL 的小鼠产生典型的骨硬化病发病, 由此证明 RANKL 是生理性破骨细胞分化诱导因子(Nature 397, 315-323, 1999)。

用于骨相关的疾病的治疗或缩短治疗期间的药物使用二膦酸盐、活性维生素 D3、降钙素及其衍生物、雌二醇等激素制剂、SERMs (选择性雌激素受体调节剂)、依普黄酮、维生素 K2 (四烯甲萘醌)和钙制剂等。但是, 这些制剂的治疗效果未必能满足要求, 人们希望开发治疗效果更高的药物。

树突细胞(以下称为“DC”)是免疫系统专门性的抗原呈递细胞, 分散分布于整个身体。树突细胞特异性跨膜蛋白质(以下称为“DC-STAMP”)作为跨树突细胞细胞膜的蛋白质, 是由来自单核细胞的 DC 的 cDNA 文库克隆的蛋白质(European Journal of Immunology 30, 3585-3590, 2000)。关于 DC-STAMP 的 cDNA, 目前在人类中已报道有一种(GenBank Accession No: NM\_030788), 在小鼠中报告有两种: 含有第三外显子的长序列(Accession No: AB109560)和短第三外显子的剪接变体(GenBank Accession No: AB109561)。来自人的 DC-STAMP 和来自小鼠的 DC-STAMP 之间的氨基酸序列同源性约为 74%。从氨基酸序列的疏水性分析结果可以推定: DC-STAMP 具有 7 个跨膜域。小鼠中短第三外显子的剪接变体缺失第 7 个跨膜域, 以下标记为 DC-STAMP  $\Delta T7$ 。

关于 DC-STAMP, 有报告指出: 通过 IL-4 使单核吞噬细胞失活, 则其表达提高, 用地塞米松失活, 则相反, 表达减少(Immunogenetics 53, 105-113, 2001), 但是 DC-STAMP 与破骨细胞的分化的相关性尚不清楚。

## 发明内容

本发明的目的在于提供用于测试抑制在各种骨代谢异常时特异表

达的基因、抑制破骨细胞活性的物质、以及测试预防或治疗骨代谢异常的药物的新型方法；并提供抑制破骨细胞活性的物质、骨代谢异常的预防药和/或治疗药。其中所述骨代谢异常是指在骨质疏松症、类风湿性关节炎、癌细胞的骨转移等中可见的骨破坏等。

本发明人在探索具有骨代谢异常的治疗和/或预防效果的物质，以了解破骨细胞的分化、成熟和活化功能，发现了 DC-STAMP 与破骨细胞的分化、成熟和活化有关，并发现抑制 DC-STAMP 的表达，则可抑制破骨细胞的分化，从而完成了本发明。

即，本发明包含以下内容：

(1) 抗体，该抗体与 DC-STAMP 特异性结合，抑制破骨细胞的形成。

(2) 抗体，该抗体与选自下述的至少一种蛋白质特异性结合，抑制破骨细胞的形成：所述蛋白指含有序列表的 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质和含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质。

(3) (1)或(2)的抗体，其特征在于：该抗体为单克隆抗体。

(4) (1)-(3)中任一项的抗体，其特征在于：该抗体是人源化抗体。

(5) (1)-(4)中任一项的抗体，其特征在于：该抗体是完全人抗体。

(6) (1)-(5)中任一项的抗体，其特征在于：该抗体是 IgG 抗体。

(7) 骨代谢异常的检测方法，该方法包含下述步骤 1)-4)：

1) 从由受试者采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

2) 从由正常人采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

3) 测定上述来自步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分中下述 a)或 b)中任一项的多核苷酸的表达量：

a) 具有 SEQ ID NO.1、3 和 5 中至少其中之一所示的核苷酸序列的多核苷酸；

b) 与含有互补于上述 a)的多核苷酸的核苷酸序列在严格条件下杂交的多核苷酸；

4) 对通过上述步骤 3)测定的来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸表达量的差进行分析，检测上述步骤 1)的受试者的骨代谢异常的步骤。

(8) 骨代谢异常的检测方法，该方法包含下述步骤 1)-3)：

1) 对于由受试者采集的检样, 测定具有 SEQ ID NO.2、4 和 6 中至少其中之一所示的氨基酸序列的蛋白质的表达量的步骤;

2) 对于由正常人采集的检样, 测定上述步骤 1) 中的至少其中一种蛋白质的表达量的步骤;

3) 对在上述步骤 1) 中检测的蛋白质的表达量和在上述步骤 2) 中测定的该蛋白质的表达量的差进行分析, 检测受试者的骨代谢异常的步骤。

(9) (7) 或 (8) 的方法, 其特征在于: 骨代谢异常是骨质疏松症、类风湿性关节炎和/或癌性高钙血症。

(10) (7) 或 (8) 的方法, 其特征在于: 骨代谢异常是骨质疏松症。

(11) (7) 或 (8) 的方法, 其特征在于: 骨代谢异常是类风湿性关节炎。

(12) (7) 或 (8) 的方法, 其特征在于: 骨代谢异常是癌性高钙血症。

(13) (7)、(9)-(12) 中任一项的方法, 其特征在于: 测定多核苷酸的表达量的方法是 RNA 印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法、RT-PCR、核糖核酸酶保护测定或连缀分析。

(14) (7)、(9)-(12) 中任一项的方法, 其特征在于: 测定多核苷酸的表达量的方法是: 使用由来自检样的互补 DNA 组或者含有该 DNA 组各 DNA 部分序列的 DNA 制备的基因芯片或阵列。

(15) (8)-(12) 中任一项的方法, 其特征在于: 蛋白质的表达量的测定方法采用与该蛋白质特异性结合的抗体或配体。

(16) (8)-(12) 中任一项的方法, 其特征在于: 蛋白质的表达量的测定方法为蛋白质印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法或固相酶联免疫定量法(ELISA 法)。

(17) 骨代谢异常检测试剂盒, 该试剂盒含有选自下述 1)-3) 中的至少一种:

1) 15-30 个碱基长度的连续寡核苷酸引物, 该引物用于特异性扩增含有序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 中至少一个所示的核苷酸序列的多核苷酸;

2) 15 个核苷酸或以上的连续多核苷酸探针, 该探针与含有序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 中的至少一个所示的核苷酸序列的多核苷酸在严格条件下杂交、用于检测该多核苷酸;

3) 固定有多核苷酸的固相化试样, 其中所述多核苷酸含有序列表

的 SEQ ID NO.1、3 和 5 中至少一个所示的核苷酸序列。

(18) 包含下述 1)和 2)的检测骨代谢异常的试剂盒, 该试剂盒包含:

1) 抗体, 该抗体与含有序列表的 SEQ ID NO.2、4 和 6 中至少一个所示的氨基酸序列的蛋白质特异性结合, 用于检测该蛋白质;

2) 可与上述 1)的抗体结合的二次抗体。

(19) (17)或(18)的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症、类风湿性关节炎或癌性高钙血症。

(20) (17)或(18)的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症。

(21) (17)或(18)的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为类风湿性关节炎。

(22) (17)或(18)的试剂盒, 其特征在于: 骨代谢异常为癌性高钙血症。

(23) 用于治疗骨代谢异常的药物组合物, 其特征在于: 该组合物含有(1)-(6)中的至少一种抗体。

(24) 用于治疗骨代谢异常的药物组合物, 其特征在于: 该组合物含有(1)-(6)的抗体的至少一种, 以及选自二膦酸盐、活性维生素 D<sub>3</sub>、降钙素及其衍生物、雌二醇等激素制剂、选择性雌激素受体调节剂 SERMs、依普黄酮、维生素 K<sub>2</sub>, 即四烯甲萘醌、钙制剂、甲状旁腺激素 PTH 制剂、非甾体性抗炎剂、抗 TNF $\alpha$  抗体、抗甲状旁腺激素相关蛋白 PTHrP 抗体、IL-1 受体拮抗剂、抗 RANKL 抗体和破骨细胞生成抑制因子 OCIF 的至少一种

(25) 用于治疗骨代谢异常的药物组合物, 该组合物含有具有序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 所示核苷酸序列的其中之一或互补于所述序列的部分序列的核苷酸序列。

(26) (23)-(25)中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症、类风湿性关节炎或癌性高钙血症。

(27) (23)-(25)中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为骨质疏松症。

(28) (23)-(25)中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为类风湿性关节炎。

(29) (23)-(25)中任一项的药物组合物, 其特征在于: 骨代谢异常为

癌性高钙血症。

(30) 对骨代谢异常具有治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-4):

1) 从来自哺乳动物的培养细胞中提取总 RNA 组分的步骤，其中所述培养细胞在添加了受试物质的培养基上培养；

2) 从来自哺乳动物的培养细胞中提取总 RNA 组分的步骤，其中所述培养细胞在未添加受试物质的培养基上培养；

3) 对于来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分测定选自下述多核苷酸中的至少一种多核苷酸或其部分多核苷酸的表达量的步骤，所述多核苷酸指：含有序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸和含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

4) 对通过上述步骤 3)测定的来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸表达量差异进行分析，判定受试物质对于骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(31) 具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-4):

1) 从采自给予了受试物质的哺乳动物个体的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

2) 从采自未给予受试物质的哺乳动物个体的检样中提取总 RNA 组分的步骤；

3) 对于来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分测定选自下述多核苷酸中的至少一种多核苷酸或其部分多核苷酸的表达量的步骤，所述多核苷酸指：含有序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸和含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸；

4) 通过上述步骤(3)对测定来自上述步骤(1)的总 RNA 组分和来自上述步骤(2)的总 RNA 组分之间的多核苷酸的表达量，对其差进行分析，判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(32) 具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-3):

1) 测定来自哺乳动物的培养细胞中下述蛋白质之一或其部分多肽

的表达量的步骤，其中所述培养细胞在添加有受试物质的培养基上培养：上述蛋白质指含有 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质以及含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质；

2) 使用与在未添加受试物质的培养基上培养的来自哺乳动物培养细胞的上述步骤 1) 中任一项的蛋白质特异性结合的抗体或配体，检测该蛋白质的表达量的步骤；

3) 对在上述步骤(1)中检测的蛋白质表达量和在上述步骤 2) 中检测的该蛋白质的表达量的差异进行分析，判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(33) 具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的筛选方法，该方法包含下述步骤 1)-3):

1) 对采自给予了受试物质的哺乳动物个体的检样，测定下述其中之一蛋白质或其部分多肽的表达量的步骤：其含有序列表的 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质以及含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质；

2) 对采自未给予受试物质的哺乳动物个体的检样的上述步骤(1)中任一项的蛋白质或其部分多肽的表达量进行测定的步骤；

3) 对在上述步骤 1) 中检测的蛋白质表达量和在上述步骤 2) 中检测的该蛋白质的表达量的差异进行分析，判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(34) (30)或(31)的方法，其特征在于：测定多核苷酸的表达量的方法有 RNA 印迹法、斑点印迹法、狭线印迹法、RT-PCR、核糖核酸酶保护测定或连缀测定。

(35) (30)或(31)的方法，其特征在于：测定多核苷酸的表达量的方法是使用由来自动物组织或动物细胞的互补的 DNA 组或含有该 DNA 组各 DNA 部分序列的 DNA 制备的基因芯片或阵列。

(36) (32)或(33)的方法，其特征在于：蛋白质表达量的测定方法采用与该蛋白质特异性结合的抗体或配体。

#### 附图简述

图 1 是表示通过 RNAKL 刺激，各 RAW264 亚克隆细胞向破骨细

胞分化的图。

图 2 是表示伴随着 RAW-D 细胞向破骨细胞分化而出现的 DC-STAMP 的 m-RNA 的表达的图。

图 3 是表示经 RNAKL、TNF $\alpha$  和 MIP-1 $\alpha$  刺激的 RAW-D 细胞中 DC-STAMP 的 m-RNA 的表达的图。

图 4 是表示经活性维生素 D3 刺激的初代骨髓细胞中 DC-STAMP 的 m-RNA 的表达的图。

图 5 是表示通过 DC-STAMP 的 siRNA 抑制 RAW-D 细胞向破骨细胞分化的图。

图 6 是表示通过 DC-STAMP 蛋白质的强制表达来促进 RAW-D 细胞形成破骨细胞的图。

图 7 是表示通过抗 DC-STAMP 抗体抑制 RAW-D 细胞形成破骨细胞的图。

图 8 是表示通过抗 DC-STAMP 抗体抑制小鼠骨髓细胞形成破骨细胞的图。

图 9 是表示通过抗 DC-STAMP 抗体抑制吸收窝形成的图。

图 10 是表示巨细胞瘤中人 RNAK、RNAKL、组织蛋白酶 K 和 TRAP 基因的表达分布的图。

图 11 是表示巨细胞瘤中人 DC-STAMP 基因的表达分布的图。

图 12 是表示通过抗 DC-STAMP 抗体抑制人末梢血单核细胞形成破骨细胞的图。

### 实施发明的最佳方式

本发明中，“在严格条件下杂交”是指在市售的杂交溶液 ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech Laboratories 制备)中、在 68℃ 进行杂交，或者使用固定有 DNA 的滤膜，在 0.7-1.0M NaCl 存在下、在 68℃ 进行杂交，然后在可通过用 0.1-2 倍浓度的 SSC 溶液(1 倍浓度的 SSC 含有 150 mM NaCl、15 mM 柠檬酸钠)在 68℃ 洗涤来鉴定的条件或与其同等的条件下杂交。

#### 1. DC-STAMP

本发明人发现 DC-STAMP 在巨细胞瘤中特异性表达。本发明人还发现在来自单核细胞的细胞株分化为破骨细胞时，DC-STAMP 表达量

增加。

本发明中所使用的 DC-STAMP 可从人、或者非人哺乳动物(例如豚鼠、大鼠、小鼠、鸡、兔、猪、绵羊、牛、猴等)的单核细胞、树突细胞或骨髓细胞直接纯化使用,或者制备上述细胞的细胞膜组分使用,还可以体外合成 DC-STAMP,或者通过基因操作使其在宿主细胞内生产获得。基因操作的具体方法是:将 DC-STAMP 整合到可表达的载体中,然后在含有转录和翻译所必须的酶、底物和能量物质的溶液中合成,或者通过使其转化其它原核生物或真核生物的宿主细胞,使 DC-STAMP 表达,由此可得到该蛋白质。

人 DC-STAMP 的 cDNA 的核苷酸序列以 Accession No: NM\_030788 登录在 GenBank 中,序列表的 SEQ ID NO.1 也表示该序列,其氨基酸序列表示为序列表的 SEQ ID NO.2。关于小鼠 DC-STAMP 的 cDNA 的核苷酸序列,含有第三外显子的长序列以 Accession No: AB109560 登录在 GenBank 上,也表示为序列表的 SEQ ID NO.3,其氨基酸序列表示在序列表的 SEQ ID NO.4 中。小鼠 DC-STAMP 的短第三外显子的剪接变体的 cDNA 的核苷酸序列以 Accession No: AB109561 登录在 GenBank 中,也表示在序列表的 SEQ ID NO.5 中,其氨基酸序列表示在序列表的 SEQ ID NO.6 中。DC-STAMP 的 cDNA 例如可如下获得:以表达 DC-STAMP 的 cDNA 文库为模板,使用特异性扩增 DC-STAMP 的 cDNA 的引物进行聚合酶链反应(以下称为“PCR”)(Saiki, R. K., 等人., Science, (1988)239, 487-49),即通过所谓的 PCR 法获得。

下述的多核苷酸也包含在 DC-STAMP 的 cDNA 中,所述多核苷酸是与含有互补于选自序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 的至少其中之一所示的核苷酸序列的核苷酸序列的多核苷酸在严格条件下杂交,并且编码与 DC-STAMP 具有同等生物活性的蛋白质。并且,下述多核苷酸也包含在 DC-STAMP 的 cDNA 中,所述多核苷酸是由人或小鼠 DC-STAMP 基因座转录的剪接变体或与其在严格条件下杂交,且编码与 DC-STAMP 具有同等生物活性的蛋白质的多核苷酸。

下述蛋白质也包含在 DC-STAMP 中:含有在选自序列表的 SEQ ID NO.2、4 和 6 的至少其中之一所示的氨基酸序列中一个或多个氨基酸取代、缺失、添加而得到的氨基酸序列,且与 DC-STAMP 具有同等的生物活性。并且下述蛋白质也包含在 DC-STAMP 中:含有在由人或

DC-STAMP 基因座转录的剪接变体所编码的氨基酸序列或该氨基酸序列中一或多个氨基酸取代、缺失、添加而得到的氨基酸序列，且与 DC-STAMP 具有同等的生物活性。

## 2. 骨代谢异常的检测

我们在对人各种骨组织检样群中的基因表达量进行分析时发现：DC-STAMP 基因在巨细胞瘤(GCT)中表达量显著增加，其中所述巨细胞瘤是破骨型多核巨细胞较多出现的骨肿瘤，其临床特征是产生骨溶解性的骨破坏(Bullough 等人., Atlas of Orthopedic Pathology 2nd edition, pp17.6-17.8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992))。

还发现：在来自单核细胞的细胞株分化为破骨细胞时 DC-STAMP 的表达量增加。

因此，可认为 DC-STAMP 与 GCT 等骨吸收亢进的人的病态相关。即，通过测定 DC-STAMP 在各细胞、和/或各组织中的表达量，可以判定可能是起因于 DC-STAMP 的过量表达而发生的骨代谢异常疾病的状态。本说明书中，骨代谢异常疾病包括骨质疏松症(绝经后骨质疏松症、老年性骨质疏松症、由于甾体或免疫抑制剂的使用导致的继发性骨质疏松症、伴随类风湿性关节炎的骨质疏松症)、类风湿性关节炎的骨破坏、癌性高钙血症、多发性骨髓瘤或伴随癌的骨转移的骨破坏、牙周膜炎导致的牙齿丧失、人工关节周围的骨溶解、慢性骨髓炎中的骨破坏、骨湿疹样癌、肾性骨营养不良、成骨不全症等，但并不限于这些。

作为本发明中研究 DC-STAMP 表达量的对象的“检样”是指由受试者或临床检样得到的血液、骨髓、骨、体液、前列腺、精巢、阴茎、膀胱、肾脏、口腔、咽、唇、舌、牙龈、鼻咽、食道、胃、小肠、大肠、结肠、肝脏、胆囊、胰脏、鼻、肺、软组织、皮肤、乳房、子宫、卵巢、脑、甲状腺、淋巴结、肌肉、脂肪组织等的组织或排泄物等的试样，本发明中更优选血液或骨髓。

### (1) 利用 DC-STAMP 基因的表达量检测骨代谢异常的方法

利用 DC-STAMP 基因表达量检测骨代谢异常的方法，具体来说包含以下步骤 1)-4)的方法。

- 1) 从由受试者采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤;
- 2) 从由正常人采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤;
- 3) 测定上述步骤 1) 的总 RNA 组分和上述步骤 2) 的总 RNA 组分中得 DC-STAMP 基因表达量的步骤;
- 4) 对通过上述步骤 3) 测定的来自上述步骤 1) 的总 RNA 组分和来自上述步骤 2) 的总 RNA 组分之间的基因表达量的差异进行分析, 检测上述步骤 1) 的受试者的骨代谢异常的步骤。

以下, 具体说明各步骤。

- a) 步骤 1) 从由受试者采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤:

从检样中提取总 RNA 组分时, 可通过以下方法回收细胞, 然后迅速地实施 RNA 提取步骤。其中所述方法有: 以符合恰当的实验伦理基准的方法获得来自人的组织, 将该组织用 RNA 提取溶剂(例如酚等包含具有使核糖核酸酶失活作用的成分的溶剂)直接溶解; 或者用刮棒小心刮取, 以不破坏该组织的细胞; 或者用胰蛋白酶等蛋白质分解酶稳定地从组织中提取细胞等。

RNA 的提取方法可以采用硫氰酸胍·氯化铯超离心法、硫氰酸胍·热酚法、盐酸胍法、酸性硫氰酸胍·酚·氯仿法(Chomczynski,P.和 Sacchi,N., Anal.Biochem. (1987), 162, 156-159)等, 优选酸性硫氰酸胍·酚·氯仿法。还可以使用市场销售的 RNA 提取试剂(例如 ISOGEN (Nippon Gene 公司制备)、TRIZOL 试剂(Gibco BRL 公司制备))等, 按照试剂所附的说明书使用。

所得的总 RNA 组分可根据需要进一步优选纯化至只有 mRNA 来使用。纯化方法没有特别限定, 例如可以使 mRNA 吸附于生物素化的 oligo(dT)探针, 再利用生物素/链霉抗生物素蛋白间的键, 将 mRNA 捕捉到固定有链霉抗生物素蛋白的顺磁性颗粒中, 然后进行洗涤操作, 通过洗脱, 可以纯化 mRNA。还可以采用将 mRNA 吸附于 oligo(dT)纤维素柱上, 然后将其洗脱进行纯化的方法。本发明的方法中, 这些 mRNA 纯化步骤不是必须的, 只要可以检测出检测对象的多核苷酸的表达即可, 也可以将总 RNA 组分用于后面的步骤。

- b) 步骤 2) 从由正常人采集的检样中提取总 RNA 组分的步骤:

本发明中, 正常人是具有不具有骨代谢异常的人。是否为正常人,

可通过测定 DC-STAMP 的浓度,判定是否在预先确定的正常人的值的范围内来判定,预先研究 DC-STAMP 的表达量与正常人的骨代谢异常的形成度的相关性,再测定由受试者采集的检样中 DC-STAMP 的表达量,由此来判定受试者是否为正常人。由正常人制备总 RNA 组分的步骤可与上述步骤 1)同样进行。

c) 步骤 3) 测定上述步骤 1)中的总 RNA 组分和上述步骤 2)中的总 RNA 组分的 DC-STAMP 基因表达量的步骤:

这里, DC-STAMP 基因表达量以含有序列表 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的多核苷酸、或者与互补于含有序列表 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的多核苷酸在严格条件下杂交的多核苷酸的表达量表示。

DC-STAMP 基因表达量的测定方法有使用固相化试样的测定方法、以及其它几种测定方法,以下对此进行说明。

(a) 使用固相化试样的测定方法

(i) 固相化试样

固相化试样可例举以下。

(1) 基因芯片:

可以使用固定有基于数据库上的 EST (表达序列标签)序列或 mRNA 序列合成的反义寡核苷酸的基因芯片。所述基因芯片可以使用 Affymetrix 公司制造的基因芯片(Lipshutz,R.J.等人., Nature Genet. (1999)21, suppliment, 20-24), 但并不限于此,也可以根据公知的方法制备。对来自人细胞的 mRNA 进行分析时,优选使用来自人的基因芯片,例如可使用 Affymetrix 公司制备的人 U95 组或 U133 组。但是并不限于此,例如也可以使用来自近缘种动物的基因芯片。

(2) 将由人总 RNA 或从特定组织得到的总 RNA 制备的 cDNA 或 RT-PCR 产物固定所得的阵列或薄膜滤器:

上述 cDNA 或 RT-PCR 产物是通过引物实施反转录酶反应或 PCR,由此克隆得到的,其中所述引物基于人的 EST 数据库等序列信息制备。该 cDNA 或 RT-PCR 产物也可以是利用扣除法(Diatchenki,L,等人, Proc. Natl.Acad.Sci.USA, (1996)93, 6025-6030)、差别展示技术(Liang,P.,等人 Nucleic Acids Res. ,(1992) 23,3685-3690)等,预先对具有骨代谢异常的人和不具有骨代谢异常的人之间的表达量不同的总 RNA

进行选择得到。另外，阵列或滤膜还可以使用市场销售的产品(例如 Intelli Gene: 宝生物制造等)，也可以将上述 cDNA 或 RT-PCR 产物用市售的点样器固定(例如 GMS417Arrayer: 宝生物制造等)来制备。

### (ii) 探针的制备和分析

标记探针不是使用特定的 mRNA 克隆，而是使用标记所表达的全部 mRNA。用于制备探针的起始材料可以使用未经纯化的 mRNA，但优选使用通过上述方法纯化的 Poly(A)+RNA。以下，对于使用各种固相化试样时的标记探针的制备方法和检测、分析方法进行说明。

#### (1) Affymetrix 公司制备的基因芯片：

按照 Affymetrix 公司制备的基因芯片所附说明书(Affymetrix 公司表达分析技术手册)，制备生物素标记的 cDNA 探针。接着，按照 Affymetrix 公司制备的基因芯片所附说明书(表达分析技术手册)，使用 Affymetrix 公司制造的分析装置(基因芯片清洗工作站 400)进行杂交和分析，检测抗生物素蛋白产生的发光，进行分析。

#### (2) 阵列：

通过反转录酶反应由 Poly(A)+RNA 制备 cDNA 时，必须标记 cDNA，使 cDNA 可检测，用荧光染料标记时，通过加入用荧光染料(例如 Cy3、Cy5 等)标记的 d-UTP 等，可以荧光标记 cDNA。此时，如果将从受试者采集的检样的 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 和由正常人采集的检样的 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 分别用不同的染料标记，则在之后的杂交时可以将两者混合使用。作为阵列，例如使用宝生物(株)制造并销售的阵列，可按照该公司的说明书进行杂交和洗涤，通过荧光信号检测仪(例如 GMS418 阵列扫描仪(宝生物(株)制造)等)检测荧光信号，然后进行分析。所使用的阵列不限于市场销售的产品，也可以是自制的阵列，特别是定制的。

#### (3) 薄膜滤器：

通过反转录酶由 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 制备 cDNA 时，通过加入放射性同位素(例如 d-CTP 等)制备标记探针，在按照常规方法进行杂交、例如使用市售的滤膜微阵列——Atlas System (Clontech Laboratories 制造)进行杂交和洗涤，然后用分析装置(Atlas Image: Clontech Laboratories 制造)进行检测、分析。

可以通过上述(1)-(3)中任一方法使来自人各组织的探针与同一批

固相化试样进行杂交。此时，除所使用的探针不同外，杂交条件均相同。使用荧光标记探针时，如果将各探针用不同的荧光染料标记，则可以将两种探针的混合物与一种固相化试样杂交，读取荧光强度 (Brown、P.O.等人. *Nature Genet.*, (1999)21, supplement, 33-37)。

#### (b) 其它测定方法

上述之外的测定方法还有：扣除克隆法(参照实验医学别册 新遗传子工学手册、羊土社出版(1996)32-35页)、差别显示法(基础生化学实验法 4 核酸·遗传子实验 II.应用编、东京化学同人(2001), 125-128页)、使用报道基因的方法(氯霉素乙酰转移酶(例如使用 pCAT3-Basic 载体: Promega 制备)或  $\beta$ -半乳糖苷酶(例如使用 p $\beta$ gal-Basic: Promega 制备)、分泌型碱性磷酸酶(例如使用 pSEAP2-Basic: Clontech Laboratories 制备)、绿色荧光蛋白质(例如使用 pEGFP-1: Clontech Laboratories 制备)), 但并不限于此。

d) 步骤 4) 对通过上述步骤(3)测定的来自上述步骤 1)的总 RNA 组分和来自上述步骤 2)的总 RNA 组分之间的基因的表达量差异进行分析，检测上述步骤 1)的受试者的骨代谢异常的步骤。

对来自正常人的检样和来自受试者的检样之间 DC-STAMP 表达量差异进行分析，对于 DC-STAMP 的表达量显著增加的检样，则可判定为存在骨代谢异常的可能性高，可以检测出骨代谢异常。表达量显著增加是指：例如使用 Affymetrix 公司的基因芯片、使用 Affymetrix 公司的 microarray Suite 3.0 版进行分析时，DC-STAMP 基因的平均差值比来自正常人的检样显著增加的情况。测定 DC-STAMP 基因的浓度，分析是否在预先确定的正常人数值范围内，如果超过所确定的正常人的值范围，则可判定具有骨代谢异常，由此可检测出骨代谢异常，另外通过预先研究 DC-STAMP 基因的表达量与正常人骨代谢异常形成度的相关性，测定由受试者采集的检样中 DC-STAMP 基因的表达量，由此可以判定受试者是否为正常人。

(2) 利用 DC-STAMP 的表达量(蛋白质表达量)检测骨代谢异常的方法

利用 DC-STAMP 的表达量检测骨代谢异常的方法具体包含以下步骤 1)-3)。

- 1) 测定由受试者采集的检样中 DC-STAMP 表达量的步骤;
- 2) 测定由正常人采集的检样中上述(1)的蛋白质表达量的步骤;
- 3) 对上述步骤 1)中测定的蛋白质表达量和上述步骤 2)中测定的该蛋白质表达量的差异进行分析, 检测受试者的骨代谢异常的步骤。

以下, 具体说明各步骤。

1) 步骤 1) 测定由受试者采集的检样中 DC-STAMP 表达量的步骤:

(a) 由检样制备用于测定蛋白质的试样

根据需要对检样进行高速离心, 除去不溶性物质, 然后如下制备用于 ELISA/RIA 的试样或用于蛋白质印迹的试样。

用于 ELISA/RIA 的试样例如可直接使用回收的血液或骨髓组织提取液, 也可以使用用缓冲液适当稀释所得。用于蛋白质印迹(用于电泳)的试样例如可直接使用血液或骨髓组织的提取液, 也可以用缓冲液适当稀释, 与含有用于 SDS-聚丙烯酰胺电泳的 2-巯基乙醇的样品缓冲液 (Sigma 制造等)混合。进行点样/狭线印迹时, 例如可以使用印迹装置等, 将回收的血液或骨髓组织提取液直接或用缓冲液适当稀释后所得直接吸附于膜上。

(b) 试样的固相化

为了特异性检测上述所得试样中的蛋白质, 可以通过免疫沉淀法、利用配体的键合的方法等使试样沉淀, 不经固定即进行检测, 也可以将直接检测的该试样固定。固定蛋白质时, 蛋白质印迹法、斑点印迹法或狭线印迹法中所使用的膜有: 硝基纤维素膜(例如 Biorad 制造等)、尼龙膜(例如 Hibond-ECL (Amersham Pharmacia 制造)等)、棉膜(例如 Blot Absorbent Filter (Biorad 制造)等)或聚二氟乙烯膜(PVDF) (例如 Biorad 制造等)等。

为了通过 ELISA 法/RIA 法进行蛋白质的检测、定量, 可以向专用的 96 孔板(例如 Immunoplate Maxisorp (Nalge International 制造))中加入试样或其稀释液(例如用含有 0.05% 叠氮化钠的磷酸缓冲生理盐水(以下称为“PBS”)稀释所得), 在 4℃-室温下静置过夜、或者在 37℃ 静置 1-3 小时, 使蛋白质吸附于孔内底面进行固定。

抗 DC-STAMP 抗体可如下获得：使用常规方法(例如参照新生化实验讲座 1、蛋白质 1、389-397 页、1992)，将 DC-STAMP 或选自 DC-STAMP 的氨基酸序列的任意多肽免疫动物，采集活体内产生的抗体并纯化。还可按照公知的方法(例如 Kohler 和 Milstein, Nature, (1975)256, 495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody, (1980) 365-367, Penum Press, N.Y.)，使产生抗 DC-STAMP 抗体的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合，构建杂交瘤，获得单克隆抗体。

作为抗原的 DC-STAMP 可通过基因操作，使 DC-STAMP 基因在宿主细胞内产生获得。具体来说，制备可表达 DC-STAMP 基因的载体，将其导入宿主细胞，使该基因表达，然后纯化表达的 DC-STAMP。或者，也可以利用表达 DC-STAMP 的宿主细胞本身或其膜片段作为抗原。

### (c) DC-STAMP 表达量的测定

DC-STAMP 的表达量以含有序列表 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质的表达量表示。

表达量的测定可使用上述抗 DC-STAMP 抗体，采用蛋白质印迹法或斑点/狭线印迹法等公知的方法测定。

2) 步骤 2) 测定由正常人采集的检样中上述 1)的蛋白质表达量的步骤：

由正常人采集的检样中 DC-STAMP 表达量的测定可通过与上述步骤 1)相同的方法进行。

3) 步骤 3) 对上述步骤 1)中测定的蛋白质表达量和上述步骤 2)中测定的该蛋白质表达量的差异进行分析，检测受试者的骨代谢异常的步骤。

对来自正常人的检样和来自受试者的检样之间 DC-STAMP 表达量的差异进行分析，对于 DC-STAMP 表达量显著增加的检样，可以判定其存在骨代谢异常的可能性高，由此可检测出骨代谢异常。

测定 DC-STAMP 的浓度，分析是否进入预先确定的正常人的值范围，如果超过确定的正常人的值范围，则可判定具有骨代谢异常，由此可检测骨代谢异常，预先研究 DC-STAMP 的表达量与正常人骨代谢的相关性，测定由受试者采集的检样中 DC-STAMP 的表达量，由此可以判定受试者是否为正常人。

### 3. DC-STAMP 基因和 DC-STAMP 的鉴定

DC-STAMP 基因和 DC-STAMP 在巨细胞瘤中特异性表达, 另外在来自单核细胞的细胞株分化为破骨细胞时, 其表达量增加。

(1) 利用 DC-STAMP 的过量表达对 DC-STAMP 基因和 DC-STAMP 的功能进行分析

作为研究 DC-STAMP 的功能的方法, 首先按照集落杂交法等公知的方法, 从来自表达 DC-STAMP 的细胞的 cDNA 文库中获得全长 cDNA。将该全长 cDNA 导入来自人的细胞或来自非人的哺乳动物细胞(例如来自豚鼠、大鼠、小鼠、鸡、兔、猪、绵羊、牛、猴的细胞等), 使其高表达, 研究其对细胞是否产生影响。

为了使 cDNA 在动物个体内表达, 可采用将所得全长 cDNA 整合到病毒载体中给予动物的方法。通过病毒载体进行基因导入的方法例如有将 cDNA 整合到反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒等 DNA 病毒或者 RNA 病毒中的方法。其中, 优选使用反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的方法。

非病毒性的基因导入方法有: 将表达制粒直接给予肌肉的方法(DNA 疫苗法)、脂质体法、脂转染法、微注射法、磷酸钙法、电穿孔法等, 其中优选 DNA 疫苗法、脂质体法。

将全长 cDNA 导入来自人的细胞、来自非人的哺乳动物细胞(例如来自豚鼠、大鼠、小鼠、鸡、兔、猪、绵羊、牛、猴的细胞等)中的来自单核细胞的细胞、来自淋巴结细胞、肌细胞、肝脏细胞、脂肪细胞、或皮肤细胞等, 使其高表达, 可以研究对于各靶细胞所具有的功能、具体来说是破骨细胞的分化或成熟等与骨代谢相关的功能, 或者细胞的形态表现出什么样的影响。

将全长 cDNA 导入动物或细胞时, 将该 cDNA 整合到含有适当的启动子和与表型表达相关的序列的载体中, 通过该载体转化宿主细胞。脊椎动物细胞的表达启动子可以使用通常位于要表达的基因的上游的启动子, 具有 RNA 的剪切位点、聚腺苷酸化位点、以及转录终止序列等的序列, 还可以根据需要具有复制起点。该表达载体的例子有: 具有 SV40 的早期启动子的 pSV2dhfr (Subramani,S. 等.,

Mol.Cell.Biol.,(1981)1, 854-864)、具有 CMV 的早期启动子的 pCI-neo (Promega 制造)、反转录病毒载体 pLNCX、pLNSX、pLXIN、pSIR(Clontech 制造)、粘粒载体 pAxCw(宝生物制造)等,但并不限于这些。该表达载体可以通过二乙氨基乙基(DEAE)-葡聚糖法(Luthman,H.和 Magnusson,G., Nucleic Acids Res., (1983)11, 1295-1308)、磷酸钙-DNA 共沉淀法(Graham,F.L.和 van der Eb,A.J., Virology, (1973) 52, 456-457)、以及电脉冲穿孔法(Neumann, E.等., EMBO J.,(1982) 1, 841-845)等,整合到来自小鼠单核细胞的细胞 RAW264.7 (ATCC Cat.No.TIB-71)、RAW264 细胞(ECACC Cat. No. 85062803)、RAW-D 细胞(Watanabe 等., J. Endocrinol., (2004)180, 193-201)、猴子细胞 COS 细胞 (Gluzman,Y., Cell, (1981) 23, 175-182, ATCC: CRL-1650)或中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO 细胞、ATCC: CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺失细胞株 (Urlaub,G.和 Chasin, L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980) 77, 4126-4220)、来自人胎儿肾脏的 293 细胞(ATCC: CRL-1573)等,但并不限于此,如上,可得到所需要的转化体。

还可通过基因操作,在正常动物中制备使目标基因高表达的转基因动物,以研究其对细胞形态有怎样的影响。

## (2) 通过抑制 DC-STAMP 表达量对 DC-STAMP 的功能进行分析

通过抑制 DC-STAMP 的表达量,研究对破骨细胞的分化或破骨细胞的成熟、细胞的形态有怎样的影响,由此可以分析 DC-STAMP 的功能。

抑制 DC-STAMP 表达的物质可以有: DC-STAMP 基因的反义核酸、siRNA 等。抑制 DC-STAMP 的功能的物质有: 与 DC-STAMP 特异性结合的抗体。

抑制 DC-STAMP 的表达、或者抑制 DC-STAMP 的功能时,可以研究对各靶细胞所具有的功能、具体来说破骨细胞分化或成熟等骨代谢相关功能或者细胞形态有怎样的影响。另外,在具有骨代谢异常的动物或不具有骨代谢异常的动物中,制备使 DC-STAMP 基因破坏的基因敲除动物,可以判定细胞或组织的状态。

## 4. 用于 DC-STAMP 基因和/或 DC-STAMP 检测的试剂盒

可以使用含有选自下述 1)-5)的至少一种或多种的试剂盒检测 DC-STAMP 基因和/或 DC-STAMP。

1) 15-30 个碱基长度的连续寡核苷酸引物, 该引物用于特异性扩增选自下述至少其中之一多核苷酸: 含有序列表 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸、以及含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸;

2) 15 个核苷酸或以上的连续多核苷酸探针, 该探针与选自下述至少其中之一多核苷酸在严格条件下杂交, 用于检测该多核苷酸: 含有序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸、以及含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸;

3) 固相化试样, 该固相化试样固定有选自下述至少其中之一多核苷酸: 含有序列表 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列的多核苷酸、含有 SEQ ID NO.3 所示的核苷酸序列的多核苷酸、以及含有 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列的多核苷酸;

4) 抗体, 该抗体与选自下述至少其中之一蛋白质特异性结合, 用于检测该蛋白质: 含有序列表 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的蛋白质、含有 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列的蛋白质、以及含有 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列的蛋白质;

5) 可与上述 4)的抗体结合的二次抗体。

上述 1)的引物可基于 DC-STAMP 基因的核苷酸序列(序列表 SEQ ID NO.1、3 和/或 5 所示的核苷酸序列), 使用市售的引物设计软件(例如 Wisconsin GCG package Version 10.2)等, 按照常规方法容易地设计并扩增。上述(2)的探针是与 DC-STAMP 特异性杂交的多核苷酸, 为 100-1500 个碱基长度, 优选 300-600 碱基长度。这些引物或探针可通过适当的标记进行标记(例如酶标、放射性标记、荧光标记等), 还可以添加接头。

上述 3)的固相化试样可通过将上述 2)的探针固定在玻璃板、尼龙膜等固相上来制备。所述固相化试样的制备方法如上述“2. 骨代谢异常的检测”项目中“(1)利用 DC-STAMP 基因的表达量检测骨代谢异常的方法”项中所说明, 例如有基因芯片、cDNA 阵列、寡聚阵列、薄膜过滤器等。

本发明的试剂盒还可以含有耐热性 DNA 聚合酶、dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 的混合物)和缓冲液。耐热性 DNA 聚合酶的例子有：Taq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶(宝酒造制造)、Tth DNA 聚合酶、Tfu DNA 聚合酶等。缓冲液根据所使用的 DNA 聚合酶选择，根据需要可以添加  $Mg^{2+}$  等。

上述 4)和 5)的抗体可通过上述“2. 骨代谢异常的检测”项目中“(2)利用 DC-STAMP 的表达量(蛋白质的表达量)检测骨代谢异常的方法”项或“6. 抗 DC-STAMP 抗体的制备”项中所记载的方法制备。该抗体也可以用适当的标记进行标识(例如酶标、放射性标记、荧光标记等)。

本发明的试剂盒可用于检测 DC-STAMP 基因和/或 DC-STAMP，可用于判定骨代谢异常的有无、或筛选抑制骨代谢异常病态进程的物质。

#### 5. 抑制向破骨细胞分化的物质的筛选方法

本发明的一个方案是通过测定 DC-STAMP 基因和/或 DC-STAMP 的表达量，筛选抑制向破骨细胞分化的物质的方法。

本发明的一个方案是通过对抑制 DC-STAMP 的破骨细胞分化促进活性的物质进行鉴定，筛选具有骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的物质的方法。

“受试物质”是指通过本发明的筛选方法研究具有破骨细胞分化抑制活性的对象物质。受试物质有：化合物、微生物的代谢产物、植物或动物组织的提取物、它们的衍生物或它们的混合物等。另外，设计成使 DC-STAMP 的表达量降低的核酸或其衍生物(包括反义寡核苷酸、核酶、dsRNA、siRNA 等)也可作为受试物质使用。受试物质的给予量或浓度可适当设定，或者例如制成稀释系列等，设定多种给予量，也可以以固体、液体等适当状态给予，还可以溶解于适当的缓冲液或添加稳定剂等。使用培养细胞进行筛选的方法中，可以添加到培养基中培养。添加到培养基中时，可以在培养开始时添加，也可以在培养中途添加，另外，添加次数也不限于一次。在受试物质存在下进行培养期间也可适当设定，优选 30 分钟-2 周，更优选 30 分钟-48 小时。将受试物质给予哺乳动物个体时，根据受试物质的性质等，可以分为肠道内给予、静脉注射、腹腔内注射、经皮给予、皮下注射等给予形

式。从给予受试物质后到获得检样的时间可适当选择。

本发明的筛选方法中使用的培养细胞只要是表达 DC-STAMP 的哺乳动物细胞即可，可以是正常的细胞，也可以是癌细胞等显示异常增殖的细胞，例如有：来自小鼠单核细胞的细胞 RAW264.7 (ATCC Cat. No TIB-71)、RAW264 细胞(ECACC Cat. No. 85062803)、RAW-D 细胞(Watanabe 等., J. Endocrinol., (2004)180, 193-201)、来自小鼠骨髓的初代培养细胞等，但并不限于这些。培养细胞的哺乳动物种优选人、小鼠或其它哺乳动物(豚鼠、大鼠、鸡、兔、猪、绵羊、牛、猴等)，但并不限于这些。培养成细胞更优选使用过量表达 DC-STAMP 的哺乳动物细胞，例如有：将 DC-STAMP 基因与其启动子区一起导入、过量表达 DC-STAMP 的 RAW264.7 细胞、RAW264 细胞、RAW-D 细胞等。

本发明的筛选方法也包含不使用培养细胞，将受试物质给予哺乳动物个体，然后检测由该动物个体摘除的器官或组织细胞中 DC-STAMP 基因的表达的方法。作为基因表达的检测对象的器官或组织只要是表达 DC-STAMP 即可，优选发生骨代谢异常的组织，更优选骨髓。哺乳动物种可以使用非人哺乳动物，优选小鼠、大鼠或仓鼠，更优选小鼠或大鼠。显示骨代谢异常的动物模型可以使用：卵巢摘除动物，精巢摘除动物，将肿瘤细胞移植到皮下、皮内、左心室、骨髓、静脉或腹腔等中的癌症动物，坐骨神经切除动物，佐剂性关节炎模型动物，胶原诱发性关节炎模型动物，糖皮质激素诱发性骨质疏松症模型动物，促老化小鼠(SAMP6 小鼠、Matsushita 等., Am. J. Pathol. 125, 276-283 (1986))，甲状腺·甲状旁腺摘除动物，持续注入甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)的动物，破骨细胞形成抑制因子(OCIF)敲除小鼠(Mizuno 等., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998)247, 610-615)等。还可以使用牙周病导致牙齿丧失模型动物或使 DC-STAMP 过量表达的动物。将经筛选选择的受试物质给予上述动物模型，测定骨组织中破骨细胞数、骨密度、骨强度或血钙浓度等因骨代谢异常而引起变动的参数，由此可以评价该受试物质对于骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果。

本发明的方法中使用的培养细胞只要是在下述条件下培养即可：未添加受试物质的情况下添加 RANKL 和 TNF- $\alpha$ ，DC-STAMP 可表达的条件，可以在任何条件下培养。例如对该培养细胞的公知的培养条

件是已知的，在该条件下该细胞表达 DC-STAMP，则即可在该条件培养。在检测由哺乳动物个体摘除的器官或组织中的 DC-STAMP 的表达时，该动物的饲养条件只要是在未添加受试物质的情况下可表达 DC-STAMP 的条件即可。

研究受试物质对 DC-STAMP 的表达的影响的方法有：测定 DC-STAMP 基因的表达量的方法、测定 DC-STAMP 基因的翻译产物——DC-STAMP 的表达量的方法。可以认为，抑制 DC-STAMP 基因和/或 DC-STAMP 的表达的受试物质是对骨代谢异常、优选骨质疏松症、类风湿性关节炎和/或癌性高钙血症具有治疗效果和/或预防效果的物质。

关于从培养细胞中提取总 RNA、测定 DC-STAMP 基因的表达量、测定 DC-STAMP 的表达量，可以按照上述“2. 骨代谢异常的检测”项中记载的方法进行。使用来自哺乳动物的培养细胞时，可根据需要，将受试物质与 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  一起适当添加在培养基中，在不添加受试物质的对照中适当添加 RNAKL 和 TNF- $\alpha$ 。

#### (1) 使用 DC-STAMP 基因的方法

本发明的筛选方法例如有使用来自哺乳动物的培养细胞的方法和使用哺乳动物个体的方法，以下分别介绍。

##### (a) 使用来自哺乳动物的培养细胞的方法

###### (i) 该方法包含以下步骤 1)-3):

1) 由来自哺乳动物的培养细胞提取总 RNA 的步骤，其中所述培养细胞在添加有受试物质的培养基中培养；

2) 对于来自 1) 的总 RNA 和来自未添加受试物质进行培养的哺乳动物培养细胞的总 RNA，检测其 DC-STAMP 基因表达量的差异的步骤；

3) 对 2) 的基因表达量的差异进行分析，判定受试物质对于骨代谢异常的治疗和/或预防效果的步骤。

###### (ii) 包含以下步骤 1)-4)。

1) 由来自哺乳动物的培养细胞提取总 RNA 的步骤，其中所述培养细胞在添加了受试物质的培养基中培养；

2) 由来自哺乳动物的培养细胞提取总 RNA 的步骤，其中所述培养细胞在未添加受试物质的培养基中培养；

3) 对来自上述 1) 的总 RNA 和来自上述 2) 的总 RNA 测定其 DC-STAMP 基因表达量的步骤;

4) 对通过上述 3) 测定的来自上述 1) 的总 RNA 和来自上述 2) 的总 RNA 之间的基因表达量差异进行分析, 判定受试物质对于骨代谢异常的治疗和/或预防效果的步骤。

(b) 使用哺乳动物个体的方法

(i) 包含以下步骤 1)-3)。

1) 从给予了受试物质的哺乳动物个体中采集检样, 由该检样提取总 RNA 的步骤;

2) 对于来自 1) 的总 RNA 和从由未给予受试物质的动物个体采集的检样得到的总 RNA, 检测其 DC-STAMP 基因表达量的差异的步骤;

3) 分析上述 2) 的基因表达量的差异, 判定受试物质对于骨代谢异常的治疗和/或预防效果的步骤。

(ii) 含有以下步骤 1)-4)。

1) 从给予受试物质的哺乳动物个体中采集检样, 由该检样提取总 RNA 的步骤;

2) 从未给予受试物质的哺乳动物个体中采集检样, 由该检样提取总 RNA 的步骤;

3) 对来自上述步骤 1) 的总 RNA 和来自上述步骤 2) 的总 RNA 中的 DC-STAMP 基因表达量进行测定的步骤;

4) 对 3) 的基因表达量差异进行分析, 判定受试物质对于骨代谢异常的治疗和/或预防效果的步骤。

(2) 使用 DC-STAMP 的方法

关于利用测量 DC-STAMP 表达量进行筛选的方法、使用哺乳动物培养细胞的方法和使用动物个体的方法, 分别包含以下步骤。

(a) 使用来自哺乳动物的培养细胞的方法

(i) 包含以下步骤(1)和(2):

1) 测定来自哺乳动物的培养细胞中的 DC-STAMP 表达量的步骤, 其中所述培养细胞在添加有受试物质的培养基中培养;

2) 对 1) 中测定的蛋白质的表达量和在未添加受试物质的培养基上培养的来自哺乳动物的培养细胞中该蛋白质表达量的差异进行分析,

判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(ii) 包含以下步骤 1)-3):

1) 对在添加有受试物质的培养基上培养的、来自哺乳动物的培养细胞中的 DC-STAMP 蛋白质表达量进行测定的步骤;

2) 对在未添加受试物质的培养基上培养的、来自哺乳动物的培养细胞中上述 1)的蛋白质表达量进行测定的步骤;

3) 对由上述 1)测定的蛋白质表达量和由上述 2)测定的该蛋白质表达量的差异进行检测, 判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(iii) 包含以下步骤 1)-3):

1) 在添加有受试物质的培养基上培养来自哺乳动物的细胞, 将由该培养细胞得到的总蛋白质固定的步骤;

2) 对上述固相化蛋白中的 DC-STAMP 蛋白质表达量进行测定的步骤;

3) 对上述 2)中检测的 DC-STAMP 表达量和由在未添加受试物质的培养基中培养的来自哺乳动物的培养细胞得到的总蛋白质中该蛋白质的表达量的差异进行分析, 判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(iv) 包含以下步骤 1)-5):

1) 在添加有受试物质的培养基中培养来自哺乳动物的细胞, 将由该培养细胞得到的总蛋白质进行固定的步骤;

2) 在未添加受试物质的培养基中培养来自哺乳动物的细胞, 将从该培养细胞得到的总蛋白质进行固定的步骤;

3) 使用与 DC-STAMP 蛋白质特异性结合的抗体或配体, 对上述步骤 1)的固相化蛋白质中该蛋白质的表达量进行测定的步骤;

4) 使用与 DC-STAMP 特异性结合的抗体或配体, 对上述步骤 2)的固相化蛋白中该蛋白质的表达量进行测定的步骤;

5) 对上述步骤 3)中测定的蛋白质表达量和上述步骤 4)中测定的蛋白质表达量的差异进行分析, 判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(b) 使用哺乳动物个体的方法

(i) 包含以下步骤 1)和 2):

1) 对由给予了受试物质的哺乳动物个体采集的检样, 测定其 DC-STAMP 蛋白质表达量的步骤;

2) 对上述步骤 1) 中测定的 DC-STAMP 的表达量和由未给予受试物质的哺乳动物个体采集的检样中该蛋白质表达量的差异进行分析, 判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(ii) 包含以下步骤 1)-3):

1) 使用与 DC-STAMP 蛋白质特异性结合的抗体或配体, 对由给予了受试物质的哺乳动物个体采集的检样中的该蛋白质表达量进行测定的步骤;

2) 测定由未给予受试物质的哺乳动物个体采集的检样中该蛋白质的表达量的步骤;

3) 对 1) 中测定的 DC-STAMP 蛋白质的表达量和 2) 中测定的该蛋白质的表达量的差异进行分析, 判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(iii) 包含以下步骤 1)-3):

1) 从给予了受试物质的哺乳动物个体采集检样, 将该检样中的总蛋白质进行固定的步骤;

2) 对上述固相化蛋白中 DC-STAMP 蛋白质的表达量进行测定的步骤;

3) 对上述 2) 中检测的 DC-STAMP 蛋白质的表达量和由未给予受试物质的哺乳动物个体采集的检样中的该蛋白质的表达量的差异进行分析, 判定受试物质对骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

(iv) 包含以下步骤 1)-5):

1) 由给予了受试物质的哺乳动物个体中采集检样, 将检样中的总蛋白质进行固定的步骤;

2) 由未给予受试物质的哺乳动物个体中采集检样, 将检样中的总蛋白质进行固定的步骤;

3) 使用与 DC-STAMP 蛋白质特异性结合的抗体或配体, 对上述步骤 1) 的固相化蛋白质中该蛋白质的表达量进行检测的步骤;

4) 使用与 DC-STAMP 蛋白质特异性结合的抗体或配体, 对上述 2) 的固相化蛋白质中该蛋白表达量进行检测的步骤;

5) 对上述 3) 中检测的蛋白质表达量和上述 4) 中检测的该蛋白质表

达量的差异进行分析, 判定受试物质对于骨代谢异常的治疗效果和/或预防效果的步骤。

### (3) 其它方法

对过量表达 DC-STAMP 的哺乳动物个体给予受试物和不给予受试物质, 随时间测定骨代谢异常的发生率、骨代谢异常的程度、和/或存活率等。给予了受试物质的哺乳动物中, 骨代谢异常发生率显著降低、骨代谢异常的程度显著小、和/或存活率约为 10%或以上, 优选为约 30%或以上, 更优选上升到 50%或以上, 此时可以选择该受试物质作为对骨代谢异常具有治疗和/或预防效果的化合物。

## 6. 抗 DC-STAMP 抗体的制备

### (1) 抗原的制备

用于制备抗 DC-STAMP 抗体的抗原可以是 DC-STAMP 或含有其至少 6 个连续的部分氨基酸序列的多肽、或者在它们上附加有任意的氨基酸序列或载体的衍生物。

DC-STAMP 可直接从血细胞或骨髓细胞中纯化使用, 也可以制备这些细胞的细胞膜组分使用, 还可以体外合成 DC-STAMP, 或者通过基因操作使其在宿主细胞中生成获得。

原核细胞宿主例如有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等。将目标基因转化这些宿主细胞内, 可以用含有来自适合宿主的种的复制子即复制起点和调控序列的质粒载体转化宿主细胞。载体优选具有可使转化细胞具有表达性状(表型)选择性的序列。

例如, 常使用 K12 菌株等这些大肠杆菌, 载体通常可使用 pBR322 或 pUC 系的质粒, 但并不限于于此, 公知的各种菌株以及载体均可使用。

作为启动子, 大肠杆菌中有: 色氨酸启动子(trp)、乳糖启动子(lac)、色氨酸·乳糖(tac)启动子、脂蛋白(lpp)启动子、多肽链延伸因子 Tu (tufB)启动子等, 任何启动子均可以用作目标多肽的生产。

枯草杆菌例如优选 207-25 菌株, 载体可以使用 pTUB228 (Ohmura, K.等. (1984) J. Biochem. 95, 87-93)等, 但并不限于于此。通过连接编码枯草杆菌的  $\alpha$ -淀粉酶信号肽序列的 NDA 序列, 可以在菌体外分泌表达。

真核细胞的宿主细胞包含脊椎动物、昆虫、酵母等细胞，脊椎动物例如可以使用：来自小鼠单核细胞的细胞 RAW264.7 (ATCC Cat. No TIB-71)、RAW264 细胞(ECACC Cat. No. 85062803)、RAW-D 细胞(Watanabe 等., J. Endocrinol., (2004)180, 193-201)、猴子细胞 COS 细胞(Gluzman, Y., Cell, (1981)23, 175-182、ATCC CEL-1650)、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 (ATCC No.CRL-1658)或中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞、ATCC CCL-61)的二氢叶酸还原酶缺失细胞株(Urlaub, G.和 Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980)77, 4126-4220)等，但并不限于此。

脊椎动物的表达启动子通常可以使用位于要表达的基因的上游的启动子，具有 RNA 的剪切位点、聚腺苷酸化位点、以及转录终止序列等的启动子，还可根据需要具有复制起点。该表达载体的例子有：具有巨细胞病毒早期启动子的 pCDNA3.1 (Introgen 制备)、具有 SV40 的早期启动子的 pSV2dhfr (Subramani, S.等., Mol. Cell. Biol., (1981)1, 854-864)等，但并不限于此。

以使用 COS 细胞或 NIH3T3 细胞作为宿主细胞的情况为例，表达载体可以使用具有 SV40 复制起点、可在 COS 细胞或 NIH3T3 细胞中自主增殖、并且具备转录启动子、转录终止信号、和 RNA 剪切位点的表达载体。该表达载体可以通过 DEAE-葡聚糖法(Luthman, H.和 Magnusson, G., Nucleic Acids Res., (1983)11, 1295-1308)、磷酸钙-DNA 共沉淀法(Graham, F. L.和 van der Eb, A. J., Virology, (1973)52, 456-457)、和电脉冲穿孔法(Neumann, E.等., EMBO J., (1982)1, 841-845)等整合到 COS 细胞或 NIH3T3 细胞中，可得到所希望的转化细胞。另外，使用 CHO 细胞作为宿主细胞时，可以将可表达发挥抗生素 G418 抗性标记功能的 neo 基因的载体例如 pRSVneo (Sambrook, J.等. (1989) : “Molecular Cloning A Laboratory Manual“ Cold Spring Harbor Laboratory, NY)或 pSV2neo (Southern, P. J.等 Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., (1982)1, 327-341)等与表达载体一起共转化，通过选择 G418 抗性集落，可得到稳定地生成目标多肽的转化细胞。

上述所得转化体可按照常规方法培养，通过该培养，可在细胞内、细胞膜上或细胞外生产目标多肽。该培养使用的培养基可根据所采用的宿主细胞来适当选择常用的各种培养基，例如如果是上述 COS 细

胞,则可以使用根据需要在 RPMI1640 培养基或 Dulbecco's 改性 Eagle 培养基(以下称为“DMEM”)等培养基上添加胎牛血清等血清成分的培养基。

通过上述培养,在转化体的细胞内、细胞膜上或细胞外生产的重组蛋白可通过利用该蛋白质的物理性质或化学性质等的各种公知的分离操作方式进行分离、纯化。该方法的具体例子有:通过通常的蛋白质沉淀剂进行的处理、超滤、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附色谱、离子交换色谱、亲和层析、高效液相色谱(HPLC)等各种液相色谱,透析法,以及它们的组合等。还可以通过将含有 6 个残基的组氨酸与上述表达的重组蛋白连接,通过镍亲和柱高效地进行纯化。通过将上述方法组合,可容易且高收率、高纯度的大量制备目标多肽。上述蛋白质在细胞膜上生成时,通过制备细胞膜组分,可以进行分离、粗纯化。

## (2) 抗 DC-STAMP 单克隆抗体的制备

与 DC-STAMP 特异性结合的抗体的例子有:与 DC-STAMP 特异性结合的单克隆抗体,其获得方法如下所述。

在制备单克隆抗体时,以下的操作步骤是必要的。即,

- (a) 作为抗原使用的生物高分子的纯化;
- (b) 向动物注射抗原进行免疫,然后采集血液,鉴定其抗体滴度,确定脾脏摘除时间,然后制备抗体生成细胞的步骤;
- (c) 制备骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”);
- (d) 抗体生成细胞和骨髓瘤的细胞融合;
- (e) 选择生成目标抗体的杂交瘤群;
- (f) 分割成单细胞克隆(克隆);
- (g) 根据情况,培养用于大量制备单克隆抗体的杂交瘤,或培育移植有杂交瘤的动物;
- (h) 研究上述制备的单克隆抗体的生理活性及其结合特异性,或者鉴定标记试剂的特性等。

以下,按照上述步骤对单克隆抗体的制备方法进行详述,但该抗体的制备方法并不限于此,例如也可以使用脾细胞以外的抗体生成细胞和骨髓瘤。

### (a) 抗原的纯化

可以使用按照上述方法制备的 DC-STAMP 或其一部分作为抗原。也可以使用由 DC-STAMP 表达重组细胞制备的膜组分、或者使用 DC-STAMP 表达重组细胞本身、还可以用本领域技术人员周知的方法进行化学合成得到的本发明的蛋白质部分肽作为抗原。

#### (b) 抗体生成细胞的制备

将步骤(a)中所得的抗原、氟氏完全或不完全佐剂、或者铝钾矾等助剂混合，以此作为免疫原，对实验动物进行免疫。实验动物只要是公知的杂交瘤制备方法中所使用的动物均可使用。具体例如可使用小鼠、大鼠、山羊、绵羊、牛、马等。从容易获得与摘除的抗体生成细胞融合的骨髓瘤细胞的角度考虑，优选以小鼠或大鼠作为被免疫动物。对于实际使用的小鼠和大鼠的系统没有特别限制，小鼠例如可以是各系统 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB、129 等，为大鼠时，例如可使用 Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等。这些小鼠和大鼠例如可从日本 CLEA、日本 Charles River Laboratories、日本 SLC、The Jackson Laboratories 等实验动物培育销售商购得。其中，从与后述的骨髓瘤细胞的融合配合性考虑，特别优选小鼠中的 BALB/c 系统、大鼠中的 low 系统作为被免疫动物。考虑到人和小鼠的抗原同源性，优选使用除去了自身抗体、使生物体功能下降的小鼠，即自身免疫疾病小鼠。这些小鼠或大鼠在免疫时的周龄优选为 5-12 周龄，进一步优选 6-8 周龄。

通过 DC-STAMP 或其重组体进行动物免疫时，例如可采用 Weir,D.M.,Handbook of Experimental Immunology Vol.I. II. III.,Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat,E.A.和 Mayer,M.M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield,Illinois (1964)等中详细记载的公知的方法。这些免疫方法中，以下具体给出本发明优选的方法，例如有以下。首先，将作为抗原的膜蛋白组分或表达抗原的细胞皮内或腹腔内给予动物。为提高免疫效率，优选两者兼用，如果前半阶段进行皮内给予，后半阶段或者只在最后进行腹腔内给予，则可特别提高免疫效率。给予抗原的周期根据被免疫动物的种类、个体差异等而不同，通常抗原给予次数为 3-6 次、抗原给予间隔为 2-6 周，进一步优选给予次数为 3-4 次、

给予间隔为 2-4 周。过度增加给予次数，则浪费抗原，另外过度扩大给予间隔，则动物老化导致细胞活性降低，故不优选。抗原给予量根据动物的种类、个体差异等不同，通常为 0.05-5 ml，优选 0.1-0.5 ml 左右。追加免疫在上述给予抗原 1-6 周后、优选 2-4 周后、进一步优选 2-3 周后进行。该追加免疫的时间长过 6 周或者比 1 周短，则没有追加免疫的效果。进行追加免疫时的抗原给予量根据动物的种类、大小等而不同，通常，例如为小鼠时，为 0.05-5 ml，优选 0.1-0.5 ml，进一步优选 0.1-0.2 ml 左右。不必要的大量给予不仅会降低免疫效果，对于被免疫动物也不好。

上述追加免疫 1-10 天后、优选 2-5 天后、进一步优选 2-3 天后，从被免疫动物中无菌摘取含有抗体生成细胞的脾细胞或淋巴细胞。此时，测定抗体滴度，以抗体滴度足够高的动物作为抗体生成细胞供给源，这样可提高以后的操作效率。

这里所采用的抗体滴度的测定方法有：RIA 法、ELISA 法、荧光抗体法、被动血凝反应法等各种公知技术，从检测灵敏度、迅速性、准确性和操作自动化的可能性等角度考虑，更优选 RIA 法或 ELISA 法。

本发明的抗体滴度的测定例如采用 ELISA 法，则可通过以下所述顺序进行。首先，将纯化或部分纯化的抗原吸附于 ELISA 用 96 孔板等固相表面，再将未吸附抗原的固相表面用与抗原无关的蛋白质例如牛血清白蛋白(以下称为“BSA”)包被，将该表面洗涤，然后与作为第一抗体的梯度稀释的试样(例如小鼠血清)接触，使试样中的单克隆抗体与上述抗原结合。再加入作为第二抗体的酶标抗小鼠抗体，与小鼠抗体结合，洗涤后加入该酶的底物，通过底物分解而显色，由此可测定吸光度的变化等，计算抗体滴度。

从上述脾细胞或淋巴细胞中分离抗体生成细胞，这可通过公知的方法(例如 Kohler 等., *Nature*, (1975)256, 495; Kohler 等., *Eur.J.Immunol.*, (1977)6,511, ; Milstein 等., *Nature*, (1977)266, 550; Walsh, *Nature*, (1977)266, 495)进行。例如，为脾细胞时，可采用将细胞切碎，用不锈钢网过滤，然后使其悬浮于 Eagle 极限培养基(MEM)，分离抗体生成细胞的常规方法。

(c) 骨髓瘤细胞(以下称“骨髓瘤”)的制备

对于细胞融合中使用的骨髓瘤细胞没有特别限制，可从公知的细胞株中适当选择使用。基于从融合细胞中选择骨髓瘤时的便利性角度考虑，优选使用其选择步骤已经得到确立的 HGPRT (次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶) 缺失细胞株。即，为来自小鼠的 X63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、F0、S149/5XX0、BU.1 等，来自大鼠的 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) 等，来自人的 U266AR(SKO-007)、GM1500 · GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41) 等。这些 HGPRT 缺失细胞株例如可由 American Type Culture Collection (ATCC) 等获得。

这些细胞株可在适当的培养基、例如 8-氮杂鸟嘌呤培养基 [RPMI-1640 培养基中加入谷胺酰胺、2-巯基乙醇、庆大霉素、以及胎牛血清(以下称为“FCS”)，在所得培养基中再加入 8-氮杂鸟嘌呤得到的培养基]、Iscove' s 改性 Dulbecco' s 培养基(以下称为“IMDM”)、或者 Dulbecco' s 改性 Eagle 培养基(以下称为“DMEM”)中继代培养，可以在细胞融合 3-4 日之前在正常培养基[例如含有 10%FCS 的 ASF104 培养基(味之素(株)制造)]中继代培养，在融合当天确保为  $2 \times 10^7$  或以上的细胞数。

#### (d) 细胞融合

抗体生成细胞与骨髓瘤细胞的融合可按照公知的方法 (Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E.A. 和 Mayer, M.M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等)，在不使细胞存活率极度降低的条件下适当实施。所述方法例如可使用：在聚乙二醇等高浓度聚合物溶液中将抗体生成细胞和骨髓瘤细胞混合的化学方法；利用电刺激的物理方法等。其中，以下给出了上述化学方法的具体例子。即，使用聚乙二醇作为高浓度聚合物溶液时，在分子量为 1500-6000、优选 2000-4000 的聚乙二醇溶液中、在 30-40℃、优选 35-38℃ 的温度下，使抗体生成细胞和骨髓瘤细胞混合 1-10 分钟，优选 5-8 分钟。

#### (e) 杂交瘤群的选择

由上述细胞融合得到的杂交瘤的选择方法没有特别限制，可以采用通常的 HAT(次黄嘌呤·氨基嘌呤·胸苷)选择法 [Kohler 等., Nature,

256, 495 (1975); Milstein 等., Nature 266, 550 (1977)]. 该方法对于使用在氨基喋呤下无法存活的 HGPRT 缺失细胞株的骨髓瘤细胞获得杂交瘤的情形有效。即, 将未融合细胞和杂交瘤在 HAT 培养基上培养, 只选择性地保留对氨基喋呤具有抗性的杂交瘤并使其增殖。

(f) 分割成单细胞克隆(克隆)

杂交瘤的克隆方法例如可使用甲基纤维素法、软琼脂糖法、有限稀释法等公知的方法[例如参照 Barbara, B.M.和 Stanley, M.S. : Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman 和 Company, San Francisco (1980)]. 该克隆方法有: 稀释成孔板的每个孔含有一个杂交瘤并进行培养的有限稀释法; 在软琼脂培养基中培养并回收集落的软琼脂法; 通过显微操作器将细胞一个一个取出并培养的方法; 通过细胞分选仪分离一个细胞的“分选克隆”等。这些方法中, 特别优选有限稀释法。该方法中, 向微量板上接种来自胎大鼠的成纤维细胞株或正常小鼠脾细胞、胸腺细胞、腹水细胞等饲养细胞。另一方面, 预先将杂交瘤在培养基中稀释成 0.2-0.5 个/0.2 ml, 将该稀释的杂交瘤悬浮液每孔中各加入 0.1 ml, 每隔一定期间(例如每隔 3 天)将约 1/3 的培养基更换为新培养基, 持续培养两周左右, 由此可使杂交瘤增殖。

对于已确认了抗体滴度的孔, 例如将有限稀释法克隆重复 2-4 次, 将稳定并确认了抗体滴度的克隆作为抗 DC-STAMP 单克隆抗体生成杂交瘤细胞株。

(g) 通过杂交瘤培养制备单克隆抗体

对于上述选择的杂交瘤进行培养, 可以有效获得单克隆抗体, 但优选在培养之前对生成目标单克隆抗体的杂交瘤进行筛选。该筛选可采用已知的方法。

本发明的抗体滴度的测定例如可通过 ELISA 法, 按照以下顺序进行。首先, 将纯化或部分纯化的 DC-STAMP、或者表达 DC-STAMP 的细胞吸附于 ELISA 用 96 孔板等的固相表面, 再将未吸附抗原的固相表面用与抗原无关的蛋白质例如牛血清白蛋白(以下称为“BSA”)包被, 洗涤该表面, 然后与作为第一抗体的梯度稀释试样(例如杂交瘤的培养上清)接触, 使试样中的抗 DC-STAMP 抗体与上述抗原结合。再加入作为第二抗体的酶标抗小鼠抗体, 与小鼠抗体结合, 洗涤后加入该酶的底物, 通过底物分解进行显色, 以此来测定吸光度的变化等,

计算抗体滴度。上述筛选可以在上述克隆杂交瘤后进行，也可以在之前进行。

由上述方法得到的杂交瘤可以在液氮中或者-80℃或以下的冷冻箱中以冷冻状态保存。

对于完成克隆的杂交瘤，可以将培养基由 HT 培养基换为正常培养基进行培养。大量培养可以通过使用大型培养瓶的旋转培养、或者旋动培养进行。将该大量培养中的上清通过使用凝胶过滤等本领域周知的方法进行纯化，可得到与本发明的蛋白质特异性结合的单克隆抗体。另外，向同一系统的小鼠(例如上述的 BALB/c)或者 Nu/Nu 小鼠的腹腔内注射杂交瘤，使该杂交瘤增殖，也可以获得含有大量本发明的单克隆抗体的腹水。给予腹腔内时，如果事先(3-7 天前)给予 2,6,10,14-四甲基十五碳烷(降植烷)等矿物油，则可得到更大量的腹水。例如，预先向与杂交瘤同一系统的小鼠腹腔内注射免疫抑制剂，使 T 细胞失活，然后在 20 天后，使  $10^6$ - $10^7$  个杂交瘤克隆细胞悬浮于不含血清的培养基中(0.5 ml)，给予腹腔内，通常在腹部膨胀、充满腹水时由该小鼠采集腹水。通过该方法，可得到比培养液中约高 100 倍或以上浓度的单克隆抗体。

由上述方法得到的单克隆抗体例如可通过 Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)中记载的方法纯化。即硫酸铵盐析法、凝胶过滤法、离子交换色谱法、亲和层析法等。这些方法中，通过将硫酸铵盐析法重复 3-4 次，优选 3-6 次，可以纯化单克隆抗体。但是该方法中，纯化单克隆抗体的收率极低，因此，对于进行了 1-2 次硫酸铵分离法的粗纯化单克隆抗体，再进行选自凝胶过滤法、离子交换色谱法、亲和层析法等至少一种、优选两种的方法，可以以高收率获得高纯度纯化的单克隆抗体。硫酸铵盐析法与其它方法的组合以及顺序如下：(i)硫酸铵盐析法-离子交换色谱法-凝胶过滤法、(ii)硫酸铵盐析法-离子交换色谱法-亲和层析法、(iii)硫酸铵盐析法-凝胶过滤法-亲和层析法等，为了高纯度且高收率获得单克隆抗体，特别优选上述(iii)的组合。

简便的纯化方法可以利用市售的单克隆抗体纯化试剂盒(例如 MabTrap GII 试剂盒; Amersham Pharmacia Biotech 制造)。

上述所得单克隆抗体对于 DC-STAMP 具有高抗原特异性。

#### (h) 单克隆抗体的鉴定

上述所得单克隆抗体的同型和亚类的确定可如下进行。首先，鉴定法有：奥脱洛尼(Ouchterlony)法、ELISA 法或 RIA 法。奥脱洛尼法简便，但是单克隆抗体浓度低时需要进行浓缩操作。而使用 ELISA 法或 RIA 法时，可将培养上清直接与吸附有抗原的固相进行反应，再通过使用各种免疫球蛋白同型、亚类所对应的抗体作为二次抗体，可以鉴定单克隆抗体的同型、亚类。更简便的方法可利用市售的用于鉴定的试剂盒(小鼠分型试剂盒；Bio-Rad Laboratories 制造)等。

蛋白质的定量可通过福林-劳里法、以及通过 280nm 吸光度  $[1.4(OD_{280}) = \text{免疫球蛋白 } 1 \text{ mg/ml}]$  计算的方法进行。

#### (3) 人源化抗 DC-STAMP 抗体的制备

免疫球蛋白 G (以下简称“IgG”)由各两条分子量约为 23000 的轻多肽链(以下称为“轻链”)、分子量约为 50000 的重多肽链(以下称为“重链”)构成。重链、轻链均具有含约 110 个残基、氨基酸序列保守区的重复结构，它们构成 IgG 的立体结构基本单元(以下称“结构域”)。重链和轻链分别由连续的 4 个和 2 个结构域构成。重链、轻链中，氨基末端的结构域与其它结构域相比，各抗体分子间的氨基酸序列变异大，将该结构域称为可变结构域(以下称为“V 结构域”)。IgG 的氨基末端，重链轻链的 V 结构域互补联合，形成可变区。与此相对，其余的结构域整体形成恒定区。恒定区具有各动物种特征性的序列，例如小鼠 IgG 的恒定区与人 IgG 的恒定区不同，因此小鼠 IgG 被人的免疫系统识别为异物，结果发生人抗小鼠抗体(以下称为“HAMA”)应答(シユロツフ等人、Cancer Res., (1985)45, 879-85)。因此，小鼠抗体不能反复给予人。为了将这样的抗体给予人，必须在保持抗体特异性的同时对抗体分子进行修饰，使其不发生 HAMA 应答。

根据 X 射线晶体结构分析结果，通常，上述结构域是含有 3 条-5 条  $\beta$  链的反平行  $\beta$  片层双层重叠而成的长圆筒状结构。可变区中，重链、轻链的 V 结构域分别集结成各 3 个环，形成抗原结合部位。该各环被称为互补决定区(以下称为“CDR”)，氨基酸序列的变异最为显著。可变区的 CDR 以外的部分通常具有保持 CDR 的结构的作用，被称为

“支架”。Kabatt 等人收集多种重链、轻链可变区的一级序列，根据序列的保守性，制成了分别将一级序列分类为 CDR 和支架的表 (SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No.91-3242, E.A. Kabatt 等)。另外各支架被分类为氨基酸序列具有共同特征的多个亚群。还发现了人和小鼠之间存在对应的支架。

根据上述 IgG 结构性特征的研究，可制定以下的人源化抗体的制备方法。

在研究的初期阶段，有人提出了将来自小鼠抗体的可变区与来自人的恒定区连接的嵌合抗体(参照 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984))。但是这样的嵌合抗体依然含有很多非人氨基酸残基，特别是长时间给予时，可能引发 HAMA 应答(Begent 等人., Br. J. Cancer, (1990)62, 487)。

作为进一步减少对人表达 HAMA 应答的来自非人哺乳动物的氨基酸残基的方法，有人提出了只将 CDR 部分整合到来自人的抗体中的方法(参照 Nature, 321, 522-525, (1986))，但是，通常要想保持对抗原的免疫球蛋白活性，只移植 CDR 是不够的。

另一方面，1987 年，Chothia 等人使用 X 射线晶体结构分析数据，发现了以下内容：

(a) CDR 的氨基酸序列中存在与抗原直接结合的部位和保持 CDR 自身结构的部位，CDR 的立体结构可分类为多种规范的模式(规范结构)；

(b) 规范结构的分类不仅由 CDR，也由支架部分特定位置的氨基酸种类决定(J. Mol. Biol., (1987)196, 901-917)。

根据上述认识，使用 CDR 移植法时，除 CDR 序列之外，也必须要将一部分支架的氨基酸残基移植到人抗体中(参照日本特表平 4-502408 号)。

通常，将具有要移植的 CDR、来自非人哺乳动物的抗体定义为“供体”，将移植有 CDR 一侧的人抗体定义为“受体”，本发明也依从该定义。

实施 CDR 移植法时要考虑的问题在于：尽可能地保守 CDR 的结构，并保持免疫球蛋白分子活性。为实现该目的，必须要注意以下两

点:

- (a) 受体应选择属于哪一种亚群的;
- (b) 应从供体的支架中选择哪些氨基酸残基。

Queen 等人提出一种当供体的支架的氨基酸残基符合以下基准的至少一个时, 与 CDR 序列一起移植到受体的设计方法(参照日本特表平 4-502408 号):

(a) 受体支架区中在其位置上稀有的氨基酸在供体的对应于受体的上述位置的位置上却常见。

(b) 该氨基酸与 CDR 之一紧挨着。

(c) 在立体免疫球蛋白模型中, 该氨基酸在 CDR 的约 3Å 以内具有支链原子, 并可以推断其与抗原或人源化抗体的 CDR 相互作用。

编码本发明的抗 DC-STAMP 单克隆抗体的重链或轻链的 DNA 可如下获得: 从生产上述抗 DC-STAMP 单克隆抗体的杂交瘤细胞中制备 mRNA, 通过反转录酶将该 mRNA 变换成 cDNA, 然后分别分离编码该抗体的重链或轻链的 DNA。

mRNA 提取时, 优选采用硫氰酸胍·热酚法、硫氰酸胍-盐酸胍法等, 更优选硫氰酸胍·氯化铯法。由细胞制备 mRNA 时, 首先制备总 RNA, 这可通过以下方法实施: 使用 oligo(dT)纤维素或 oligo(dT)胶乳珠等 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 纯化用载体由该总 RNA 中纯化的方法; 或者使用该载体从细胞溶胞产物中直接纯化的方法。总 RNA 的制备方法优选碱性蔗糖密度梯度离心法(Dougherty, W. G. 和 Hiebert, E. Viology, (1980)101, 466-474)、硫氰酸胍·酚法、硫氰酸胍·三氯化铯法、酚·SDS 法等, 优选使用硫氰酸胍和氯化铯的方法(Chirgwin, J. M.,等., (1979) Biochemistry, (1979)18, 5294- 5299)。

以如上所述得到的 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 为模板, 通过反转录酶反应合成单链 cDNA, 然后可由该单链 cDNA 合成双链 cDNA。该方法可以采用 S1 核酸酶法(Efstratiadis, A.,等., Cell, (1976)7, 279-288)、Gubler-Hoffman 法(Gubler, U.和 Hoffman, B. J., Gene, (1983)25, 263-269)、Okayama-Berg 法(Okayama, H.和 Berg, P., Mol. Cell. Biol., (1982)2, 161-170)等, 本发明中, 优选采用以单链 cDNA 为模板进行聚合酶链反应(以下称为“PCR”) (Saiki, R. K.,等., Science, (1988)239, 487-49)的所谓 RT-PCR 法。

将上述所得双链 cDNA 整合到克隆载体中, 将所得重组载体导入大肠杆菌等微生物中进行转化, 以四环素抗性或氨苄青霉素抗性等为指标选择转化体。大肠杆菌的转化可通过 Hanahan (Hanahan, D., J. Mol. Biol., (1983)166, 557-580)法、即, 在氯化钙或氯化镁或者氯化铷共存下, 向制备的感受态细胞中加入该重组 DNA 载体的方法实施。使用质粒作为载体时, 需要具有上述抗药性基因。也可以使用质粒以外的克隆载体、例如  $\lambda$  系的噬菌体等。

从由上述所得的转化细胞株中选择具有编码目标抗 DC-STAMP 单克隆抗体的各亚单元的 cDNA 的细胞株, 其方法例如可采用以下所示各种方法。通过上述 RT-PCR 法特异性扩增目标 cDNA 时, 这些操作可以省略。

### (3-1) 使用聚合酶链反应的方法

当目标蛋白质的氨基酸序列的全部或部分为已知时, 合成与该氨基酸序列的一部分对应的有义链和反义链寡核苷酸引物, 将它们组合, 进行聚合酶链反应(Saiki, R. K.,等., Science, (1988)239, 487-49), 扩增编码目标抗 DC-STAMP 抗体重链或轻链亚单元的 DNA 片段。这里所使用的模板 DNA 例如可以使用通过反转录酶反应、由产生抗 DC-STAMP 单克隆抗体的杂交瘤的 mRNA 合成的 cDNA。

上述制备的 DNA 片段也可以利用市售的试剂盒等直接整合到质粒载体中, 也可以将该片段用  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  或生物素等标记, 以其作为探针, 进行集落杂交或噬菌斑杂交, 由此选择目标克隆。

例如作为研究本发明的抗 DC-STAMP 单克隆抗体各亚单元的部分氨基酸序列的方法, 可以采用以下方法: 使用电泳或柱层析等周知的方法, 分离各亚单元, 然后利用自动蛋白质测序仪(例如岛津制作所(株)制造的 PPSQ-10)等, 分别对亚单元的 N 末端氨基酸序列进行分析。

从上述所得目标转化细胞株中采集编码抗 DC-STAMP 单克隆抗体蛋白质的各亚单元的 cDNA, 其方法可以按照公知的方法(Maniatis, T., 等. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.)实施。例如可通过从细胞中分离相当于载体 DNA 的组分, 从该质粒 DNA 中切取编码目标亚单元的 DNA 区域来进行。

### (3-2) 使用合成寡核苷酸探针进行筛选的方法

当目标蛋白质的氨基酸序列的全部或部分为已知时(该序列只要是多个连续的特异性序列即可,可以是目标蛋白质的任何区),合成与该氨基酸序列对应的寡核苷酸(此时,可以采用参考密码子使用频率推测的核苷酸序列、或者将所认为的核苷酸序列组合得到的多个核苷酸序列,如果为后者,可以使其含有肌苷以减少其种类),以此作为探针(用 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、生物素等标记),与改性固定有转化细胞株的DNA的硝基纤维素滤膜杂交,筛选所得阳性细胞株。

上述所得DNA序列的确定例如可通过Maxam-Gilbert化学修饰法(Maxam, A. M.和Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, (1980)65, 499-576)或双脱氧核苷酸链终止法(Messing, J.和Vieira, J., *Gene* (1982)19, 269-276)等实施。

近年来,使用荧光染料进行的自动碱基序列确定系统得到普及(例如有Perkin Elmer Japan制造的Sequence Robot "CATALYST 800"和型号373A DNA测序仪等)。

通过利用上述系统,可以高效且安全地进行DNA核苷酸序列确定操作。可以由这样确定的本发明的DNA的各核苷酸序列、以及重链和轻链的各N末端氨基酸序列数据,确定本发明的单克隆抗体的重链和轻链的全部氨基酸序列。

免疫球蛋白的重链和轻链都含有可变区和恒定区,可变区也称为互补决定区(以下称为"CDR";重链、轻链均各3处)和与它们相邻的支架区(重链、轻链均各4处)。

其中,恒定区的氨基酸序列与抗原的种类无关,在免疫球蛋白亚类相同的抗体间是共通的。而可变区、特别是CDR的氨基酸序列是抗体所特有的,但通过对多种抗体的氨基酸序列数据比较研究,可知CDR的位置或支架序列的长度在属于相同亚群的抗体亚单元间非常类似(Kabat, E. A.,等., in "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol.II": U.S. Department of Health and Human Services, (1991)).因此,例如通过将抗DC-STAMP单克隆抗体的重链和轻链的各氨基酸序列与这些公知的氨基酸序列数据相比较,可以确定各氨基酸序列中CDR或支架区和恒定区的位置。还已知:FRH<sub>1</sub>、即重链的最N末端一侧的支架区的链长比通常(30个氨基酸)短,例如该支架区最小的例子是18个氨基酸(上述Kabat, E. A.,等)。由此可知,本发明的抗体中,

不损害抗 DC-STAMP 抗体的功能的极限是重链的 N 末端的支架区的链长为 18 个氨基酸或以上、30 个氨基酸或以下，优选 30 个氨基酸。

对具有与上述确定的轻链或重链的各 CDR 相同氨基酸序列、或者其中连续的部分氨基酸序列的肽进行人工修饰操作，通过使其与该 CDR 在抗 DC-STAMP 抗体分子中形成的立体结构接近，可以使其单独具有与 DC-STAMP 的结合活性[例如参照美国专利第 5331573 号公报]。因此，如上修饰的、具有与 CDR 相同氨基酸序列或其中连续的部分氨基酸序列的肽也包含在本发明的分子中。

在制备使氨基酸序列中的任意一个或多个氨基酸缺失的变异体时，可按照盒变异法(参照岸本利光、“新生化学实验讲座 2 核酸 III 组換え DNA 技术” 242-251)等。

上述各种 DNA 例如可按照亚磷酸三酯法(Hunkapiller, M., 等., Nature (1984)310, 105-111)等常规方法，通过核酸的化学合成制备。所需氨基酸的密码子其本身是公知的，其选择也是任意的，例如可以考虑所使用的宿主的密码子使用频率，按照常规方法确定。这些核苷酸序列密码子的部分改变也可以按照常规方法、利用含有编码所需变异的合成寡核苷酸的引物进行定点诱变法(Mark, D.F., 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984)81, 5662-5666)等。

另外，一种 DNA 是否与编码本发明抗 DC-STAMP 单克隆抗体的重链或轻链的 DNA 杂交，这可如下研究：例如可以按照随机引物法(Feinberg, A.P.和 Vogelstein, B., Anal. biochem., (1983)132, 6-13)或切口平移法(Maniatis, T., 等., in “Molecular Cloning A laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory, NY., (1982))等，使用用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  等标记的探针 DNA，通过以下的实验对该 DNA 进行研究。

首先，将要研究的 DNA 吸附于例如硝基纤维素膜或尼龙膜等上，根据需要进行碱改性等处理，然后通过加热或紫外线等进行固定。将该膜浸泡在含有 6×SSC (1×SSC 为 0.15 M 氯化钠、0.015 M 柠檬酸三钠的溶液)和 5% Denhart 溶液、0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)的预杂交溶液中，在 55℃ 保温 4 小时或以上，然后将之前制备的探针加入到该预杂交溶液中，使最终比活性为  $1 \times 10^6$  cpm/ml，在 60℃ 保温过夜，然后，将膜在室温下用 6×SSC 洗涤 5 分钟，将该操作重复多次，再用 2×SSC 洗涤 20 分钟，进行放射自显影。

利用上述方法，可以从任意的 cDNA 文库或基因组文库中分离与编码本发明的人源化抗 DC-STAMP 抗体的重链或轻链的 DNA 杂交的 DNA (Maniatis, T.,等., in “Molecular Cloning A laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory, NY., (1982)).

通过将如上所述得到的各 DNA 分别整合到表达载体中，导入原核生物或真核生物的宿主细胞，可以使各基因在这些宿主细胞中表达。表达方法可以按照与上述“6. 抗 DC-STAMP 抗体的制备”一项中“(1) 抗原的制备”所记载的方法相同的方法进行。

含有在转化体的细胞内或细胞外生产的抗 DC-STAMP 抗体蛋白质的组分可通过利用该蛋白质的物理性质或化学性质等的各种公知的蛋白质分离操作法进行分离、纯化。所述方法具体可采用：例如通常的蛋白质沉淀剂处理、超滤、分子筛色谱(凝胶过滤)、吸附色谱、离子交换色谱、亲和层析、高效液相色谱(HPLC)等各种色谱，透析法，以及它们的组合等。

为了将抗 DC-STAMP 小鼠单克隆抗体制成人源化，必须设计可变区的氨基酸序列，以使确定的 CDR 全部序列和 FR 序列的一部分氨基酸残基移植到人抗体中。该设计可按以下方法进行。

以往进行人源化设计时，受体亚群的选择指南可选择下述其中之一：(a) 照搬使用具有天然的氨基酸序列的公知的人抗体的重链、轻链的天然组合；(b) 保留重链、轻链所属的亚群的组合，但使用重链、轻链分别来自不同的人抗体、与供体的重链、轻链的氨基酸序列相同性高的氨基酸序列或共同序列。

本发明中，也可以按照上述指南进行，还可以采用与上述不同的方法，即，(c) 不考虑亚群的组合，从人抗体的一级序列的文库中选择与供体的 FR 相同性最高的重链、轻链的 FR。通过这些选择方法，可以使供体和受体之间的 FR 部分的氨基酸相同性至少具有 70%或以上。通过采用该方法，可以使由供体移植的氨基酸残基数更少，可以减少 HAMA 应答诱导。

由抗体分子的一级序列预测立体结构的操作(以下，将该操作称为“分子建模”)，其预测精度是有限度的，其供体所属的亚群中稀有出现的氨基酸残基的作用无法充分确定。Queen 等人的方法中，通常难以判断在该位置上应该选择供体、受体的哪一个氨基酸残基。如果根据(c)

的选择方法，则可以显著减少进行这样判断的情况。

本发明人通过提供用于鉴定来自供体的 FR 的氨基酸的新型方法，可以进一步改善该人源化方法。其中所述来自供体的 FR 的氨基酸是维持供体的 CDR 的结构和功能的重要部分。

在分别选择了轻链、重链的人受体分子后，选择由供体的 FR 移植的氨基酸残基的方法可如下进行。

将供体和受体的氨基酸序列排列，两者的 FR 对应的位置上氨基酸不同时，必须确定要选择哪一种残基，该选择中，必须在不损害来自供体的 CDR 的立体结构的条件下进行选择。

Queen 等人在上述的日本特表平 4-502408 号中提出了 FR 上的氨基酸残基符合以下要件的至少其中之一时，与 CDR 序列一起移植到受体中的方法：

1) 受体的人 FR 区域中的氨基酸在其位置上为稀有，供体的对应的氨基酸在受体的上述位置上为普通；

2) 该氨基酸与 CDR 之一紧挨着；

3) 在立体免疫球蛋白模型中，该氨基酸在 CDR 的约 3Å 以内具有支链原子，并且可以推断与抗原或人源化抗体的 CDR 相互作用。

这里，2)所示的残基常常显示 3)的性质，因此本发明中，删除该 2)的条件，另外新设两种条件。即，本发明中，对于要与 CDR 共同移植的供体的 FR 上的氨基酸残基，在下述条件时，将该氨基酸残基由供体的 FR 移植：

a) 受体的人 FR 区域中的氨基酸在其位置上为稀有，供体的对应的氨基酸在受体的上述位置上为普通；

b) 在立体结构模型中，可以推断该氨基酸与 CDR 的构成氨基酸原子和抗原或移植的 CDR 环具有相互作用；

c) 该位置为规范的确定的残基；

d) 该位置构成重链和轻链的接触面。

在(a)的条件中，根据上述的 Kabat 的表，对于同一亚类的抗体，将以 90%或以上的频率在该位置出现的氨基酸定义为“普通”、以低于 10%的频率出现的氨基酸定义为“稀有”。

在(c)的条件中，关于是否“该位置为规范的确定的残基”，可按照上述 Chothia 的表明确定。

(b)、(d)的条件中，必须预先对抗体可变区进行分子建模。分子建模所使用的软件可以采用市售的任何软件，可优选使用 AbM (Oxford Molecular Limited 制造)。

分子建模的预测精度是有一定限度的，因此本发明中，通过参照各种抗体的可变区的 X 射线晶体分析实验结果，可将由分子建模得到的结构预测的准确程度分为两阶段。

本发明中，在通过 AbM 等分子建模用软件构建的可变区的立体结构中，当两个原子之间的距离比各范德华半径的和加上 0.5 Å 的值短，则推定该两原子之间为范德华接触。如果主链和支链的酰胺氮、羰基氧等极性原子间距离比平均氢键距离 2.9 Å 加上 0.5 Å 的距离短，则推定其间存在氢键。并且，具有相反电荷的原子间比 2.85 Å 加上 0.5 Å 的距离短时，则可推定其间形成离子对。

另一方面，从各种抗体的可变区 X 射线晶体结构分析实验结果可以确定：与亚群无关、FR 上可见与 CDR 高频率接触的位置在轻链的第 1、2、3、4、5、23、35、36、46、48、49、58、69、71、88 号位置，在重链的 2、4、27、28、29、30、36、38、46、47、48、49、66、67、69、71、73、78、92、93、94、103 号位置(数字均表示上述 Kabat 等人的文献中所定义的氨基酸编号。以下也相同)。采用与分子建模相同基准时，这些位置的氨基酸残基在公知的抗体可变区的三分之二处与 CDR 的氨基酸残基接触。基于以上认识，b)的“在立体结构模型中，可以推断该氨基酸与 CDR 的构成氨基酸原子、抗原或移植的 CDR 环具有相互作用”是指以下条件。

在分子建模中，当预测 FR 和 CDR 具有接触可能性的 FR 的位置与通过 X 射线晶体分析实验性检测出的 FR 和 CDR 高频率接触的位置一致时，优先进行供体的氨基酸残基移植。

除此以外的情况不考虑该条件 b)。

(d)的“该位置构成重链和轻链的接触面”是指以下条件。对从各种抗体可变区 X 射线晶体分析实验结果可以确认，在轻链中，36、38、43、44、46、49、87、98 号的氨基酸残基，在重链中，37、39、45、47、91、103、104 号氨基酸残基高频率进行重链-轻链间接触。分子建模中，预测具有重链-轻链间接触的可能性，其位置与上述位置的其中之一一致时，优先进行供体的氨基酸残基移植。除此以外的情况不考

虑该条件 d)。

编码本发明的人源化抗 DC-STAMP 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA 可通过以下方法制备。

例如，化学合成 60-70 个核苷酸的、含有该 DNA 的部分核苷酸序列的多个多核苷酸片段，使其在有义一侧和反义一侧互不相同，然后，将各多核苷酸片段退火，通过 DNA 连接酶结合，可得到具有编码所需人源化抗 DC-STAMP 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA 的 DNA。

另外一种方法是：由人淋巴细胞中分离编码受体可变区的全部氨基酸序列的 DNA，按照本领域周知的方法对编码 CDR 的区进行核苷酸置换，导入限制酶切序列。用相应的限制酶切断该区域，然后合成编码供体的 CDR 的核苷酸序列，通过 DNA 连接酶结合，可得到编码所需人源化抗 DC-STAMP 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA。

本发明中，还可按照以下所述的重叠·延伸·PCR 法(参照 Holton 等人、Gene, 77, 61-68, (1989))，得到编码所需人源化抗 DC-STAMP 抗体的重链和轻链的可变区的 DNA。

即，将分别编码所需两种氨基酸序列的两种 DNA 简称为(A)和(B)。化学合成在(A)的 5'一侧退火的 20-40 个核苷酸的有义引物(以下，将该引物称为(C))和在(B)3'一侧退火的 20-40 个核苷酸的反义引物(以下，将该引物称为(D))，再将(A)的 3'一侧的 20-30 个核苷酸和(B)的 5'一侧的 20-30 个核苷酸连接，合成嵌合有义引物(以下将该引物称作(E))和与其互补的反义引物(以下将该引物称作(F))。以含有(A)的适当的载体 DNA 为底物，进行使用有义引物(C)和嵌合反义引物(F)的 PCR，可得到(A)的 3'末端附加有(B)的 5'末端一侧的 20-30 个核苷酸的 DNA(将该新得到的 DNA 称作(G))。同样的，以含有(B)的适当的载体 DNA 为底物，使用反义引物(D)和嵌合有义引物(E)进行 PCR，可得到在(B)的 5'末端附加有(A)的 3'末端一侧的 20-30 个核苷酸的 DNA(将该新得到的 DNA 称作(H))。对于这样得到的(G)和(H)，在(G)的 3'一侧的 40-60 个核苷酸和(H)的 5'一侧的 40-60 个核苷酸中保持有互补的核苷酸序列。将扩增的(G)和(H)混合进行 PCR 时，在第一次变性反应中，(G)和(H)成为单链，在其后的退火反应中，几乎所有的 DNA 复原，但一部分 DNA 在互补的核苷酸序列区内形成退火的杂 DNA 双链。在之后的延伸反应中，突出的单链部分得到修复，可得到(A)和(B)连接的嵌合

DNA(以下将该DNA称作(I)),再以该(I)为底物,使用有义引物(C)和反义引物(D)进行PCR,可扩增(I)。本发明中,将编码抗人DC-STAMP小鼠单克隆抗体的重链和轻链的CDR区域的DNA、和编码人免疫球蛋白IgG的FR区域的DNA、以及编码人免疫球蛋白IgG的分泌信号的DNA分别一个个作为(A)和(B),进行上述接连反应。

所需氨基酸的密码子其本身是公知的,其选择也是任意的,例如可考虑所使用的宿主的密码子的使用频率,按照常规方法确定。这些核苷酸序列密码子的部分改变可按照常规方法,利用含有编码所需改变的合成寡核苷酸的引物,通过定点诱变(Mark, D. F.,等.,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1984)81, 5662-5666)等进行。因此,化学合成各引物时,通过设计成预先导入了定点突变的各引物,可得到编码所需抗DC-STAMP抗体的重链和轻链的可变区的DNA。

通过将上述所得本发明的各DNA分别整合到表达载体中,可以转化原核生物或真核生物的宿主细胞。并且,通过向这些载体中导入适当的启动子和转化相关的序列,可以使各基因在各宿主中表达。

通过上述方法,可容易地、高收率、高纯度地制备重组抗DC-STAMP抗体。

#### (4) 完全人抗DC-STAMP抗体的制备

完全人抗体是指只具有来自人染色体的抗体基因序列的人化抗体。完全人抗DC-STAMP抗体可通过以下方法获得:使用人抗体生成小鼠的方法,该人抗体生成小鼠具有含人抗体的H链和L链的基因的人染色体片段(Tomizuka, K.等., *Nature Genetics*, (1977)16, 133-143; Kuroiwa, Y.等., *Nuc. Acids Res.*, (1998)26, 3447-3448; Yoshida, H.等., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects*, (1999)10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. 和 Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K.等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2000)97, 722-727);通过获得来自噬菌体展示的人抗体的方法,所述噬菌体展示由人抗体文库选别出来(Wormstone, I. M.等., *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, (2002)43 (7), 2301-8; Carmen, S. 等., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, (2002)1 (2), 189-203; Siriwardena, D. 等., *Ophthalmology*, (2002)109 (3), 427-431 等)。

确认上述制备的人抗 DC-STAMP 抗体与 DC-STAMP 特异性结合的方法例如优选为与小鼠免疫时进行的抗体滴度评价时相同的 ELISA 法。

## 7. 含有抗 DC-STAMP 抗体的药物

从由上述“6. 抗 DC-STAMP 抗体的制备”一项中记载的方法中得到的抗 DC-STAMP 抗体中,可获得中和 DC-STAMP 的生物活性的抗体。这些中和 DC-STAMP 的生物活性的抗体可抑制生物体内的 DC-STAMP 生物活性,即,抑制破骨细胞的分化和/或成熟,因此作为药物,可用作起因于破骨细胞的分化异常的骨代谢异常的治疗药。

通过抗 DC-STAMP 抗体产生的体外对 DC-STAMP 的生物活性的中和活性例如可通过过量表达 DC-STAMP 的细胞中对细胞向破骨细胞分化的抑制活性来测定。例如,培养过量表达 DC-STAMP 的来自小鼠单核细胞的细胞株 RAW264.7 细胞、RAW264 细胞或 RAW-D 细胞,以各种浓度向培养系统中添加抗 DC-STAMP 抗体,可测定对于通过 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  的刺激向破骨细胞分化的抑制活性。还可以以各种浓度向来自骨髓的初代培养细胞添加抗 DC-STAMP 抗体,测定对经 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  刺激向破骨细胞分化的抑制活性。并且,在使用来自股骨和/或胫骨的细胞进行的陷窝实验(Takada 等., Bone and Mineral, (1992)17, 347-359)中,以各种浓度向来自股骨和/或胫骨的细胞中添加抗 DC-STAMP 抗体,观察象牙切片上的陷窝形成,可测定对破骨细胞的骨吸收活性的抑制活性。利用实验动物进行的体内抗 DC-STAMP 抗体对骨代谢异常的治疗效果可如下确认:例如,对过量表达 DC-STAMP 的转基因动物给予抗 DC-STAMP,测定破骨细胞的变化来确认。

上述所得的中和 DC-STAMP 的生物活性的抗体可用作药物、特别是以治疗起因于骨质疏松症、类风湿性关节炎、癌性高钙血症等骨代谢异常的疾病为目的的药物组合物,或者用于上述疾病的免疫学诊断的抗体。

抗 DC-STAMP 抗体对骨代谢异常症的治疗的一个例子是将该抗体单独或者与至少一种骨相关疾病的治疗药一起给予。另一个例子是抗 DC-STAMP 抗体与治疗上有效量的抗骨代谢异常治疗药一起给予。可

与抗 DC-STAMP 抗体一起给予的治疗药有：二膦酸盐、活性维生素 D3、降钙素及其衍生物、雌二醇等激素制剂、SERMs (选择性雌激素受体调节剂)、依普黄酮、维生素 K2 (四烯甲萘醌)和钙制剂等，但并不限于这些。根据骨代谢异常的状态或希望治疗的程度，可以给予 2、3 或多种药物，这些药物可以封装在相同的制剂中一起给予。也可以将这些药物与抗 DC-STAMP 抗体封装在相同制剂中一起给予。这些药物还可以以治疗用试剂盒的形式包装一起给予。还可以将这些药物与抗 DC-STAMP 抗体分别供给。通过基因治疗给予时，可以将蛋白质性的骨疾病治疗药的基因和抗 DC-STAMP 抗体的基因同时或分别插入到相同启动子区的下游，导入不同或相同的载体中。

通过使骨疾病治疗药与抗 DC-STAMP 抗体或其片段结合，可以制备 M.C.Garnet “Targeted drug conjugates: principles and progress”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2001)53, 171-216 中记载的靶式药物复合物。在该目的下，除抗体分子外，只要未使对破骨细胞的识别性完全消失，则也可使用任何抗体片段，例如有 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 等片段，本发明中也同样可以使用抗体和该片段。抗 DC-STAMP 抗体或该抗体的片段与骨疾病治疗药的结合方式有 M.C.Garnet “Targeted drug conjugates: principles and progress”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2001)53, 171-216、G.T.Hermanson “Bioconjugate Techniques” Academic Press, California (1996)、Putnam 和 J. Kopecek “Polymer Conjugates with Anticancer Activity” *Advances in Polymer Science* (1995)122, 55-123 中记载的各种形式。即，有抗 DC-STAMP 抗体和骨疾病治疗药化学性直接或经由寡肽等间隔区而结合的方式、或者经由适当的药物载体结合的方式。药物载体的例子有脂质体或水溶性高分子。更具体地说，这些药物载体所介导的方式可例举：将抗体和骨疾病治疗药包含在脂质体中，该脂质体与抗体结合的方式；以及骨疾病治疗药与水溶性高分子(分子量 1000-10 万左右的化合物)化学直接或经由寡肽等间隔区结合，抗体再与该水溶性高分子结合的方式。抗体(或该片段)和骨疾病治疗药与脂质体以及水溶性高分子等药物载体的结合可按照 G.T.Hermanson “Bioconjugate Techniques” Academic Press, California (1996)、Putnam 和 J. Kopecek “Polymer Conjugates with Anticancer Activity” *Advances in Polymer Science* (1995)122, 55-123 中记载的方法

等本领域周知的方法实施。骨疾病治疗药在脂质体中的包含可按照 D.D.Lasic “Liposomes: From Physics to Applications”, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993)中记载的方法等本领域周知的方法实施。骨疾病治疗药与水溶性高分子的结合可按照 D. Putnam 和 J. Kopecek “Polymer Conjugates with Anticancer Activity” Advances in Polymer Science (1995)122, 55-123 中记载的方法等本领域周知的方法实施。抗体(或该片段)与蛋白质性的骨疾病治疗药(或该片段)的复合物除上述方法外, 还可通过本领域周知的基因工程学的方法实施。

本发明也提供含有治疗有效量的抗 DC-STAMP 抗体和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂 and/或助剂的药物组合物。

本发明还提供含有治疗有效量的抗 DC-STAMP 抗体和治疗有效量的至少一种骨疾病治疗药和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂 and/或助剂的药物组合物。骨疾病治疗药的例子有二膦酸盐、活性维生素 D3、降钙素及其衍生物、雌二醇等激素制剂、SERMs (选择性雌激素受体调节剂)、依普黄酮、维生素 K2 (四烯甲萘醌)、钙制剂、PTH (甲状旁腺激素)制剂、非甾体性抗炎剂、抗 TNF $\alpha$  抗体、抗 PTHrP (甲状旁腺激素相关蛋白)抗体、IL-1 受体拮抗剂、抗 RNAKL 抗体和 OCIF (破骨细胞生成抑制因子)等, 但并不限于此。

本发明的药物组合物中, 作为可接受的制剂使用的物质, 优选其给予量或给予浓度对给予药物组合物的患者为非毒性。

本发明的药物组合物也可包含用于改变、维持、保有 pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、颜色、无菌性、稳定性、溶解率、缓释率、吸收率、渗透率的制剂用物质。制剂用的物质有以下物质, 但并不限于这些: 甘氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸等氨基酸类, 抗菌剂、抗坏血酸、硫酸钠或亚硫酸氢钠等抗氧化剂, 磷酸、柠檬酸、硼酸缓冲液、碳酸氢盐、Tris-HCl 溶液等缓冲剂, 甘露糖醇或甘氨酸等填充剂, 乙二胺四乙酸(EDTA)等螯合剂, 咖啡因、聚乙烯吡咯烷、 $\beta$ -环糊精或羟丙基- $\beta$ -环糊精等配位剂, 葡萄糖、甘露糖或糊精等增量剂, 单糖类、二糖类等其它碳水化合物, 着色剂, 香味剂, 稀释剂, 乳化剂或聚乙烯吡咯烷等亲水聚合物, 低分子量多肽, 成盐离子对, 苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫汞撒、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢等

防腐剂，甘油、丙二醇或聚乙二醇等溶剂，甘露糖醇和山梨醇等糖醇，悬浮剂、失水山梨酸酯、聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80 等聚山梨醇酯，triton、氨丁三醇、卵磷脂或胆甾醇等表面活性剂，蔗糖山梨糖醇等稳定性强化剂，氯化钠、氯化钾或甘露糖醇·山梨糖醇等弹性增强剂，转运剂、稀释剂、赋形剂、和/或药学上的助剂。这些制剂用的物质的添加量相对于抗 DC-STAMP 抗体的重量为 0.01-100 倍，特别优选添加 0.1-10 倍。制剂中优选的药物组合物的组成可由本领域技术人员根据所适用的疾病、适用的给药途径等适当确定。

药物组合物中的赋形剂或载体可以是液体也可以是固体。适当的赋形剂或载体还可以是注射用水或生理盐水、人工脑脊液或肠道外给予中通常所使用的其它物质。可以将中性生理盐水或含有血清白蛋白的生理盐水作为载体使用。药物组合物可以含有 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液或 pH 4.0-5.5 的乙酸缓冲液或者山梨糖醇或其它化合物。本发明的药物组合物有：含有抗 DC-STAMP 抗体的药物组合物、以及含有抗 DC-STAMP 抗体和至少一种骨疾病治疗药的药物组合物，本发明的药物组合物可以以所选择的组成、必要的纯度制成冻干品或液体形式的药物。含有抗 DC-STAMP 抗体的药物组合物以及含有抗 DC-STAMP 抗体和至少一种抗骨代谢异常治疗药的药物组合物可以使用蔗糖等适当的赋型剂成型为冻干品。

本发明的药物组合物也可以制成肠道外给予用，还可以制成肠道内消化管吸收用的形式。制剂的组成和浓度可根据给予方法确定，本发明的药物组合物中所含的抗 DC-STAMP 抗体对 DC-STAMP 的亲合性、即，对于 DC-STAMP 的解离常数(Kd 值)，亲合性越高(Kd 值低)，则减少对人的给予量也可以发挥药效，因此基于该结果，可以确定本发明的药物组合物对人的给予量。在将人抗 DC-STAMP 抗体对人给予时，可以是约 0.1-100 mg/kg、1-30 天给予一次。

本发明的药物组合物的形式有：包含输液的注射剂、栓剂、经鼻剂、舌下剂、经皮吸收剂等。

## 8. 直接相互作用的物质的探索

本发明的另一实施方案包含为获得抑制 DC-STAMP 活性的物质而进行的以该蛋白质的立体结构为基础的药物设计方法。该方法已知有

合理化药物设计方法，用于探索有效抑制或激活酶活性等的功能或配体、协同因子、或与 DNA 的结合等的化合物。其例子已知有已经面市的抗 HIV 药物——蛋白酶抑制剂。本发明的 DC-STAMP 的立体结构分析也可以利用 X 射线晶体分析或核磁共振等通常已知的方法。并且，为了探索抑制 DC-STAMP 功能的物质，还可以进行应用计算机药物设计(CADD)的设计。其例子已知有有望作为类风湿性关节炎治疗的新型基因组新药的、抑制 AP-1 活性的低分子化合物(国际专利申请公布 WO99/58515 号)等。通过上述方法，可以得到通过与 DC-STAMP 直接结合或者抑制 DC-STAMP 与其它因子的相互作用，来抑制 DC-STAMP 功能的物质。

另一个方案是涉及本发明的 DC-STAMP 相伴的多肽，即 DC-STAMP 的协同蛋白。也就是说，本发明涉及调节 DC-STAMP 的活性的协同蛋白的筛选方法。

该筛选方法的一个方案包含使受试蛋白质试样与 DC-STAMP 接触，选择与 DC-STAMP 结合的蛋白质的步骤。该方法例如有：使用纯化的 DC-STAMP，进行与其结合的蛋白质的亲和纯化的方法。具体的方法的一个例子是：以含有 6 个组氨酸的序列作为亲和标记物，制备其与 DC-STAMP 融合的蛋白质，将其与细胞提取液(预先过镍-琼脂糖柱，取通过该柱的组分)在 4℃ 温育 12 小时，然后向该混合物中另外添加镍-琼脂糖载体，在 4℃ 温育 1 小时。用洗涤缓冲液将镍-琼脂糖载体充分洗涤，然后添加 100 mM 咪唑，由此使与 DC-STAMP 特异性结合的细胞提取液中的蛋白质洗脱并纯化，确定其结构。这样，可以纯化与 DC-STAMP 直接结合的蛋白质、和与 DC-STAMP 间接结合的蛋白质，其中所述间接结合是指虽然与 DC-STAMP 不具结合活性但通过与上述与 DC-STAMP 直接结合的蛋白质形成复合物作为亚单元来与 DC-STAMP 间接结合(实验医学别册、バイオマニユアルシリーズ 5 “転写因子研究法” 215-219 (羊土社出版))。

作为其它的方法，还有快速蛋白质印迹(实验医学别册、“新遺伝子工学ハンドブック” 76-81 (羊土社出版))、使用酵母或哺乳类动物细胞的双杂交系统法(实验医学别册、“新遺伝子工学ハンドブック” 66-75 (羊土社出版))、还可以通过 Checkmate 哺乳动物双杂交系统(Promega 制造)进行克隆，但并不限于这些方法。

如上所述,如果可得到与 DC-STAMP 直接或间接相互作用的协同蛋白的 cDNA,则可以用于功能性筛选抑制 DC-STAMP 与该协同蛋白的相互作用的物质。具体来说,例如制备 DC-STAMP 与谷胱甘肽 S-转移酶的融合蛋白,与用抗谷胱甘肽 S-转移酶抗体包被的微孔板结合,然后使生物素化的该协同蛋白与该融合蛋白接触,通过链霉抗生物素化碱性磷酸酶检测与该融合蛋白的结合。添加生物素化的该协同蛋白时也添加受试物质,选择促进或抑制融合蛋白与该协同蛋白结合的物质。通过该方法,可得到与融合蛋白直接作用的物质或与该协同蛋白直接作用的物质。

如果融合蛋白和该协同蛋白的结合是间接的,需要其它一些因子介入,则例如在含有该因子的细胞提取液存在下,同样地进行上述测定。此时,也可以选择与该因子作用的物质。

所得协同蛋白具有促进 DC-STAMP 功能的活性时,按照上述的应用 DC-STAMP 基因的表达载体的实验方法,可以进行骨代谢异常治疗药、例如可用作骨质疏松症的治疗药的候选物质的筛选。如果所得协同蛋白具有抑制 DC-STAMP 的功能的活性,具有编码上述抑制因子的核苷酸序列的多核苷酸也可用于骨代谢异常的基因治疗。

所述多核苷酸可如下获得:例如对鉴定出的抑制因子的氨基酸序列进行分析,合成寡核苷酸探针,其中该寡核苷酸探针含有编码该氨基酸序列的核苷酸序列,进行 cDNA 文库或基因组文库的筛选。具有抑制 DC-STAMP 功能的活性的肽为来自随机合成的人工肽文库时,可以化学合成含有编码该肽的氨基酸序列的核苷酸序列的 DNA。

基因治疗中,将编码上述所得的抑制因子的基因例如整合到病毒载体中,将具有该重组病毒载体的病毒(无毒化处理)感染患者。患者体内产生抗骨破坏因子,具有抑制破骨细胞分化的功能,因此可以治疗骨代谢异常。

将基因治疗药导入细胞内的方法可以采用利用病毒载体的基因导入方法、或非病毒性的基因导入方法(日経サイエンス,1994年4月号,20-45页、実験医学増刊,12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」,羊土社(1996))的任意方法。

通过病毒载体进行基因导入的方法例如有:将编码 DC-STAMP 的抑制因子或其变异体的 DNA 整合到反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、

疱疹病毒、牛痘病毒、痘病毒、脊髓灰质炎等 DNA 病毒或 RNA 病毒中的方法。其中，特别优选使用反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、牛痘病毒的方法。非病毒性的基因导入方法有：将表达质粒直接给予肌肉的方法(DNA 疫苗法)、脂质体法、脂转染法、微注射法、磷酸钙法、电穿孔法等，特别优选 DNA 疫苗法，脂质体法。

为了使基因治疗药实际发挥药物的作用，还有将 DNA 直接导入体内的体内法和由人体取出某种细胞，在体外将 DNA 导入该细胞，再将该细胞返回体内的先体外后体内 (ex vivo)法(日経サイエンス，1994 年 4 月号，0-45 页、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)(1994))。

例如通过体内法给予该基因治疗药时，根据疾病、症状等，可通过静脉、动脉、皮下、皮内、肌肉等适当的给予途径给予。通过体内法给予时，该基因治疗药通过制成注射剂等，也可以根据需要加入常用的载体。制成脂质体或膜融合脂质体(仙台病毒-脂质体等)的形式时，可以制成混悬剂、冷冻剂、离心浓缩冷冻剂等脂质体制剂。

与序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列或与该序列的部分序列互补的核苷酸序列可用于所谓的反义治疗。反义分子可以使用与选自序列表的 SEQ ID NO.1、3 和 5 所示核苷酸序列的核苷酸序列的一部分互补、通常含有 15-30 mer 的 DNA；或者使用硫代磷酸酯、磷酸甲酯或吗啉代衍生物等稳定的 DNA 衍生物；2'-O-烷基 RNA 等稳定的 RNA 衍生物。通过将上述反义分子进行微注入、制成脂质体胶囊，或者利用具有反义序列的载体使其表达等本发明的技术领域周知的方法，可以导入细胞中。上述反义疗法对于序列表的 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列所编码的蛋白质活性过度增加而引起的疾病的治疗有效。

还有使用双链短链 RNA (siRNA)的方法(Genes and Developments 2001 年 1 月 15 日、第 15 卷、第 2 号、188-200 页)。例如，制备 DC-STAMP 基因的 siRNA，按照文献记载的方法导入，可用作起因于 DC-STAMP 的过量表达引起的骨代谢异常疾病的治疗药。

含有上述反义寡核苷酸和/或 siRNA、可用作药物的组合物可通过与药物可接受的载体的混合等公知的方法制备。含有反义寡核苷酸的药物与载体的制备方法如 Applied Antisense Oligonucleotide Technology (1998 Wiley-Liss, Inc.)中记载。含有反义寡核苷酸和/或

siRNA 的制剂可以将其本身或者与适当的药理学可接受的赋形剂、稀释剂等混合，以片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂或糖浆剂等肠道内给予的形式给予，或者以注射剂、栓剂、贴剂、或外用剂等进行肠道外给予的形式给予。上述制剂可以使用赋形剂(例如有乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇等糖衍生物；玉米淀粉、马铃薯淀粉、 $\alpha$ 淀粉、糊精等淀粉衍生物；结晶纤维素等纤维素衍生物；阿拉伯树胶；葡聚糖；普鲁蓝等有机系赋形剂；以及轻质硅酸酐、合成硅酸铝、硅酸钙、偏硅酸铝酸镁等硅酸盐衍生物；磷酸氢钙等磷酸盐；碳酸钙等碳酸盐；硫酸钙等硫酸盐等无机系赋形剂)、润滑剂(例如有硬脂酸、硬脂酸钙、硬脂酸镁等硬脂酸金属盐；滑石粉；胶体二氧化硅；蜂蜡、鲸蜡等蜡类；硼酸；己二酸；硫酸钠等硫酸盐；乙二醇；富马酸；苯甲酸钠；DL 亮氨酸；月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁等月桂基硫酸盐；硅酸酐、硅酸水合物等硅酸类；以及上述淀粉衍生物)、粘结剂(例如有羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、以及与上述赋形剂同样的化合物)、崩解剂(例如有低取代羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、内部交联羧甲基纤维素钠等纤维素衍生物；羧甲基淀粉、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮等经化学修饰的淀粉·纤维素类)、乳化剂(例如有膨润土、蜂胶等胶体性黏土；氢氧化镁、氢氧化铝等金属氢氧化物；月桂基硫酸钠、硬脂酸钙等阴离子表面活性剂；苯扎氯铵等阳离子表面活性剂；以及聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等非离子表面活性剂)、稳定剂(有对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等对羟基苯甲酸酯类；氯丁醇、苜醇、苯基乙醇等醇类；苯扎氯铵；酚、甲酚等酚类；硫汞撒；脱氢乙酸；以及山梨酸)、矫味矫臭剂(例如有通常使用的甜味剂、酸味剂、香精等)、稀释剂等添加剂，以周知的方法制备。

将这些药物导入患者的方法除上述之外，还可以使用胶体分散系。胶体分散系统有望获得提高化合物在生物体内的稳定性的效果或有效地向特定的器官、组织或细胞内转运化合物的效果。胶体分散系只要是通常使用的即可，没有限定，有高分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠、和水包油系乳化剂、胶束、混合胶束和包括脂质体在内的以脂质为基础的分散系统，优选具有高效地向特定的器官、组织或细胞中转运化合物的效果的多种脂质体、人工膜的小泡(Mannino

等., *Biotechniques*, (1988)6,682; Blume 和 Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, (1990)1029, 91; Lappalainen 等., *Antiviral Res.*, (1994)23, 119; Chonn 和 Cullis, *Current Op. Biotech.*, (1995)6, 698).

在 0.2-0.4  $\mu\text{m}$  大小范围的单层脂质体可以包封相当大比例的含超高分子的水性缓冲液, 化合物被包被在该水性膜内, 可以以生物学活性的形态转运到脑细胞中 (Fraley 等., *Trends Biochem. Sci.*, (1981)6, 77)。脂质体的组成通常为脂质, 特别是磷脂, 尤其是相转变温度高的磷脂与一种或多种甾醇、特别是胆甾醇复合而成。用于脂质体生产的脂质的例子包含: 磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、鞘脂、磷脂酰乙醇胺、脑苷脂和神经节苷脂等磷脂酰化合物。特别有用的是二酰基磷脂酰甘油, 这里, 脂质部分含有 14-18 个碳原子, 特别是 16-18 个碳原子, 饱和(14-18 个碳原子链的内部没有双键)。代表性的磷脂包含磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱和二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

包括脂质体在内的胶体分散系的打靶可以是被动的或主动的。被动打靶是利用脂质体本来的趋势——向含有窦状毛细血管的器官的网状内皮细胞分布来实现。而主动打靶有以下方法: 例如将病毒的蛋白质外壳 (Morishita 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1993)90, 8474)、单克隆抗体(或其适当的结合部位)、糖、糖脂或蛋白质(或其适当的寡肽片段)等特定的配体与脂质体结合, 或者为了使其向其天然存在的部位以外的器官或细胞形中分布而改变脂质体的组成, 对脂质体进行修饰的方法等。打靶的胶体分散系的表面也可以通过各种方法修饰。在通过脂质体打靶的转运系统中, 在与双层脂质紧密结合中, 为了保持打靶配体, 脂质基团被摄入到脂质体的脂质双层中。为了使脂质链与打靶配体相连接, 可以使用各种连接基团。与特定的细胞表面分子结合的靶配体例如可以是以下形式, 其中所述特定的细胞表面分子主要在需要本发明的寡核苷酸输入的细胞上出现: (1)与特定的细胞受体结合的激素、生长因子或其它适当的寡肽片段, 其中所述特定的细胞受体在需要输送的细胞中表达、或者(2)与主要在靶细胞上出现的抗原性表位特异性结合的多克隆或单克隆抗体、或其适当的片段(例如 Fab; F(ab')<sub>2</sub>)。可以将两种或以上的生物活性制剂在单一的脂质体内部复合进行给予。也可以将用于提高内容物在细胞内稳定性和/或打靶的药物追加到胶体分散系中。

其使用量根据症状、年龄等不同，肠道内给予时，每次的下限为 1 mg(优选 30 mg)、上限为 2000 mg(优选 1500 mg)，注射时，每次的下限为 0.1 mg(优选 5 mg)、上限为 1000 mg(优选 500 mg)，也可以通过皮下注射、肌肉注射或静脉注射给药。

以下给出实施例，详细且具体地说明本发明，但本发明并不受这些实施例的限定。下述实施例中，如无特别说明，基因操作相关的各操作均按照“Molecular Cloning”(Sambrook, J., Fritsch, E.F.和 Maniatis, T.,著, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 年发行)记载的方法进行，或者使用市售试剂或试剂盒时，按照市售品的说明书使用。

#### [参考例 1] RAW-D 细胞和 RAW-N 细胞的构建

##### a) 通过有限稀释培养法获得 RAW-D 细胞和 RAW-N 细胞

已知用可溶性 RNAKL 刺激来自小鼠单核细胞的细胞株 RAW264.7, 则抗酒石酸酸性磷酸酶(以下称为“TRAP”)或组织蛋白酶 K 等破骨细胞分化标志基因的表达受到强烈诱导(Hsu 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1999)96, 3540-3545)。因此，通过用 RNAKL 刺激 RAW264.7 细胞，可以分化诱导为破骨细胞。因此尝试从 RAW264.7 细胞的母细胞株 RAW264 细胞获得对 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  的感受性更强、即通过这些刺激更容易分化为破骨细胞的亚克隆细胞(Watanabe 等., J. Endocrinol., (2004)180, 193-201)。RAW264 细胞可由 European Collection of Cell Culture 购入(产品编号: 85062803)。使用含 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基，按照常规方法进行有限稀释，将 RAW264 细胞以 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板。培养 10-14 天，收集形成的集落。将各集落用含有 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $4.5 \times 10^4$  细胞/ml, 将其以 150  $\mu$ l/孔铺于 96 孔板，添加人 RNAKL (PeproTech 公司制备)，使终浓度为 20 ng/ml, 还添加人 TNF- $\alpha$  (PeproTech 公司制备)，使终浓度为 1 ng/ml。培养 3 天后，使用白细胞酸性磷酸酶试剂盒(Sigma 制造)，按照所附说明书进行 TRAP 染色，确认是否有 TRAP 阳性多核破骨细胞的形成。通过该一系列有限稀释培养法进行的克隆操作分别对各集落重复两次。

结果，获得了通过 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  刺激而有效的地分化成破骨细胞的 RAW-D 细胞以及通过 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  刺激完全不分化为破

骨细胞的 RAW-N 细胞。

b) 通过 TRAP 染色研究 RAW-D 细胞和 RAW-N 细胞分化为破骨细胞的指向性

研究 RAW-D 细胞和 RAW-N 细胞在 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  等具有破骨细胞诱导作用的物质刺激时发生怎样的反应。将 RAW-D、RAW-N 和 RAW264 用含有 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $4.5 \times 10^4$  细胞/ml, 然后以 150  $\mu$ l/孔铺于 96 孔板, 分别添加人 TNF- $\alpha$  (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 1 ng/ml; 人 RNAKL (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 10、20、40、80 ng/ml。培养 3 天后, 使用白细胞酸性磷酸酶试剂盒, 按照所附说明书进行 TRAP 染色, 计数所形成的 TRAP 阳性多核破骨细胞数。结果, RAW-D 中与添加的 RNAKL 浓度依赖性地形成了 TRAP 阳性多核破骨细胞(图 1)。而在 RAW-N 和母细胞株细胞 RAW264 中, 未见因添加 RNAKL 而形成的 TRAP 阳性破骨细胞。

[实施例 1] RAW-D 和 RAW-N 中的小鼠 DC-STAMP 的 mRNA 表达(RNA 印迹分析)

a) 总 RNA 的提取

将 RAW-D 或 RAW-N 用含有 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $7 \times 10^4$  细胞/ml, 将其以 500  $\mu$ l/孔铺于 24 孔板, 加入人 RNAKL (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 20 ng/ml; 人 TNF- $\alpha$  (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 2 ng/ml; 以及小鼠 MIP-1 $\alpha$  (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 1 ng/ml, 培养 3 天。另外同样地进行未添加人 RNAKL (PeproTech 公司制备)、人 TNF- $\alpha$  和小鼠 MIP-1 $\alpha$  的培养。

培养结束后, 按照所附说明书使用总 RNA 提取试剂(TRIZol 试剂: Introgen), 分别在各自条件下培养, 从培养的 RAW-D 和 RAW-N 中提取总 RNA。将回收的总 RNA 在 -80 $^{\circ}$ C 保存。

b) 总 RNA 的电泳和印迹

将回收的总 RNA 用 RNA 试样缓冲液(1 $\times$ MOPS 缓冲液 (1 $\times$ MOPS 缓冲液包含 20 mM MOPS、8 mM 乙酸钠、1 mM EDTA)、50% 甲酰胺、18  $\mu$ g/ml 溴酚蓝、5.8% 甲醛、5% 甘油)制备成 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 在 65 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟, 然后在冰上迅速冷却 5 分钟。将 20  $\mu$ l 该试样液注入含有甲醛的电泳用 1%琼脂糖凝胶(1 $\times$ MOPS 缓冲液、1.2%琼脂糖(Sigma 制备)、

6%甲醛)的一个孔中,进行电泳。电泳是在加入了 1×MOPS 缓冲液的水下电泳层(submarine electrophoretic bed)中、以 100 伏通电约 3 小时进行。

电泳结束后,利用毛细管转移法(Maniatis, T.等., “Molecular Cloning A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory, NY, (1982)),将琼脂糖凝胶中的 RNA 用一晚的时间转印在尼龙膜上(Hibond N+, Amersham Pharmacia 制造)(转印用溶液使用 20×SSC)。将该膜用 2×SSC 洗涤 5 分钟,风干,用交联用紫外线照射装置(Stratalinker 2400)照射紫外线(300 mJ/cm<sup>2</sup>),固定 RNA。

#### c) 探针的制备

利用存在于 TA 克隆位点附近的 NcoI 位点,通过 NcoI (宝酒造)消化,将质粒 DNA 制成直链 DNA,其中所述质粒 DNA 是小鼠 DC-STAMP ΔT7 cDNA (序列表 SEQ ID NO.5、GenBank Accession No: AB109561)的核苷酸编号 457-1208 所示的核苷酸序列插入到 pGEM-T Easy 载体(Promega 制造)的 TA 克隆位点所得。按照使用说明书使用 DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics K.K.制备)和 SP6 RNA 聚合酶(Roche Diagnostics K.K.制备),制备用 DIG(地高辛)标记的反义 RNA 探针。向该探针制备液中加入 20 单位 RNase-free Dnase I (Roche Diagnostics K.K.制备),分解模板 DNA。制备的 RNA 探针相当于序列表 SEQ ID NO.3 (小鼠 DC-STAMP cDNA)的核苷酸编号 457-1078 和 1247-1376 的序列,因此可以检测 DC-STAMP 和 DC-STAMP ΔT7 两者的 mRNA。

#### d) 杂交

按照使用说明书,将 b)中制成的膜加入到 6 ml 杂交溶液(将 DIG Easy HybGRNAules)再次溶解于蒸馏水中所得: Roche Diagnostics K.K.制备),在 65℃温育 15 分钟(预杂交),然后在 6ml 含有 DIG 标记 RNA 探针的杂交溶液中,在 60℃温育 16 小时。然后将膜在含 2×SSC、0.1% SDS 的溶液中、在室温下洗涤 5 分钟,共洗涤两次,再在含有 0.5×SSC、0.1% SDS 的溶液中、在 65℃洗涤 30 分钟,共洗涤两次。接着将膜用封闭溶液(按照所附说明书将封闭试剂溶解于马来酸缓冲液所得: Roche Diagnostics K.K.制备)处理 30 分钟,然后用含有碱性磷酸酶标记抗地高辛 Fab 片段(0.075 单位/ml) (Roche Diagnostics K.K.)的封闭溶液处理 30 分钟。然后用洗涤缓冲液(5 mM 马来酸缓冲液 pH 7.5、150 mM

氯化钠、0.3%吐温 20)洗涤 15 分钟,共洗涤 3 次,添加发光底物 CDP-Star (Roche Diagnostics K.K.),通过发光图像分析仪(Fuji Photo film 公司制造、LAS-1000plus)进行分析。

结果,RAW-D 中,未添加 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  时,小鼠 DC-STAMP 几乎不表达,添加 RNAKL 和 TNF- $\alpha$ ,则小鼠 DC-STAMP 的表达量显著上升(图 2)。即使再添加 MIP-1 $\alpha$ ,小鼠 DC-STAMP 的表达量也不再增加。

另一方面,RAW-N 中,与 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  的添加无关,几乎未见 DC-STAMP 的表达。同样求出对照小鼠的 GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)表达量。

[实施例 2] RAW-D 中的小鼠 DC-STAMP 的 mRNA 表达(RT-PCR 分析)

将 RAW 用含有 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $7 \times 10^4$  细胞/ml,将其以 500  $\mu$ l/孔铺于 24 孔板,添加人 RNAKL (PeproTech 公司制备),使终浓度为 20 ng/ml;人 TNF- $\alpha$  (PeproTech 公司制备),使终浓度为 2 ng/ml 和小鼠 MIP-1 $\alpha$  (PeproTech 公司制备),使终浓度为 1 ng/ml,培养 0、4、8、16、32、48、72 小时。

接着,按照所附说明书使用总 RNA 提取用试剂(TRIZol 试剂: Introgen 制备),由各个培养时间的 RAW-D 提取总 RNA。使用之前将回收的总 RNA 一直保存在-80 $^{\circ}$ C。将 1  $\mu$ g 总 RNA 和 1  $\mu$ l oligo(dT)18 引物(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)用水制成 11  $\mu$ l,在 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟,然后在 4 $^{\circ}$ C 保温。向该溶液中加入 4  $\mu$ l 5 $\times$ 第一链缓冲液(Introgen 制备)、1  $\mu$ l 10mM dNTPs、2 $\mu$ l 0.1 M 二硫苏糖醇、1  $\mu$ l Superscript II 反转录酶(200 U/ $\mu$ l: Introgen 制备)、1  $\mu$ l 水,使总量为 20  $\mu$ l,在 42 $^{\circ}$ C 反应 1 小时,然后在 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟,在 4 $^{\circ}$ C 保温。

将上述制备的单链 cDNA 通过以下的引物组合进行扩增。

PCR 条件:

用于扩增小鼠 DC-STAMP 和小鼠 DC-STAMP  $\Delta$ T7 的引物:

5' -aaaacccttg ggctgittctt-3' (mDC-STAMP-F:序列表SEQ ID NO. 7 )

和

5' -cttcgcatgc aggtattcaa-3' (mDC-STAMP-R:序列表SEQ ID NO. 8 )、

**用于扩增小鼠组织蛋白酶 K 的引物:**

5' -gagggccaac tcaagaagaa-3' (mcatK-F: 序列表SEQ ID NO. 9 )

和

5' -gccgtggcgt tatacataca-3' (mcatK-R: 序列表SEQ ID NO. 10 ),

**用于扩增小鼠 TRAP 的引物:**

5' -cagctgicct ggctcaaaa-3' (mTRAP-F: 序列表SEQ ID NO. 11 )

和

5' -acatagccca caccgtctc-3' (mTRAP-R: 序列表SEQ ID NO. 12 ),

**用于扩增小鼠 GAPDH 的引物:**

5' -aaacccatca ccatcticca-3' (mGAPDH-F: 序列表SEQ ID NO. 13 )

和

5' -gtggttcaca cccatcacaa-3' (mGAPDH-R: 序列表SEQ ID NO. 14 )

使用热循环仪(GeneAmp PCR 系统 9700、(株)Applied Biosystems Division, Pekin Elmer Japan 事业部制造), 在以下条件下进行 PCR。反应时, 使用 Platinum Taq DNA 聚合酶(Introgen 制备)。首先加入各 8 pmol 的引物、20 ng 单链 cDNA、0.5  $\mu$ l 10 $\times$ 反应缓冲液、0.2  $\mu$ l 50mM MgCl<sub>2</sub>、0.4  $\mu$ l 各 2.5 mM dNTP、0.05  $\mu$ l 5 单位/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶, 用蒸馏水制成 5  $\mu$ l, 制成反应液。将该反应液在 94 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟, 然后进行 94 $^{\circ}$ C 0.5 分钟、65 $^{\circ}$ C 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 1 分钟的温度循环, 共进行 30 个循环, 然后在 72 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 在 4 $^{\circ}$ C 保温。用 2.0%的琼脂糖凝胶对此时的反应液总量进行电泳。

DC-STAMP 基因的表达是在添加 RNAKL、TNF- $\alpha$  和 MIP-1 $\alpha$  8 小时后开始上升, 表达量的上升持续到 72 小时(图 3)。短第三外显子的剪接变体——DC-STAMP  $\Delta$ T7 在添加 RNAKL、TNF- $\alpha$  和 MIP-1 $\alpha$  16 小时后可见表达亢进。另外, 已知作为破骨细胞的标志分子的组织蛋白酶 K 和 TRAP 基因也在 16 小时后可见表达亢进。图 3 中, 上侧的数值是添加 RNAKL、TNF- $\alpha$  和 MIP-1 $\alpha$  后的经过时间数, 右侧以碱基对表

示各个基因通过 PCR 反应扩增的产物的大小。

[实施例 3] 来自小鼠骨髓的初代培养细胞中的小鼠 DC-STAMP 的 mRNA 表达(RT-PCR 分析)

将来自小鼠骨髓的初代培养细胞在活性维生素 D<sub>3</sub> 存在下培养, 出现较多 TRAP 阳性多核破骨细胞(Takahashi 等., *Endocrinology*, (1988)122, 1373-1382)。

在乙醚麻醉下, 将 6 周龄雄性 DDY 小鼠颈椎脱臼, 使其安乐死, 摘除股骨和胫骨。除去软组织, 然后切去股骨或胫骨的两端, 用带有 25 号注射针的注射筒, 将不含有血清的  $\alpha$ -MEM 培养基注入骨髓中, 采集骨髓细胞。测定细胞数, 然后用含有 15% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $2 \times 10^6$  细胞/ml, 将其以 500  $\mu$ l/孔铺于 24 孔板, 加入活性维生素 D<sub>3</sub> (Biomol International LP 制备), 使终浓度为  $1 \times 10^{-8}$  M, 培养 1、3、5、6 天。

接着, 按照所附说明书, 使用总 RNA 提取用试剂(TRIZol 试剂: Introgen 制备), 从上述各个培养时间的细胞中提取总 RNA。使用前一直将回收的总 RNA 保存在 -80℃。

RT-PCR 反应使用 RNA LA PCR 试剂盒(AMV) Ver.1.1 (宝生物化学制造)进行。首先, 加入 2  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、1  $\mu$ l 10 $\times$ RNA PCR 缓冲液、1  $\mu$ l dNTP Mix (各 10 mM)、0.25  $\mu$ l RNase 抑制剂(40 U/ $\mu$ l)、0.5  $\mu$ l 反转录酶(5 U/ $\mu$ l)、0.5  $\mu$ l oligodT-接头引物(2.5 pmol/ $\mu$ l)、1  $\mu$ g 总 RNA, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 制成 10  $\mu$ l, 制备反应液。将该反应液在 50℃ 加热 25 分钟, 然后在 99℃ 加热 5 分钟, 在 4℃ 保温。将该单链 cDNA 利用实施例 2 的引物组合扩增。

使用热循环仪(GeneAmp PCR 系统 9700), 在以下条件下进行 RT-PCR。向 5  $\mu$ l 含有 cDNA 的反应液中加入 1.5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ l 10 $\times$ LA PCR 缓冲液 II (不含 Mg<sup>2+</sup>)、0.125  $\mu$ l Takara LA Taq (5 U/ $\mu$ l)、引物组 (终浓度分别为 1  $\mu$ M), 再用蒸馏水制成 25  $\mu$ l, 制成反应液。将该反应液在 94℃ 加热 2 分钟, 然后进行 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒的温度循环, 共进行 25 个循环, 在 4℃ 保温。然后将 9  $\mu$ l 反应液在 2.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。

结果, DC-STAMP 基因在添加活性维生素 D<sub>3</sub> 后第一天仅有一些表

达,但在形成单核的破骨细胞前体细胞的第三天有显著表达,在多核细胞形成旺盛的第5、6天保持显著的表达(图4)。

另外,DC-STAMP  $\Delta T7$ 的表达量虽然比DC-STAMP低,但是表达量变化显示了与DC-STAMP相同的时间过程。图4中,上侧的数值表示添加活性维生素D<sub>3</sub>后的经过天数。

#### [实施例4] 兔抗小鼠DC-STAMP多克隆抗体的制备

根据小鼠DC-STAMP氨基酸序列(序列表SEQ ID NO.4、GenBank Accession No: AB109560)中位于第6-第7跨膜域之间、含有氨基酸编号330-343所示的氨基酸序列的肽,尝试制备小鼠DC-STAMP蛋白质的部分肽。合成了上述序列的N末端附加有一个胱氨酸残基的部分肽:

Cys Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys Leu Arg Gly Glu (序列表  
SEQ ID NO.15 )

将该肽通过MBS(马来酰亚胺苯甲酰氧基琥珀酰亚胺)法与抗原刺激性载体蛋白KLH(匙孔血蓝蛋白)结合,然后免疫兔,按照常规方法得到兔抗血清。使用加入了免疫中所使用的部分肽的肽亲和柱,对抗血清进行纯化,由此得到兔抗小鼠DC-STAMP多克隆抗体。DC-STAMP  $\Delta T7$  (GenBank Accession No: AB109561)也具有该肽序列,因此可认为该抗体可与DC-STAMP和DC-STAMP  $\Delta T7$ 两者结合。并且,将该肽序列与人DC-STAMP氨基酸序列(序列表SEQ ID NO.2、GenBank Accession No: MM\_030788)中的氨基酸编号330-343所示的序列相比较,只有第334位的Leu(小鼠)变成Phe(人)、第341位的Arg(小鼠)变成His(人),因此可认为本抗体与人DC-STAMP结合的可能性高。

#### [实施例5] 来自新生小鼠胫骨的破骨细胞的免疫染色

##### a) 来自新生小鼠胫骨的破骨细胞的采集

从1日龄DDY小鼠中摘除胫骨,除去软组织,在含有15%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基中用解剖剪剪成碎末状。然后通过稍剧烈的用移液

管抽吸将细胞冲散，使其悬乳，接种于小室载玻片上(Nalge Nunc International)。培养 1 小时，然后以与载玻片粘结的多核细胞作为破骨细胞使用。

**b) 通过免疫染色观察 DC-STAMP 蛋白的表达**

使用 4%低聚甲醛溶液、在室温下将 a)所得的破骨细胞进行 20 分钟固定反应，通过磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤 4 次，然后通过含 3%山羊血清的磷酸缓冲液(pH 7.4)在室温下进行 30 分钟的封闭反应。除去封闭液，然后添加含有 10  $\mu\text{g/ml}$  实施例 4 中制备的兔抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体的磷酸缓冲液(含有 1%马血清)，在室温下反应 30 分钟。另外准备未免疫的兔 IgG 抗体(DAKO Japan 制备)作为阴性对照，进行同样的操作。用含有 1%马血清的磷酸缓冲液洗涤 4 次，使用生物素化山羊抗兔 IgG 抗体(Vector Laboratories 制备)作为二次抗体，在室温下与细胞反应 30 分钟。用磷酸缓冲液洗涤 4 次，然后按照所附说明书使用 ABC-AP 试剂盒(Vector Laboratories 制备)，进行显色反应。结果，用抗 DC-STAMP 抗体反应的破骨细胞中可见强染色，由此可知：来自新生幼鼠胫骨的破骨细胞中有 DC-STAMP 表达。使用阴性对照的对照抗体时，破骨细胞完全未染色。

**[实施例 6] 新生小鼠下颚骨组织中的免疫染色**

**a) 新生小鼠下颚骨组织标本的制备**

将 1 日龄 DDY 小鼠进行乙醚麻醉，将含有 4%低聚甲醛的磷酸缓冲液(pH 7.4)由左心室注入，进行灌注固定。摘除下颚骨，浸泡在上述含有 4%低聚甲醛的磷酸缓冲液(pH 7.4)中，再在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行 12 小时固定反应，用磷酸缓冲液洗涤 3 次，然后再用磷酸缓冲液、在 4 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤过液。然后用 10% EDTA (乙二胺四乙酸)、在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行一星期的脱钙反应。用含有 30%蔗糖的磷酸缓冲液、在 4 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤过液，然后用 OCT 复合物(Sakura Finetek Japan 制造)进行包埋，浸泡在含干冰的异戊烷中使其冷冻。使用切片器(Leica Microsystems GmbH 制造)将这样制备的包埋块切成 10  $\mu\text{m}$  薄，制备下颚骨组织切片。

**b) 通过免疫染色观察 DC-STAMP 蛋白质的表达**

通过风干从 a)中制备的下颚骨组织切片中除去水分，然后与含有 0.3%过氧化氢的甲醇在室温下反应 30 分钟，使内源性过氧化物酶活性

失活。用磷酸缓冲液洗涤3次(室温、各5分钟),用含有10%驴血清的磷酸缓冲液、在室温下反应30分钟,进行封闭。除去封闭液,添加含有10 µg/ml 实施例4中制备的兔抗小鼠DC-STAMP多克隆抗体的磷酸缓冲液(含有2%驴血清),放入湿润箱,在4℃反应过夜。另外准备未被免疫的兔IgG抗体(DAKO Japan 制备)作为阴性对照,同样地进行操作。用磷酸缓冲液洗涤3次(室温、各5分钟),用磷酸缓冲液将生物素化驴抗兔IgG抗体(Jackson Immuno Research Laboratories Inc.制备)稀释200倍,以此作为二次抗体使用,在室温下反应1小时,用磷酸缓冲液洗涤3次(室温、各5分钟),然后用蒸馏水将过氧化物酶标记的链霉抗生物素复合物(DAKO Japan 制备)稀释300倍,在室温下与上述抗体反应30分钟。用磷酸缓冲液洗涤3次(室温、各5分钟),按照所附说明书使用DAB substrate 试剂盒(Vector Laboratories 制备),进行显色反应。结果,用抗DC-STAMP抗体反应的下颌骨组织切片中,可见只有破骨细胞有强染色,表明来自新生小鼠下颌骨的破骨细胞中有DC-STAMP表达。在使用阴性对照的对照抗体时,未见任何细胞染色。

### [实施例7] 通过RAW-D细胞的siRNA抑制破骨细胞分化

#### a) 制备小鼠DC-STAMP基因的siRNA

在有义链、反义链的3'末端各附加有2个碱基(UU)的尿苷所得的各小鼠DC-STAMP siRNA是使用Silencer siRNA construction 试剂盒(Ambio Inc.),按照所附说明书,通过转录制备的。SiRNA制备时所必需的模板寡DNA组如下制备。

首先,制备针对第三外显子的5'侧(由人DC-STAMP cDNA序列推定的氨基酸序列中相当于第7跨膜域)的siRNA和引入变异的siRNA的制备使用下述模板寡DNA的组合。

#### siRNA#135 模板:

5' -aatactagga tigtgtcct cccgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-AS: 序列表  
SEQ ID NO.16 )

和

5' -aagaagacaa caatcctagt acctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-S: 序列表  
SEQ ID NO.17 )

**变异 siRNA#135 模板:**

5' -aataactagga gcgllgicll ccctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-Mut-AS: 序列表 SEQ ID NO. 18、第11位的t变异为g, 第12位的t变异为c。)

和

5' -aagaagacaa cgctccctagi acctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-Mut-S: 序列表 SEQ ID NO. 19、第12位的核苷酸由a变异为g、13位所示的核苷酸由a变异为c。)

针对第三外显子中, 位于上述 siRNA(#135)部分的 3' 侧的、小鼠 DC-STAMP 所特有的 cDNA 序列部分的 siRNA 和变异 siRNA 的制备采用下述模板寡 DNA 的组合。

**siRNA\*6 模板:**

5' -aatlctcgtg tcagltctct lccigtctc-3' (mDC-STAMP-\*6-AS: 序列表 SEQ ID NO. 20 )

和

5' -aaaaggagac tgacacgaga acctgtctc-3' (mDC-STAMP-\*6-S: 序列表 SEQ ID NO. 21 )

**变异 siRNA\*6 模板:**

5' -aatlctcgta ccagltctct lccigtctc-3' (mDC-STAMP-\*6-Mut-AS: 序列表 SEQ ID NO. 22、第9位的核苷酸由g变异为a, 第10位所示的核苷酸由t变异为c。)

和

5' -aaaaggagac tggtaagaga acctgtctc-3' (mDC-STAMP-\*6-Mut-S: 序列表 SEQ ID NO. 23、第13位的核苷酸由a变异为g, 第14位的核苷酸由c变异为t。)

**b) 通过 RAW-D 细胞的 siRNA 抑制破骨细胞分化**

将 RAW-D 用含有 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $4.5 \times 10^4$  细胞/ml, 将其以 80  $\mu$ l/孔铺于 96 孔板。第二天, 更换成 80  $\mu$ l OPTI-MEM I 培养基(Introgen 制备), 将 a) 中制备的 DC-STAMP siRNA 和变异 siRNA 制备成终浓度为 0.1、1、5 nM, 使用转染试剂 siPORT Lipid (Ambion Inc. 制备), 按照所附说明书转染细胞(添加 20  $\mu$ l)。另外还准备

不含 siRNA、只含转染试剂的对照(模拟)。在 CO<sub>2</sub> 培养箱中转染 4 小时, 然后添加 100  $\mu$ l 含有 40 ng/ml 人 RNAKL (PeptoTech 公司制备)、2 ng/ml 人 TNF- $\alpha$  (PeptoTech 公司制备)和 20%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基。培养 3 天后, 使用白细胞酸性磷酸酶试剂盒(Sigma 制备), 按照所附说明书进行 TRAP 染色, 计数形成的 TRAP 阳性多核破骨细胞数。DC-STAMP siRNA#135 的添加浓度为 0.1、1、5 nM 的任意浓度都与添加变异 siRNA#135 的情形不同, 显著抑制破骨细胞形成。变异 siRNA 的添加浓度为 5 nM 时, 可见一些抑制破骨细胞形成的效果, 但是变异 siRNA 的添加浓度为 0.1、1 nM 时, 未见抑制破骨细胞形成的效果。该结果显示, 与模拟对照(siRNA 浓度=0 nM)和阴性对照变异 siRNA 相比, 任何 DC-STAMP siRNA 都可以浓度依赖地抑制由 RNAKL 和 TNF- $\alpha$  诱导的 RAW-D 的 TRAP 阳性多核破骨细胞形成(图 5A、图 5B)。这样, 由 siRNA 抑制 DC-STAMP 基因的表达, 可以抑制 RAW-D 向破骨细胞分化, 由此显示 DC-STAMP 是破骨细胞分化的必需因子。

[实施例 8] 小鼠 DC-STAMP 开放阅读框(ORF) cDNA 克隆的获得

a) 由 RAW-D 提取总 RNA

将 RAW-D 用含有 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制备成  $7 \times 10^4$  细胞/ml, 将其以 500  $\mu$ l/孔铺于 24 孔板, 加入人 RNAKL (PeptoTech 公司制备), 使终浓度为 20 ng/ml; 人 TNF- $\alpha$  (PeptoTech 公司制备), 使终浓度为 2 ng/ml; 以及小鼠 MIP-1 $\alpha$  (PeptoTech 公司制备), 使终浓度为 1 ng/ml, 培养 3 天。

接着按照所附说明书使用总 RNA 提取用试剂(TRIZol 试剂), 由 RAW-D 提取总 RNA。回收的总 RNA 保存在 -80 $^{\circ}$ C。

b) cDNA 第一链

将 1  $\mu$ g 总 RNA 和 1  $\mu$ l oligo(dT)18 引物(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)用水制成 11  $\mu$ l, 在 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 然后在 4 $^{\circ}$ C 保温。向该溶液中加入 4  $\mu$ l 5 $\times$ 第一链缓冲液(Introgen 制备)、1  $\mu$ l 10 mM dNTPs、2  $\mu$ l 0.1M 二硫苏糖醇、1  $\mu$ l Superscript II 反转录酶(200 U/ $\mu$ l、Introgen 制备)、1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 使总量为 20  $\mu$ l, 在 42 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 然后在 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 在 4 $^{\circ}$ C 保温。

c) PCR 反应

通过 PCR 进行小鼠 DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta$ T7 的 ORF cDNA

的引物是按照常规方法合成具有下述序列的寡核苷酸:

5' -tttgcgaca tgaggctctg gaccttgggc accagtattt t-3' (mDC-STAMP-cDNA-F ;

序列表 SEQ ID NO. 24 )

和

5' -tttgcggccg ctcaatagatc atcttcattt gcagggatig t-3' (mDC-STAMP-cDNA-R :

序列表 SEQ ID NO. 25 )、

使用该引物的组合, 使用热循环仪(GeneAmp PCR 系统 9700)、在以下条件下进行 PCR。加入引物(终浓度分别为 1.0  $\mu$ M)、5  $\mu$ l 10 $\times$  Pyrobest PCR 缓冲液(宝酒造制备)、4  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs、1  $\mu$ l cDNA (b) 中制备), 用蒸馏水制成 50  $\mu$ l。再添加 0.5  $\mu$ l 5 U/ $\mu$ l Pyrobest DNA 聚合酶(宝酒造制备), 制备反应液。将该反应液首先在 94 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟, 然后以 94 $^{\circ}$ C 0.5 分钟、60 $^{\circ}$ C 0.5 分钟、72 $^{\circ}$ C 5 分钟的温度循环进行 30 个循环, 然后在 72 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 在 4 $^{\circ}$ C 保温。

d) 向 pCI-neo 载体克隆

按照所附说明书使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen 制造), 对 c) 中所得的 PCR 总反应液进行纯化。所得片段用限制酶 SaII 和 NotI 消化, 用 DNA 连接试剂盒 Ver.1(宝酒造制造)将其与同样用 SaII 和 NotI 消化的 pCI-neo (Promega 制备)连接, 转化大肠杆菌 XL1-BlueMRF' (Stratagene Corporation 制备)。从这样所得的大肠杆菌集落中分离保有质粒 pCI-neo-小鼠 DC-STAMP 的转化大肠杆菌。

使用 DNA 测序仪((株)Applied Biosystems Division, Pekin Elmer Japan 事业部制造 ABI Prism310 DNA 测序仪)对插入到所得质粒的 ORF cDNA 的总核苷酸序列进行分析, 结果得知是序列表 SEQ ID NO.26 所示的序列。该核苷酸序列与 NCBI GeneBank 数据库中登录为“小鼠 DC-STAMP”(登录号: AB109560)的序列的 ORF 编码区相同, 另外, 由该核苷酸编码的氨基酸序列(序列表的 SEQ ID NO.27)与小鼠 DC-STAMP 的氨基酸序列 100%一致。

[实施例 9] 小鼠 DC-STAMP 蛋白的强制表达对 RAW-D 细胞向破骨细胞分化的影响

实施例 8 所得的 pCI-neo-小鼠 DC-STAMP 的质粒是在来自 pCI-neo 的 CMV 启动子下连接小鼠 DC-STAMP 的开放阅读框序列, 因此通过将该质粒导入宿主, 可以表达小鼠 DC-STAMP 蛋白质。

上述表达质粒向 RAW-D 的基因导入(转基因、转染)可通过 DEAE-葡聚糖法进行。

分别向各 3 $\mu$ g pCI-neo-小鼠 DC-STAMP 或未有任何整合的空 pCI-neo 载体中添加混合有 50  $\mu$ l 10 mg/ml DEAE-葡聚糖溶液(Promaga 制备)和 950  $\mu$ l OPTI-MEM I (Invitrogen 制备)的溶液, 制成转染溶液。

用 10 ml 不含血清的  $\alpha$ -MEM 对 RAW-D ( $3.0 \times 10^6$  个)洗涤 2 次 (200 $\times$ g、离心 5 分钟), 将其悬浮于 1 ml 上述转染溶液中。在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 (37 $^{\circ}$ C) 保温 30 分钟, 然后用 10 ml 不含血清的  $\alpha$ -MEM 洗涤 1 次 (200 $\times$ g、离心 5 分钟), 然后再用 10 ml 含有 5% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 洗涤 1 次。以 200 $\times$ g 离心 10 分钟, 使细胞沉淀, 再悬浮于 2 ml 含有 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM。用血细胞计数板测定细胞浓度, 制备成  $4.5 \times 10^4$  个/ml 的细胞浓度, 以 0.15 ml/孔铺于 96 孔板, 添加人 RNAKL (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 20 ng/ml; 人 TNF- $\alpha$  (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 1 ng/ml, 或者不添加, 培养 3 天, 然后使用白细胞酸性磷酸酶试剂盒(Sigma 制造), 按照所附说明书进行 TRAP 染色, 计数形成的 TRAP 阳性多核破骨细胞数。结果, 在 RNAKL、TNF- $\alpha$  非存在下, 即使使小鼠 DC-STAMP 蛋白强制表达, 也完全不能诱导 TRAP 阳性多核破骨细胞, 但在 RNAKL、TNF- $\alpha$  存在下, 与将作为对照的空 pCI-neo 载体对 RAW-D 进行基因导入时相比, 通过使小鼠 DC-STAMP 蛋白强制表达, 可显著促进 TRAP 阳性多核破骨细胞的形成(图 6)。由此显示: DC-STAMP 是促进破骨细胞分化的因子。

**[实施例 10] 添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体对 RAW-D 细胞向破骨细胞分化的影响**

使用实施例 4 中制备的兔抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体, 研究对 RAW-D 向破骨细胞分化的影响。

将 RAW-D 用含有 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $4.5 \times 10^4$  细胞/ml, 将其以 150  $\mu$ l/孔铺于 96 孔板, 添加人 RNAKL (PeproTech 公司制备), 使终浓度为 20 ng/ml; 人 TNF- $\alpha$  (PeproTech 公司制备), 使

终浓度为 1 ng/ml。向该细胞培养上清中添加实施例 4 中制备的兔抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体，使终浓度为 0、5、10、20  $\mu\text{g/ml}$ ，培养 3 天，然后使用白细胞酸性磷酸酶试剂盒(Sigma 制造)，按照所附说明书进行 TRAP 染色，计数所形成的 TRAP 阳性多核破骨细胞数。结果，添加的抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体用量依赖性地抑制 TRAP 阳性多核破骨细胞的形成(图 7)。与未添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体的情形相比，添加 10  $\mu\text{g/ml}$  或以上抗体，则可见显著抑制破骨细胞的形成。

如上所述，通过可认为是与 DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta\text{T7}$  特异性结合的抗体来抑制 RAW-D 形成 TRAP 阳性多核破骨细胞，由此显示 DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta\text{T7}$  与破骨细胞分化有很深关系。

[实施例 11] 通过添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体对来自小鼠骨髓的初代培养细胞向破骨细胞分化的影响

将 6 周龄雄性 DDY 小鼠在乙醚麻醉下颈椎脱臼，使其安乐死，摘除股骨和胫骨。除去软组织后，将股骨或胫骨的两端切去，用带有 25 号注射针头的注射筒向骨髓中注入不含血清的  $\alpha\text{-MEM}$  培养基，采集骨髓细胞。测定细胞数，然后用含有 15% 胎牛血清的  $\alpha\text{-MEM}$  培养基制成  $2 \times 10^6$  细胞/ml，将其以 500  $\mu\text{l}$ /孔铺于 24 孔板，添加活性维生素  $\text{D}_3$  (Biomol International LP 制备)，使终浓度为  $1 \times 10^{-8}$  M。向该细胞培养上清中添加实施例 4 中制备的兔抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体，使终浓度为 0、5、10、20  $\mu\text{g/ml}$ ，培养 6 天后，用白细胞酸性磷酸酶试剂盒(Sigma 制造)，按照所附说明书进行 TRAP 染色，测定所形成的 TRAP 阳性多核破骨细胞数。结果，添加的抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体用量依赖性地抑制 TRAP 阳性多核破骨细胞的形成(图 8)。与未添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体的情形相比，以 5  $\mu\text{g/ml}$  和 20  $\mu\text{g/ml}$  的浓度添加抗体时，可见显著的抑制。这样，通过与 DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta\text{T7}$  特异性结合的抗体，可抑制由小鼠骨髓细胞形成 TRAP 阳性多核破骨细胞，由此表明，DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta\text{T7}$  不仅与 RAW-D 等细胞株，对于与生物体更接近的初代培养细胞，也与其破骨细胞分化有关。

### [实施例 12] 通过添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体对骨吸收窝形成的影响

将来自小鼠股骨和胫骨的细胞在活性维生素 D<sub>3</sub> 存在下、在象牙切片上培养，可观察到象牙表面被破骨细胞侵蚀，产生虫蚀状的骨吸收窝(陷窝) (Takada 等., Bone and Mineral 17, 347-359 (1992)).

将 14 日龄的 ICR 小鼠(雌雄均可)在乙醚麻醉下颈椎脱臼，使其安乐死，摘除股骨和胫骨。除去软组织后，在加入了 1 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基的直径 60 mm 的培养皿中，用剪刀将骨切成粥状。转移至 15 ml 离心管中，加入 10 ml 含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，用漩涡混合器(M&S 機器制造)搅拌 30 秒，然后静置 2 分钟。回收上清，测定细胞数，然后用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基制备成  $1 \times 10^7$  细胞/ml，将其以 100  $\mu$ l/孔铺于 96 孔板中，该 96 孔板中铺有厚度为 150-200  $\mu$ m、直径为 6 mm 的象牙切片(吴羽化学工业制造)，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 小时。然后更换为 200  $\mu$ l 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，添加活性维生素 D<sub>3</sub> (Sigma 制造)，使终浓度为  $1 \times 10^{-8}$  M (也准备了未添加组)。向该细胞培养上清中添加实施例 4 中制备的兔抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体，使终浓度为 0、2、6、20  $\mu$ g/ml，培养 4 天。培养结束后，从放入了象牙的板中除去培养上清，加入蒸馏水，洗涤 1 次，再新加入蒸馏水。使用连接有手摇发动机(东京中井(株)制造)的摩擦刷(多贺谷制作所制造)，将附着于象牙切片上的细胞剥离。用蒸馏水洗涤两次，然后将象牙表面上形成的陷窝用酸性苏木精染液(Sigma 制备)染色 13 分钟，用蒸馏水洗涤两次。将象牙切片翻转，在显微镜下测定陷窝面积。测定陷窝总面积的方法是：用装配在显微镜目镜上的测微仪(10  $\times$  10 格)，计数存在陷窝的所有孔的格数(网格)，以此作为陷窝面积。结果，通过添加活性维生素 D<sub>3</sub>，在象牙切片上形成了很多陷窝，但同时添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体，则用量依赖性地抑制了陷窝形成(图 9)。这样，通过与 DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta$ T7 特异性结合的抗体，可以抑制来自小鼠股骨·胫骨的破骨细胞导致的陷窝的形成，由此显示，DC-STAMP 和 DC-STAMP  $\Delta$ T7 与破骨细胞的骨吸收活性调节有关。

### [实施例 13] 巨细胞瘤组织中的人 DC-STAMP 基因的表达

巨细胞瘤(GCT)是组织学上出现很多破骨型多核巨细胞的骨肿瘤,临床所见特征是具有骨溶解性的骨破坏(Bullough 等., Atlas of Orthopedic Pathology 2nd edition, 17.6-17.8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)).使用 GeneLogic 公司的数据库(Genesis 2003 Release 2.0),使用具有与人 DC-STAMP 基因部分重复的核苷酸序列的 EST 探针(Affymetrix 基因芯片 HG-U133 探针 221266\_s\_at: Affymetrix 制造),对 GCT 组织中表达图谱进行分析。同样使用对破骨细胞分化具有重要作用的 RNAK (Affymetrix 基因芯片 HG-U133 探针 207037\_at: Affymetrix 制造)和 RNAKL (Affymetrix 基因芯片 HG-U133 探针 210643\_at: Affymetrix 制造)、以及破骨细胞分化标志物——组织蛋白 K (Affymetrix 基因芯片 HG-U133 探针 202450\_s\_at: Affymetrix 制造)和 TRAP (Affymetrix 基因芯片 HG-U133 探针 204638\_at: Affymetrix 制造)的 EST 探针,也同样进行 GCT 组织中的表达图谱分析。

对 9 例正常骨组织、14 例 GCT 组织、10 例 GCT 以外的骨肿瘤组织进行表达量比较,与正常组织相比,GCT 组织中的 RNAK 和 RNAKL 的转录特异性亢进(图 10A)。而认为不会引起骨吸收亢进的 GCT 以外的骨肿瘤组织中,与 GCT 相比, RNAK 和 RNAKL 的转录显著降低,为与正常组织同等的表达量,由此显示, GCT 是促进破骨细胞形成和活化的环境。另外,对组织蛋白酶 K 和 TRAP 的表达量进行比较,在 GCT 中显著高转录(图 10B),出现很多具有骨吸收活性的破骨细胞。同样对于 DC-STAMP 进行转录量比较,与 RNAK、RNAKL、组织蛋白酶 K 和 TRAP 相同,在 GCT 中特异性高转录(图 11)。由此显示: GCT 等骨吸收亢进的人的病态与 DC-STAMP 相关。

[实施例 14] 通过添加抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体对人破骨细胞形成的影响

在 M-CSF 和地塞米松存在下,用 RNAKL 刺激人末梢血单核细胞(HPBMC),形成 TRAP 阳性多核破骨细胞(Matsuzaki 等., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998)246, 199-204)。将购自宝生物的 HPBMC 用含有 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基制成  $5 \times 10^6$  细胞/ml,然后以 100  $\mu$ l/孔铺于 96 孔板,添加培养基,使人 M-CSF (R&DSystem 制备)的终

浓度为 200 ng/ml; 地塞米松(和光纯药工业制造)的终浓度为  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ; 以及人 RNAKL (PeproTech 公司制备)的终浓度为 100 ng/ml, 为 200 ml/孔(也准备了 RNAKL 未添加组)。向该细胞培养上清中添加实施例 4 中制备的兔抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体, 使终浓度为 0、2、6  $\mu\text{g/ml}$ 。培养 4、7、11 天后, 更换培养基以及添加检样, 培养 13 天后, 用白细胞酸性磷酸酶试剂盒(Sigma 制造), 按照所附说明书进行 TRAP 染色, 测定形成的 TRAP 阳性多核破骨细胞数。结果, 通过 RNAKL 刺激形成了很多破骨细胞, 但是抗小鼠 DC-STAMP 多克隆抗体用量依赖性地抑制 TRAP 阳性多核破骨细胞的形成(图 12)。这样, 通过抗小鼠 DC-STAMP 抗体, 可抑制由 HPBMC 形成 TRAP 阳性多核破骨细胞, 显示 DC-STAMP 不仅对小鼠, 与人的破骨细胞分化也有关。

#### 产业实用性

根据本发明, 可以得到以抑制破骨细胞的活性为作用机理的骨代谢异常预防药和/或治疗药。

#### 序列表文本

SEQ ID NO.15 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的合成部分肽

SEQ ID NO.16 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA1

SEQ ID NO.17 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA2

SEQ ID NO.18 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA3

SEQ ID NO.19 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA4

SEQ ID NO.20 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA5

SEQ ID NO.21 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA6

SEQ ID NO.22 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA7

SEQ ID NO.23 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的模板 DNA8

SEQ ID NO.24 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的正向 PCR 引物

SEQ ID NO.25 人工序列的说明: 小鼠 DC-STAMP 的反向 PCR 引物。

## 序列表

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> 针对破骨细胞相关蛋白的抗体

<130> FP0504

<140>

<141>

<150> JP2004-035216

<151> 2004-02-12

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1952

<212> DNA

<213> 人 (*Homo sapiens*)

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1462)

<223> 发明人: Nomiyama, Hisayuki; Kukita, Toshio; Hiruma, Yoshiharu

<400> 1

gcatttctgc attcgaagaa gaatctgaga gaaacctgac gcagggagc atg ggt atc 58

Met Gly Ile

1

tgg acc tca ggc act gat atc ttc cta agt ctt tgg gag att tac gtg 106

Trp Thr Ser Gly Thr Asp Ile Phe Leu Ser Leu Trp Glu Ile Tyr Val

5

10

15



ctt gtt tct tgg aac cag acc ctg gca gtc tct ctt ttc agt ccc agc	586
Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Ala Val Ser Leu Phe Ser Pro Ser	
165 170 175	
cat gtc ctg gag gca cag cta aat gac agc aaa ggg gaa gtc ctg agc	634
His Val Leu Glu Ala Gln Leu Asn Asp Ser Lys Gly Glu Val Leu Ser	
180 185 190 195	
gtc ttg tac cag atg gca aca acc aca gag gtg ttg tcc tcc ctg ggt	682
Val Leu Tyr Gln Met Ala Thr Thr Thr Glu Val Leu Ser Ser Leu Gly	
200 205 210	
cag aag cta ott gcc ttt gca ggg ctt tog ctc gtc ctg ott ggc act	730
Gln Lys Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Ser Leu Val Leu Leu Gly Thr	
215 220 225	
ggc ctc ttc atg aag cga ttt ttg ggc cct tgt ggt tgg aag tat gaa	778
Gly Leu Phe Met Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp Lys Tyr Glu	
230 235 240	
aac atc tac atc acc aga caa ttt gtt cag ttt gat gaa agg gag aga	826
Asn Ile Tyr Ile Thr Arg Gln Phe Val Gln Phe Asp Glu Arg Glu Arg	
245 250 255	
cat caa cag agg ccc tgt gtg ctc ccg ctg aat aag gag gaa agg agg	874
His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Glu Glu Arg Arg	
260 265 270 275	
aag tat gtc atc atc ccg act ttc tgg ccg act cct aaa gaa agg aaa	922
Lys Tyr Val Ile Ile Pro Thr Phe Trp Pro Thr Pro Lys Glu Arg Lys	
280 285 290	
aac ctg ggg ctg ttt ttc ctc ccc ata ott atc cat ctc tgc atc tgg	970
Asn Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Ile Leu Ile His Leu Cys Ile Trp	
295 300 305	

gtg ctg ttt gca gct gta gat tat ctg ctg tat cgg ctc att ttc tca	1018
Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu Ile Phe Ser	
310 315 320	
gtg agc aag cag ttt caa agc ttg cca ggg ttt gag gtt cac ttg aaa	1066
Val Ser Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Phe Glu Val His Leu Lys	
325 330 335	
ctg cac gga gag aaa caa gga act caa gat att atc cat gat tct tcc	1114
Leu His Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Asp Ile Ile His Asp Ser Ser	
340 345 350 355	
ttt aat ata tct gtg ttt gaa ccc aac tgt atc cca aaa cca aaa ttc	1162
Phe Asn Ile Ser Val Phe Glu Pro Asn Cys Ile Pro Lys Pro Lys Phe	
360 365 370	
ctt cta tct gag acc tgg gtt cct ctc agt gtt att ctt ttg ata tta	1210
Leu Leu Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Val Ile Leu Leu Ile Leu	
375 380 385	
gtg atg ctg gga ctg ttg tcc tct atc ctt atg caa ctt aaa atc ctg	1258
Val Met Leu Gly Leu Leu Ser Ser Ile Leu Met Gln Leu Lys Ile Leu	
390 395 400	
gtg tca gca tct ttc tac ccc agc gtg gag agg aag cgc atc caa tat	1306
Val Ser Ala Ser Phe Tyr Pro Ser Val Glu Arg Lys Arg Ile Gln Tyr	
405 410 415	
ctg cat gca aag ctg ctt aaa aaa aga tca aag cag ccg ctg gga gaa	1354
Leu His Ala Lys Leu Leu Lys Lys Arg Ser Lys Gln Pro Leu Gly Glu	
420 425 430 435	
gtc aaa aga cgg ctg agt ctc tat ctt aca aag att cat ttc tgg ctt	1402
Val Lys Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Leu Thr Lys Ile His Phe Trp Leu	
440 445 450	

cca gtc ctg aaa atg att agg aag aag caa atg gac atg gca agt gca 1450  
 Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Met Asp Met Ala Ser Ala  
                   455                                  460                                  465

gac aag tca tga gagaccccga ctactcctca gccacatgc accaacaatt 1502  
 Asp Lys Ser  
                   470

ctttcaggt ctaggatggc agtcactatt catgccggat aatagagaac tatgtgacgc 1562

agtcctctca ggagtctgag ttacagagc caacttgac cacctggta tgctccttt 1622

catctcaaag ccaaagagct gccaggtaaa tggttatgtg gtctatgttc caaacaacc 1682

acatgatctt gcctgtgtca caatgtaaca agactctagc tgggtcccct ggtgatgagt 1742

ttcagcatag aataatgttc aaggaaaaga aaacgaaaac agtttaaato tctaccacag 1802

cctcacaagc aaatgctaag gggaacatac atgtaaaaag ccagcaaact atcttcaaac 1862

tcttcogtcc ttaatgtctt ccatggctat tgccccaca atggtctctt ttctccctgc 1922

tcccttatta aagaactctt tctgaaaccc 1952

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Gly Ile Trp Thr Ser Gly Thr Asp Ile Phe Leu Ser Leu Trp Glu  
 1                                  5                                  10                                  15

Ile Tyr Val Ser Pro Arg Ser Pro Gly Trp Met Asp Phe Ile Gln His  
 20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Leu Val Ala Leu Ile Ser Val Gly Leu Leu Ser  
 35 40 45

Val Ala Ala Cys Trp Phe Leu Pro Ser Ile Ile Ala Ala Ala Ala Ser  
 50 55 60

Trp Ile Ile Thr Cys Val Leu Leu Cys Cys Ser Lys His Ala Arg Cys  
 65 70 75 80

Phe Ile Leu Leu Val Phe Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn  
 85 90 95

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Leu Gly His Val Glu  
 100 105 110

Asn Ile Phe His Asn Phe Lys Gly Leu Leu Asp Gly Met Thr Cys Asn  
 115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Ile His Phe Pro Leu Leu Lys Lys Tyr  
 130 135 140

Ile Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Ser Val  
 145 150 155 160

Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Ala Val Ser Leu Phe  
 165 170 175

Ser Pro Ser His Val Leu Glu Ala Gln Leu Asn Asp Ser Lys Gly Glu  
 180 185 190

Val Leu Ser Val Leu Tyr Gln Met Ala Thr Thr Thr Glu Val Leu Ser  
 195 200 205

Ser Leu Gly Gln Lys Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Ser Leu Val Leu  
 210 215 220

Leu Gly Thr Gly Leu Phe Met Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp  
 225 230 235 240

Lys Tyr Glu Asn Ile Tyr Ile Thr Arg Gln Phe Val Gln Phe Asp Glu  
 245 250 255

Arg Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Glu  
 260 265 270

Glu Arg Arg Lys Tyr Val Ile Ile Pro Thr Phe Trp Pro Thr Pro Lys  
 275 280 285

Glu Arg Lys Asn Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Ile Leu Ile His Leu  
 290 295 300

Cys Ile Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu  
305 310 315 320

Ile Phe Ser Val Ser Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Phe Glu Val  
325 330 335

His Leu Lys Leu His Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Asp Ile Ile His  
340 345 350

Asp Ser Ser Phe Asn Ile Ser Val Phe Glu Pro Asn Cys Ile Pro Lys  
355 360 365

Pro Lys Phe Leu Leu Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Val Ile Leu  
370 375 380

Leu Ile Leu Val Met Leu Gly Leu Leu Ser Ser Ile Leu Met Gln Leu  
385 390 395 400

Lys Ile Leu Val Ser Ala Ser Phe Tyr Pro Ser Val Glu Arg Lys Arg  
405 410 415

Ile Gln Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Lys Lys Arg Ser Lys Gln Pro  
420 425 430

Leu Gly Glu Val Lys Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Leu Thr Lys Ile His  
435 440 445

Phe Trp Leu Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Met Asp Met  
 450 455 460

Ala Ser Ala Asp Lys Ser  
 465 470

<210> 3

<211> 1993

<212> DNA

<213> 小鼠 (*Mus musculus*)

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1462)

<223>

<400> 3

gtgctttgtg cttgtggagg aacctagcg gaacttagac acagggaga atg agg ctc 58  
 Met Arg Leu  
 1

tgg acc ttg ggc acc agt att ttc ctg agg ctt tgg ggg act tat gtg 106  
 Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly Thr Tyr Val  
 5 10 15

ttt cca cga agc oct agc tgg ctg gac ttc atc cag cat ttg gga gtc 154  
 Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His Leu Gly Val  
 20 25 30 35

tgt tgc ttt gtg gcc ttc ctt tcg gtg agc ctc ttc tct gca gcc ttt 202  
 Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser Ala Ala Phe  
 40 45 50

tac tgg atc ctg cca ccc gtt gcc ctg ctc tct tct gtc tgg atg atc 250

---

Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val Trp Met Ile  
                   55                                  60                                  65

acc tgt gtt ttc cta tgc tgt tcc aag cgc gca cga tgc ttc att ctt      298  
 Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys Phe Ile Leu  
           70                                  75                                  80

ctg gcc gtt ctg tgc tgt ggc ctc cgt gaa ggt agg aac gct ttg att      346  
 Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ala Leu Ile  
           85                                  90                                  95

gcg gct ggc act ggg gta gtg atc ttt gga cat gtg gaa aat att ttt      394  
 Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu Asn Ile Phe  
 100                                  105                                  110                                  115

tat aac ttc aga ggt ctc cta gac agc atg act tgc aac cta agg gca      442  
 Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn Leu Arg Ala  
                   120                                  125                                  130

aag agc ttt tca gta cat ttc cca ctt tta aaa cgg tat act gaa gcc      490  
 Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr Thr Glu Ala  
                   135                                  140                                  145

atc cag tgg att tac ggc ctt gcc act ccg ctg aat cta ttt gat gac      538  
 Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu Phe Asp Asp  
           150                                  155                                  160

ctt gtt tct tgg aac cag act ctg gtg gtc tct ctt ttt agt ccc agc      586  
 Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe Ser Pro Ser  
           165                                  170                                  175

cat gcc ctg gag gct cat atg aat gac act aga gga gaa gtc ctg gga      634  
 His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu Val Leu Gly  
 180                                  185                                  190                                  195

gtc ctg cac cat atg gtg gtc acg aca gag ctg ttg act tcc gtg gcc      682

---

Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr Ser Val Gly  
 200 205 210

cag aag ttg ctt gcc ctt gcc ggg ctt ctg ctc atc cta gtc agc act 730  
 Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu Val Ser Thr  
 215 220 225

ggc ctc ttc ctg aag cga ttc ctg ggc cct tgt ggc tgg aag tat gag 778  
 Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp Lys Tyr Glu  
 230 235 240

aat gtc tac atc acc aaa caa ttt gtt ogg ttt gat gaa aag gag agg 826  
 Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu Lys Glu Arg  
 245 250 255

cac caa cag cgg ccc tgt gtc ctc ccg ctg aat aag aag gaa agg aag 874  
 His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys Glu Arg Lys  
 260 265 270 275

aaa tat gtc atc gtc cca tct ttg cag ctg act cct aag gag aag aaa 922  
 Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys Glu Lys Lys  
 280 285 290

acc ctt ggg ctg ttc ttc ctt cct gtc ctg acc tat ctc tac atg tgg 970  
 Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu Tyr Met Trp  
 295 300 305

gtg ctg ttt gcc gct gtg gac tat ctg ctg tat ogg ctc atc tcc tcc 1018  
 Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu Ile Ser Ser  
 310 315 320

atg aac aaa cag ttc caa agc ttg cca ggg ctg gaa gtt cac ttg aaa 1066  
 Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys  
 325 330 335

cta cgt gga gag aag caa gga acc caa gga gtc gtc cat gat tct gcc 1114



ctttctcttt ggtgatcctt caagatacat gtcgatcata atgccaaata gccocctaggt 1622  
 aaatagtttc agagtctgtc ttccaaacaa aacacagtat ctaaactgtg tcatagttaa 1682  
 agctatgggt atggctggca tggaaatgtc ctccaaaggc ttagatattt gaaaacttgg 1742  
 tccccagtta gtgcatcttg ggggaggctt ataaggtgtc atgttgctgg acaaagtgtg 1802  
 actccagagg agtgttttgc agttttaaaa gtcatgtgct actcctgttc actctactca 1862  
 gcctgtggct ggagatgtgg gctctcagct gtcocctgocct ccatgtctgt ctgtaataga 1922  
 gttcccaact gtgatattga tggagtctta cctctctgaa accttaagcc caaataaatc 1982  
 cttccttcta t 1993

<210> 4

<211> 470

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly

1                    5                                    10    15

Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His

                  20                                    25    30

Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser

                  35                                    40    45

Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val  
50 55 60

Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys  
65 70 75 80

Phe Ile Leu Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn  
85 90 95

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu  
100 105 110

Asn Ile Phe Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn  
115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr  
130 135 140

Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu  
145 150 155 160

Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe  
165 170 175

Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu  
180 185 190

Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr  
 195 200 205

Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu  
 210 215 220

Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp  
 225 230 235 240

Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu  
 245 250 255

Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys  
 260 265 270

Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys  
 275 280 285

Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu  
 290 295 300

Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu  
 305 310 315 320

Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val  
 325 330 335

His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His  
 340 345 350

Asp Ser Ala Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys  
 355 360 365

Pro Arg Leu Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu  
 370 375 380

Leu Thr Leu Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu  
 385 390 395 400

Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg  
 405 410 415

Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro  
 420 425 430

Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His  
 435 440 445

Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro  
 450 455 460

Ala Asn Glu Asp Asp Leu  
 465 470

<210> 5

<211> 1825

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1294)

<223>

<400> 5

gtgctttgtg cttgtggagg aacctagcg gaacttagac acagggaga atg agg ctc 58

Met Arg Leu

1

tgg acc ttg ggc acc agt att ttc ctg agg ctt tgg ggg act tat gtg 106

Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly Thr Tyr Val

5

10

15

ttt cca cga agc cct agc tgg ctg gac ttc atc cag cat ttg gga gtc 154

Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His Leu Gly Val

20

25

30

35

tgt tgc ttt gtg gcc ttc ctt tgg gtg agc ctc ttc tct gca gcc ttt 202

Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser Ala Ala Phe

40

45

50

tac tgg atc ctg cca ccc gtt gcc ctg ctc tct tct gtc tgg atg atc 250

Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val Trp Met Ile

55

60

65

acc tgt gtt ttc cta tgc tgt tcc aag cgc gca cga tgc ttc att ctt 298

Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys Phe Ile Leu

70

75

80

ctg gcc gtt ctg tcg tgt ggc ctc cgt gaa ggt agg aac gct ttg att	346
Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ala Leu Ile	
85 90 95	
gcg gct ggc act ggg gta gtg atc ttt gga cat gtg gaa aat att ttt	394
Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu Asn Ile Phe	
100 105 110 115	
tat aac ttc aga ggt ctc cta gac agc atg act tgc aac cta agg gca	442
Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn Leu Arg Ala	
120 125 130	
aag agc ttt tca gta cat ttc cca ctt tta aaa cgg tat act gaa gcc	490
Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr Thr Glu Ala	
135 140 145	
atc cag tgg att tac ggc ctt gcc act cgg ctg aat cta ttt gat gac	538
Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu Phe Asp Asp	
150 155 160	
ctt gtt tct tgg aac cag act ctg gtg gtc tct ctt ttt agt ccc agc	586
Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe Ser Pro Ser	
165 170 175	
cat gcc ctg gag gct cat atg aat gac act aga gga gaa gtc ctg gga	634
His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu Val Leu Gly	
180 185 190 195	
gtc ctg cac cat atg gtg gtc acg aca gag ctg ttg act tcc gtg ggc	682
Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr Ser Val Gly	
200 205 210	
cag aag ttg ctt gcc ctt gcc ggg ctt ctg ctc atc cta gtc agc act	730
Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu Val Ser Thr	
215 220 225	

ggc ctc ttc ctg aag cga ttc ctg ggc cct tgt ggc tgg aag tat gag	778
Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp Lys Tyr Glu	
230 235 240	
aat gtc tac atc acc aaa caa ttt gtt cgg ttt gat gaa aag gag agg	826
Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu Lys Glu Arg	
245 250 255	
cac caa cag cgg ccc tgt gtc ctc ccg ctg aat aag aag gaa agg aag	874
His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys Glu Arg Lys	
260 265 270 275	
aaa tat gtc atc gtc cca tct ttg cag ctg act cct aag gag aag aaa	922
Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys Glu Lys Lys	
280 285 290	
acc ctt ggg ctg ttc ttc ctt cct gtc ctg acc tat ctc tac atg tgg	970
Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu Tyr Met Trp	
295 300 305	
gtg ctg ttt gcc gct gtg gac tat ctg ctg tat cgg ctc atc tcc tcc	1018
Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu Ile Ser Ser	
310 315 320	
atg aac aaa cag ttc caa agc ttg cca ggg ctg gaa gtt cac ttg aaa	1066
Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys	
325 330 335	
cta cgt gga gag ctt aaa att ctc gtg tca gtc tcc ttc tac ccc aaa	1114
Leu Arg Gly Glu Leu Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys	
340 345 350 355	
gtg gag agg gag aga att gaa tac ctg cat gcg aag ctc ctt gag aaa	1162
Val Glu Arg Glu Arg Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys	
360 365 370	

cga tca aag cag cca ttg aga gag gct gac ggg aaa ccg agc ctg tac 1210  
 Arg Ser Lys Gln Pro Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr  
 375 380 385

ttt aaa aag att cat ttc tgg ttt cca gtc ctg aaa atg att agg aag 1258  
 Phe Lys Lys Ile His Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys  
 390 395 400

aag cag aca atc cct gca aat gaa gat gat cta tga gcaacacagt 1304  
 Lys Gln Thr Ile Pro Ala Asn Glu Asp Asp Leu  
 405 410

ccctctttct gggccaactg ctgctttgt ctactcaaca agagggggct atctgagaag 1364

gtctacagat gtttgagttt gcaaggctgc ctttctcttt ggtgatcctt caagatacat 1424

gtgatcata atgccaata gcccttaggt aatagtttc agagtctgtc ttccaaacaa 1484

aacacagtat ctaaactgtg tcatagttaa agctatgggt atggctggca tggaaatgtc 1544

ctccaaaggc ttagatattt gaaaacttgg tcccagtta gtgcatcttg ggggaggctt 1604

ataagggtgc atgttgctgg acaaagtgtg actccagagg agtgttttgc agttttaaaa 1664

gtcatgtgct actcctgttc actctactca gcctgtggct ggagatgtgg gctctcagct 1724

gtccctgcct ccattgtctgt ctgtaataga gttcccaact gtgatattga tggagtctta 1784

cctctctgaa accttaagcc caaataaato cttccttcta t 1825

<210> 6

<211> 414

<212> PRT

<213> 小鼠

&lt;400&gt; 6

Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His  
 20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser  
 35 40 45

Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val  
 50 55 60

Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys  
 65 70 75 80

Phe Ile Leu Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn  
 85 90 95

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu  
 100 105 110

Asn Ile Phe Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn  
 115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr  
 130 135 140

Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu  
145 150 155 160

Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe  
165 170 175

Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu  
180 185 190

Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr  
195 200 205

Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu  
210 215 220

Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp  
225 230 235 240

Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu  
245 250 255

Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys  
260 265 270

Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys  
275 280 285

Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu  
 290 295 300

Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu  
 305 310 315 320

Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val  
 325 330 335

His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Leu Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe  
 340 345 350

Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu  
 355 360 365

Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro  
 370 375 380

Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met  
 385 390 395 400

Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro Ala Asn Glu Asp Asp Leu  
 405 410

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 7

aaaacccttg ggctgttctt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 8

cttcgcatgc aggtattcaa 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 9

gaggccaac tcaagaagaa 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 10

gccgtggogt tatacataca 20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 11

cagctgtcct ggtcaaaa

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 12

acatagccca caccgttctc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 13

aaacccatca ccatottcca

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 14

gtggttcaca cccatcacia

20

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的合成的部分序列

<400> 15

Cys Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys Leu Arg Gly Glu

1                    5                    10                    15

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 1

<400> 16

aataactagga ttgttgtcctt ccctgtctc 29

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 2

<400> 17

aagaagacaa caatcctagt acctgtctc 29

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 3

<400> 18

aataactagga gcgttgtcctt ccctgtctc

29

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 4

<400> 19

aagaagacaa cgctoctagt acctgtctc

29

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 5

<400> 20

aattctcgtg tcagtctcct tctgtctc

29

- 
- <210> 21  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 6
- <400> 21  
aaaaggagac tgacacgaga acctgtctc 29
- <210> 22  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 7
- <400> 22  
aattctcgta ccagtctoct tcctgtctc 29
- <210> 23  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 小鼠 DC-STAMP 的 DNA 模板 8
- <400> 23  
aaaaggagac tggtagcaga acctgtctc 29

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的正向 PCR 引物

<400> 24

tttgtcgaca tgaggctctg gaccttgggc accagtattt t

41

<210> 25

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 DC-STAMP 的反向 PCR 引物

<400> 25

tttgcggcog ctcatagatc atcttcattt gcagggattg t

41

<210> 26

<211> 1410

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1410)

<223>

<400> 26

atg agg ctc tgg acc ttg ggc acc agt att ttc ctg agg ctt tgg ggg

48



Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu	
145	150 155 160
ttt gat gac ctt gtt tct tgg aac cag act ctg gtg gtc tct ctt ttt	528
Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe	
165	170 175
agt ccc agc cat gcc ctg gag gct cat atg aat gac act aga gga gaa	576
Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu	
180	185 190
gtc ctg gga gtc ctg cac cat atg gtg gtc acg aca gag ctg ttg act	624
Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr	
195	200 205
tcc gtg ggc cag aag ttg ctt gcc ctt gcc ggg ctt ctg ctc atc cta	672
Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu	
210	215 220
gtc agc act ggc ctc ttc ctg aag cga ttc ctg ggc cct tgt ggc tgg	720
Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp	
225	230 235 240
aag tat gag aat gtc tac atc acc aaa caa ttt gtt cgg ttt gat gaa	768
Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu	
245	250 255
aag gag agg cac caa cag cgg ccc tgt gtc ctc ccg ctg aat aag aag	816
Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys	
260	265 270
gaa agg aag aaa tat gtc atc gtc cca tct ttg cag ctg act cct aag	864
Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys	
275	280 285
gag aag aaa acc ctt ggg ctg ttc ttc ctt cct gtc ctg acc tat ctc	912

Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu	
290	295 300
tac atg tgg gtg ctg ttt gcc gct gtg gac tat ctg ctg tat cgg ctc	960
Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu	
305	310 315 320
atc tcc tcc atg aac aaa cag ttc caa agc ttg cca ggg ctg gaa gtt	1008
Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val	
	325 330 335
cac ttg aaa cta cgt gga gag aag caa gga acc caa gga gtc gtc cat	1056
His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His	
	340 345 350
gat tot gcc ttt aat ata tct atg ttt gaa ccg agc tgc att cct aaa	1104
Asp Ser Ala Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys	
	355 360 365
cca cgt ctc agt gtg tct gag act tgg gtt cct ctc agt att att ctg	1152
Pro Arg Leu Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu	
	370 375 380
tta aca cta ata ata cta gga ttg ttg tct tct atg ctg atg cag ctt	1200
Leu Thr Leu Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu	
	385 390 395 400
aaa att ctc gtg tca gtc tcc ttc tac ccc aaa gtg gag agg gag aga	1248
Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg	
	405 410 415
att gaa tac ctg cat gcg aag ctc ctt gag aaa cga tca aag cag cca	1296
Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro	
	420 425 430
ttg aga gag gct gac ggg aaa ccg agc ctg tac ttt aaa aag att cat	1344

Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His  
 435 440 445

ttc tgg ttt cca gtc ctg aaa atg att agg aag aag cag aca atc oct 1392  
 Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro  
 450 455 460

gca aat gaa gat gat cta tga 1410  
 Ala Asn Glu Asp Asp Leu  
 465 470

<210> 27

<211> 470

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 27

Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His  
 20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser  
 35 40 45

Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val  
 50 55 60

Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys



---

210	215	220	
Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp			
225	230	235	240
Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu			
	245	250	255
Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys			
	260	265	270
Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys			
	275	280	285
Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu			
	290	295	300
Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu			
305	310	315	320
Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val			
	325	330	335
His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His			
	340	345	350
Asp Ser Ala Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys			

---

355	360	365
Pro Arg Leu Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu		
370	375	380
Leu Thr Leu Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu		
385	390	395 400
Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg		
	405	410 415
Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro		
420	425	430
Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His		
435	440	445
Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro		
450	455	460
Ala Asn Glu Asp Asp Leu		
465	470	

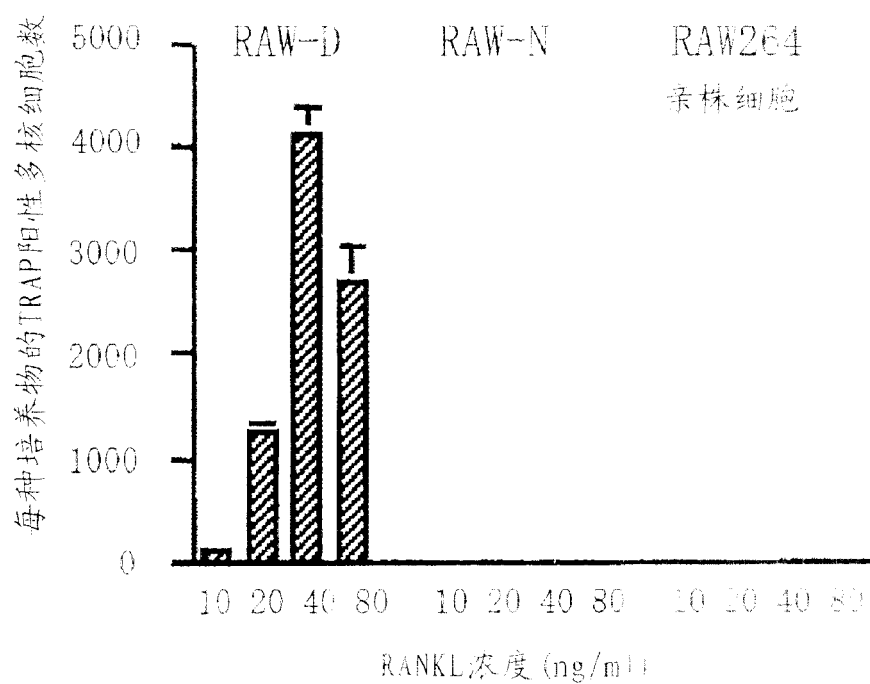


图 1

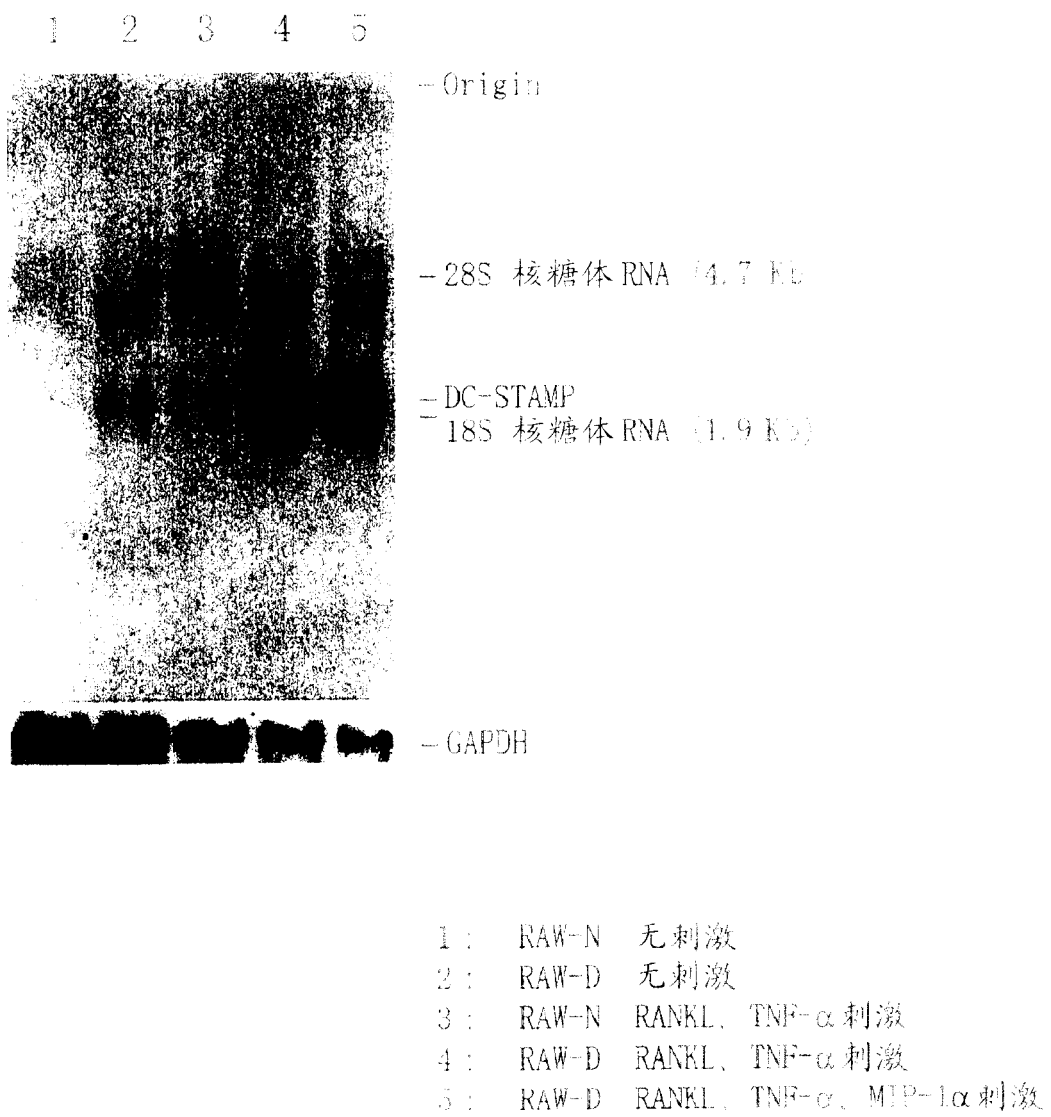


图 2

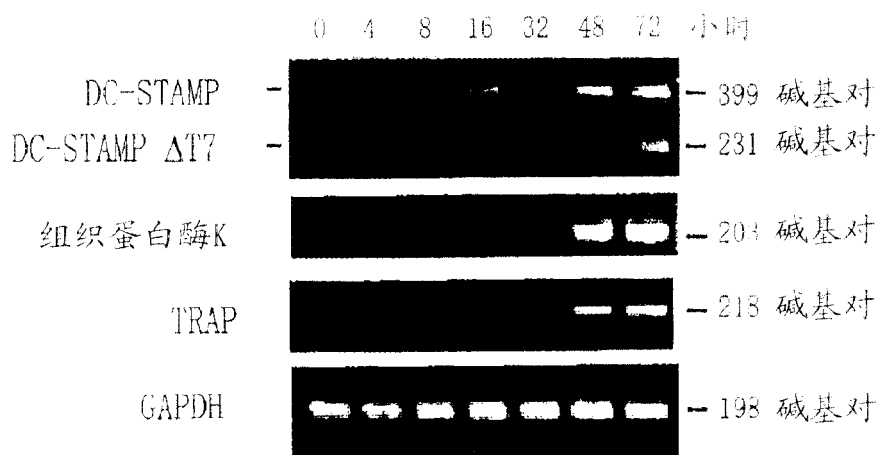


图 3

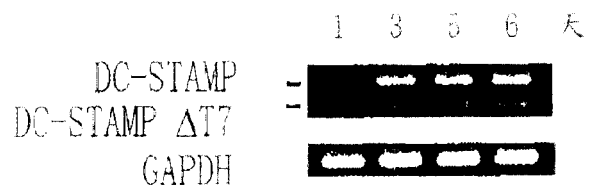
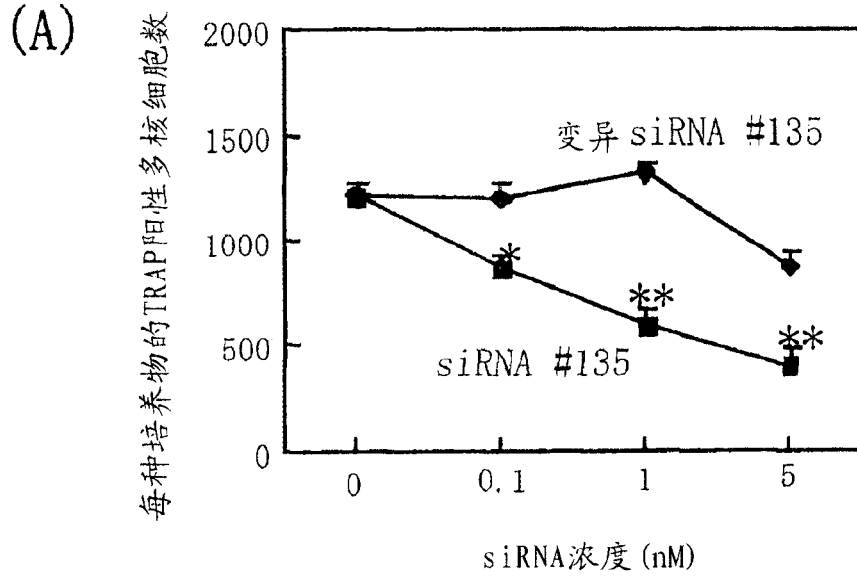
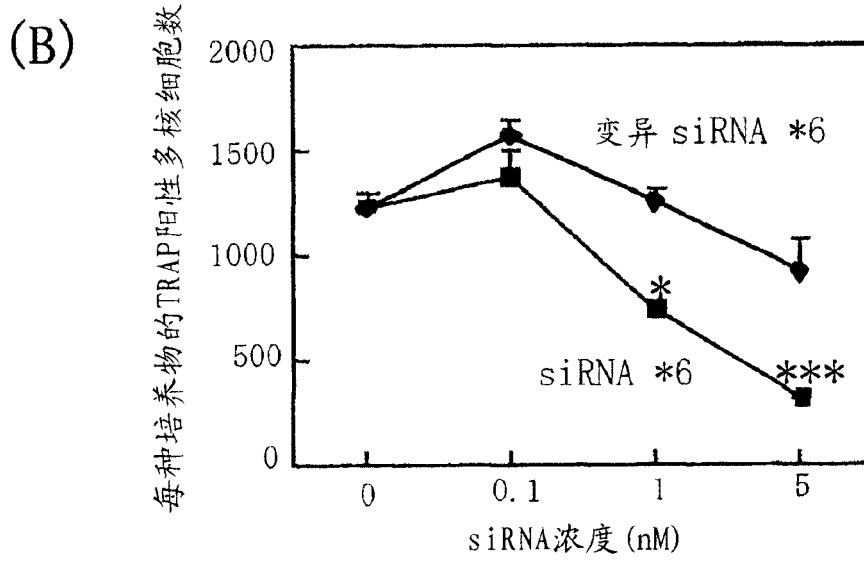


图 4



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 0 nM



\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. 0 nM

图 5

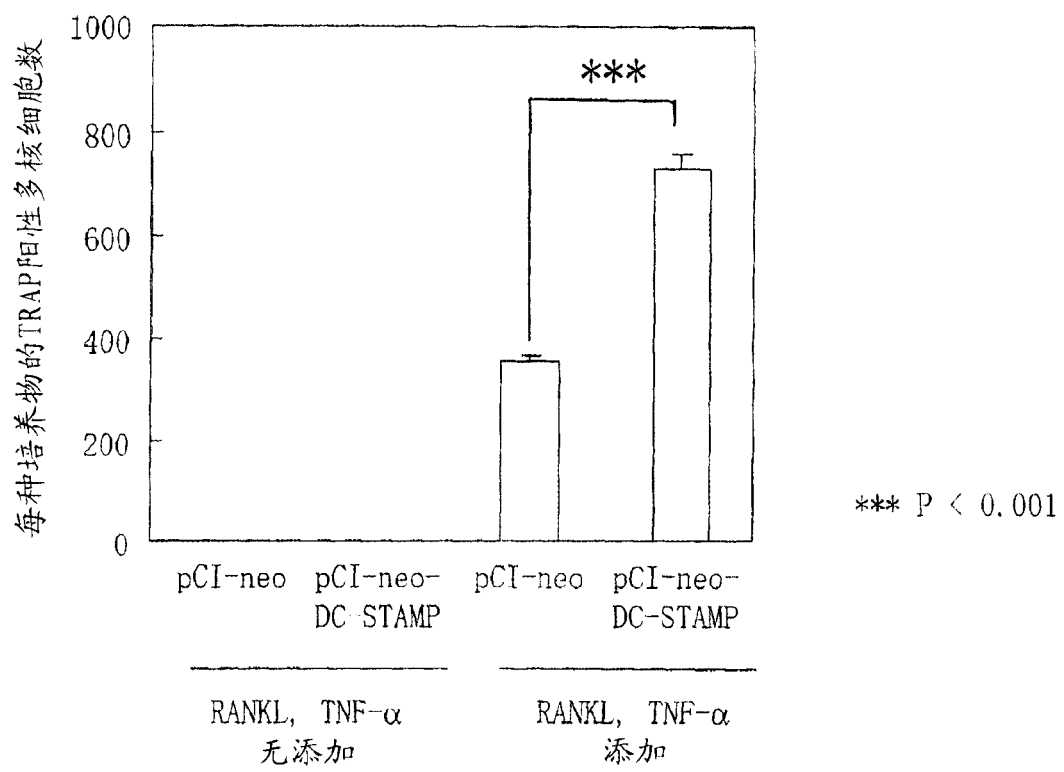


图 6

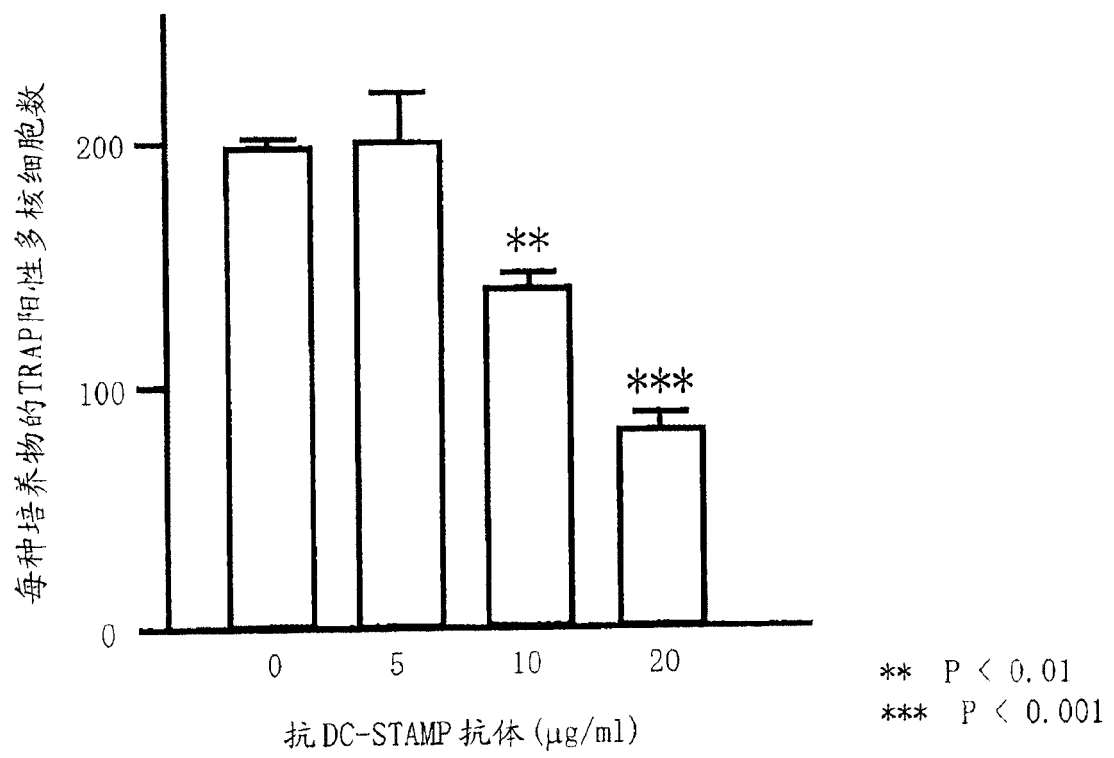


图 7

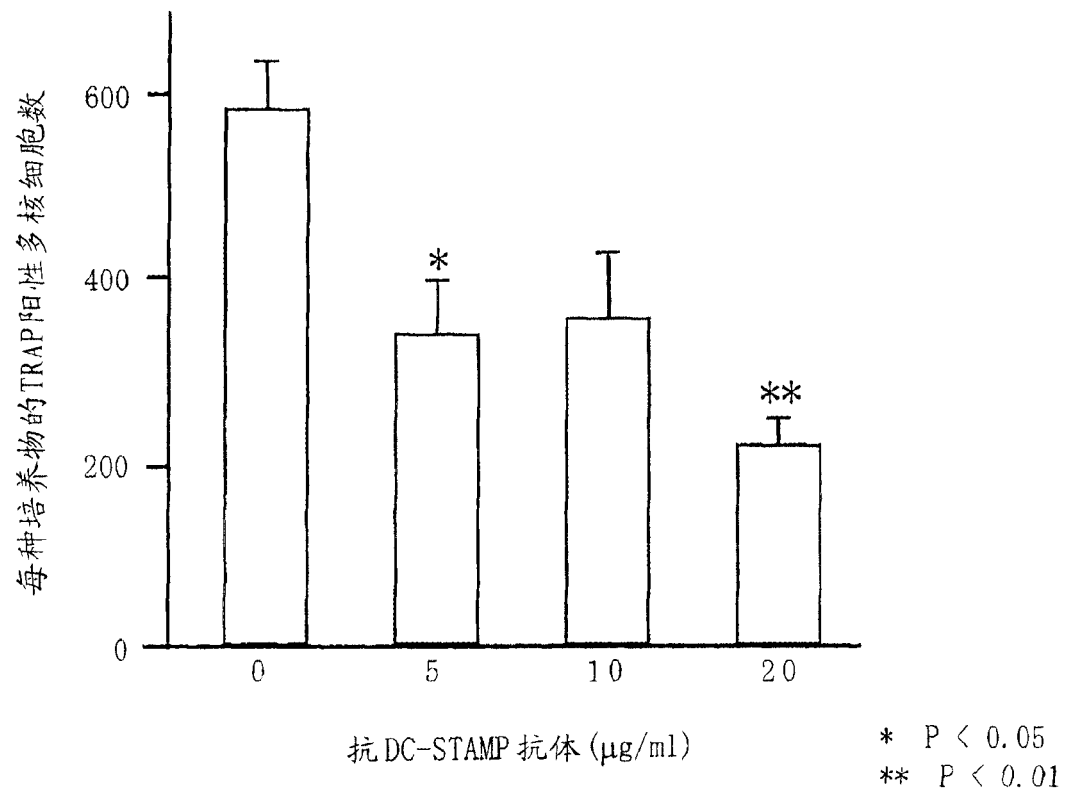


图 8

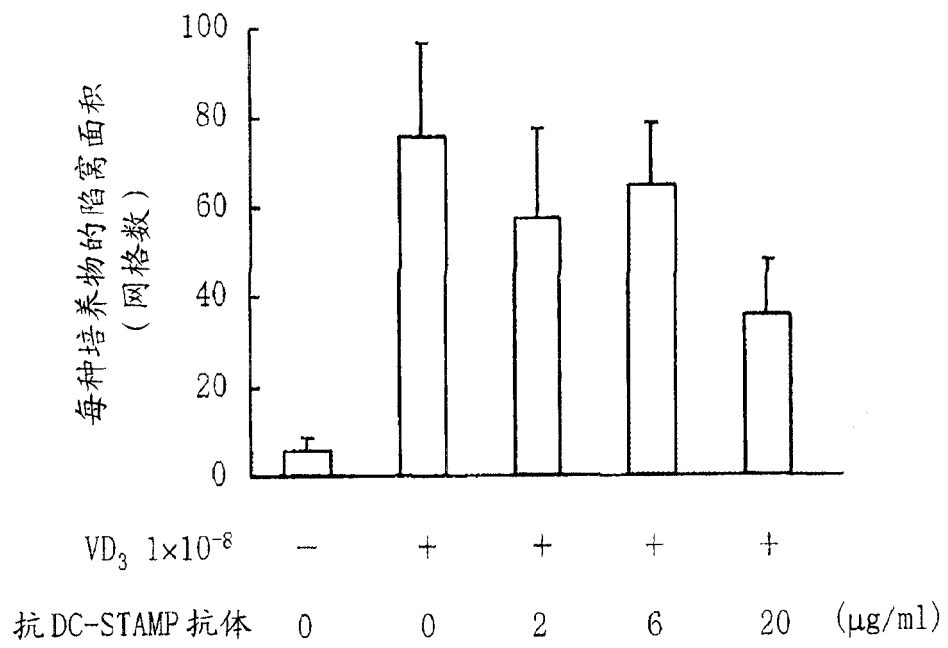
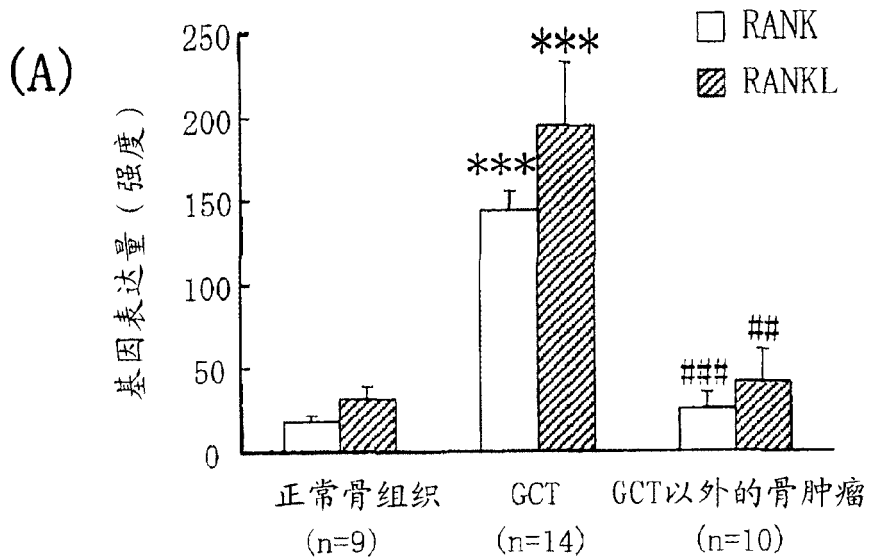
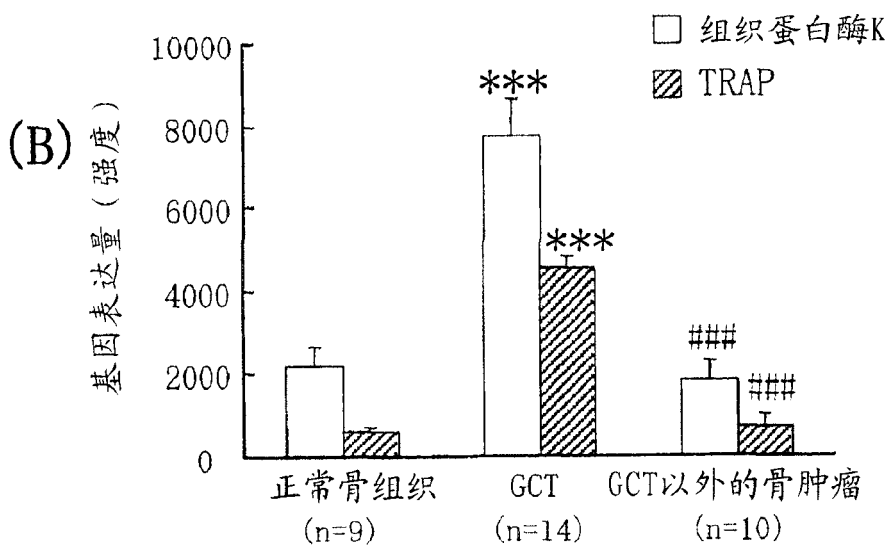


图 9

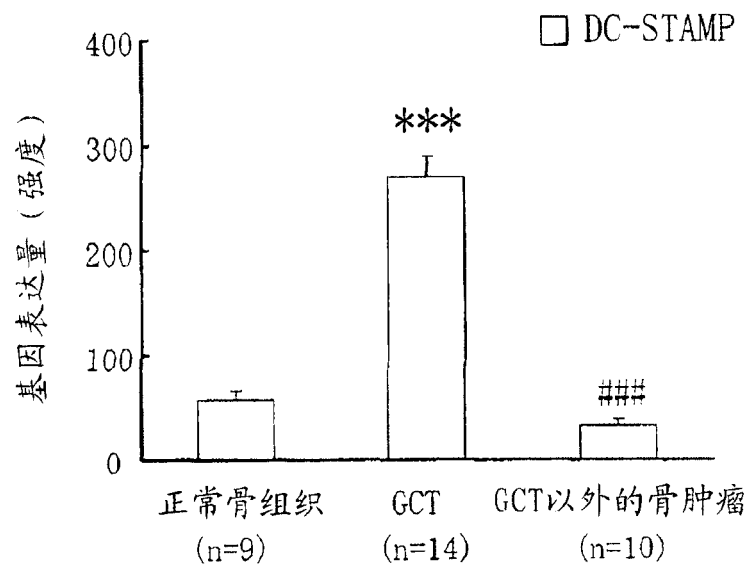


\*\*\* P < 0.001 vs. 正常骨组织  
 ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs. GCT



\*\*\* P < 0.001 vs. 正常骨组织  
 ### P < 0.001 vs. GCT

图 10



\*\*\* P < 0.001 vs. 正常骨组织  
### P < 0.001 vs. GCT

图 11

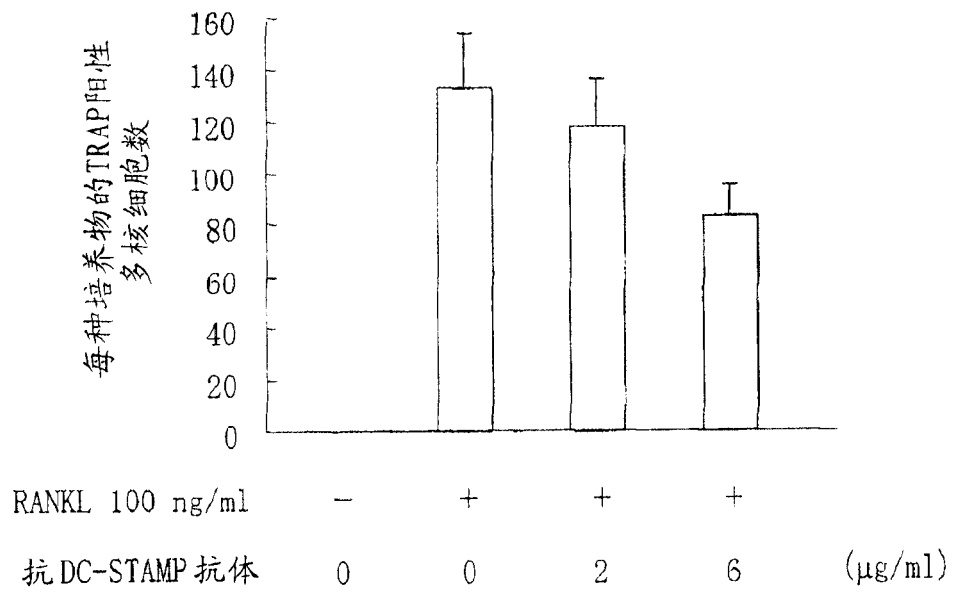


图 12

专利名称(译)	针对破骨细胞相关蛋白质的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1942581A</a>	公开(公告)日	2007-04-04
申请号	CN200580011060.2	申请日	2005-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	野见山尚之 久木田敏夫 昼间由晴		
发明人	野见山尚之 久木田敏夫 昼间由晴		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 A61K39/395 A61K48/00 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00		
CPC分类号	C07K2317/34 C12Q2600/158 G01N2800/108 A61K2039/505 C12Q1/6811 C07K2316/96 C12Q1/6883 C07K16/28 A61P3/14 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 C07K2317/73		
代理人(译)	郭文洁 吴娟		
优先权	2004035216 2004-02-12 JP		
其他公开文献	CN1942581B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及使用在破骨细胞细胞中强烈表达的基因的骨代谢异常检测方法、具有骨代谢异常治疗和/或预防效果的化合物的筛选方法、以及用于骨代谢异常的治疗和/或预防的药物组合物。即，本发明提供以人DC-STAMP基因的表达为指标的骨代谢异常的检测方法，以及含有特异性识别人DC-STAMP、具有抑制破骨细胞的形成的活性的抗体的药物组合物。

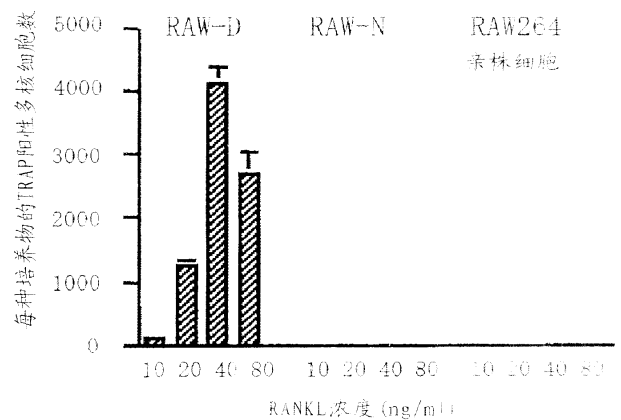


图 1