

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 246**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01) A61P 19/08	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) A61P 19/10	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01) C12N 5/10	(2006.01)
A61K 31/122	(2006.01) C12P 21/08	(2006.01)
A61K 31/352	(2006.01)	
A61K 31/565	(2006.01)	
A61K 31/593	(2006.01)	
A61K 31/663	(2006.01)	
A61K 38/23	(2006.01)	
A61K 45/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008** **E 15161779 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2907826**

54 Título: **Anticuerpo que se dirige a la proteína Siglec-15 relacionada con osteoclastos**

30 Prioridad:

11.10.2007 JP 2007265420

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2018

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi- Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

HIRUMA, YOSHIHARU y
TSUDA, EISUKE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 677 246 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo que se dirige a la proteína Siglec-15 relacionada con osteoclastos

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a una sustancia útil como agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal, a un procedimiento de exploración de una sustancia útil como agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal, a un procedimiento para detectar el metabolismo óseo anormal y a un procedimiento para el tratamiento y/o prevención del metabolismo óseo anormal.

[Técnica antecedente]

10 Se sabe que el hueso es un órgano dinámico que continuamente se regenera mediante la formación y resorción para cambiar su propia morfología y mantener los niveles de calcio en sangre. El hueso sano mantiene un equilibrio entre la formación de huesos por los osteoblastos y la resorción ósea por los osteoclastos, y la masa ósea se mantiene constante. Por el contrario, cuando se pierde el equilibrio entre la formación y resorción de hueso, sucede el metabolismo óseo anormal, tal como la osteoporosis (Endocrinological Review, (1992) 13, págs. 66-80; Principles of Bone Biology, Academic Press, Nueva York, (1996) págs. 87-102).

15 Como factores que regulan el metabolismo óseo, se han comunicado muchas hormonas sistémicas y citocinas locales, y estos factores colaboran entre sí para formar y mantener el hueso (Endocrinological Review, (1992) 13, págs. 66-80; Endocrinological Review, (1996) 17, págs. 308-332). Como cambio en el hueso debido al envejecimiento, se conoce ampliamente la aparición de la osteoporosis, pero el mecanismo de su aparición abarca
20 varios factores, tales como una disminución en la secreción de hormonas sexuales y una anomalía en los receptores para las hormonas, la variación en la expresión de citocinas localmente en el hueso, la expresión de genes del envejecimiento, y el fallo o disfunción en la diferenciación de osteoclastos u osteoblastos, y por lo tanto, es difícil considerarlo como un simple fenómeno fisiológico relacionado con la edad. La osteoporosis primaria se divide
25 generalmente en osteoporosis postmenopáusica debida a una disminución en la secreción de estrógenos y osteoporosis senil, debida al envejecimiento, pero el avance en la investigación básica acerca de los mecanismos de regulación de la formación ósea y la resorción ósea es esencial para dilucidar el mecanismo de aparición y para desarrollar un agente terapéutico para esta.

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de células madre hematopoyéticas, y mediante la liberación de iones de cloro e iones de hidrógeno en una superficie ósea a la que se adhieren los osteoclastos, los osteoclastos acidifican un hueco entre la superficie ósea y los osteoclastos, y también secretan catepsina K que es una proteasa
30 ácida o similares (American Journal of Physiology, (1991) 260, C1315-C1324). Esto causa la degradación del fosfato de calcio, la activación de proteasas ácidas y la degradación de las proteínas de la matriz ósea, dando como resultado la resorción ósea.

Se ha descubierto que las células precursoras de osteoclastos en osteoclastos mediante estimulación con RANKL (receptor activador de ligando de NF-κB) expresado sobre la membrana celular de osteoblastos/células estromales presentes sobre la superficie del hueso (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, (1998) 95, págs. 3597-3602; Cell, (1998) 93, págs. 165-176). Se ha desvelado que RANKL es una proteína de membrana producida por osteoblastos/células estromales, estando su expresión regulada por un factor de resorción ósea, RANKL induce la diferenciación de células precursoras de osteoclastos en osteoclastos multinucleados, y similares (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, (1998)
40 95, págs. 3597-3602; Journal of Bone and Mineral Research, (1998) 23, S222). Además, se ha descubierto que los ratones *knockout* desprovistos de RANKL desarrollan una enfermedad similar a la osteopetrosis, y por lo tanto, se ha demostrado que RANKL es un factor inductor de la diferenciación fisiológica de osteoclastos (Nature, (1999) 397, págs. 315-323).

45 El documento EP 1715038 describe el gen DC-STAMP. Se genera un anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino y se describen los efectos de este anticuerpo en la diferenciación de células RAW-D en osteoclastos.

Como fármacos para tratar enfermedades del metabolismo óseo o para acortar la duración del tratamiento se usan los bifosfonatos, la vitamina D₃ activa, la calcitonina y derivados de los mismos, las preparaciones de hormonas, tales como el estradiol, los SERM (moduladores selectivos del receptor de estrógeno), ipriflavone, vitamina K₂ (menatetrenona), preparaciones de PTH (hormona paratiroidea), preparaciones de calcio y similares. Sin embargo,
50 estos fármacos no siempre muestran un efecto terapéutico satisfactorio y se ha demandado el desarrollo de un agente con un efecto terapéutico más potente.

Las membranas celulares de células inmunitarias están cubiertas con un denso recubrimiento de varios glicanos, tales como ácido siálico, que son reconocidos por varias proteínas de unión a glicanos. Las lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico (en lo sucesivo citadas como "Siglec") son una familia de proteínas de membrana de tipo I que reconocen los glicanos sialilados y se unen a estos. Muchas Siglec se expresan en las membranas celulares de células inmunitarias y reconocen al ácido siálico presente de manera similar en las membranas celulares de células inmunitarias y regulan la interacción celular o función celular y se considera que

están implicadas en la respuesta inmunitaria (Nature Reviews Immunology, (2007) 7, págs. 255-266). Sin embargo, también hay muchas moléculas de Siglec cuyas funciones fisiológicas aún no se han dilucidado. Siglec-15 (lectina 15 de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico) es una molécula que se ha comunicado recientemente como pertenecientes a los Siglec (Glycobiology, (2007) 17, págs. 838-846) y es idéntica a una molécula denominada CD33L3 (molécula 3 similar a CD33). Esta molécula está evolutivamente elevadamente conservada desde los peces hasta los seres humanos y se ha descubierto que está fuertemente expresada en células dendríticas y/o macrófagos del bazo y nódulos linfáticos humanos. Además, como resultado de un ensayo de unión usando una sonda de ácido siálico, también se ha descubierto que Siglec-15 humana se une a Neu5Acα2-6GalNAc, y que Siglec-15 de ratón se une a Neu5Acα2-3Gaβ1-4Glc además de a Neu5Acα2-6GalNAc (Glycobiology, (2007) 17, págs. 838-846). Hasta hace poco, el papel fisiológico de Siglec-15 no había sido revelado, sin embargo, se ha comunicado que la expresión de Siglec-15 aumenta con la diferenciación y maduración de osteoclastos, y la diferenciación de osteoclastos se inhibe, disminuyendo la expresión de Siglec-15 mediante interferencia de ARN (documento WO 2007/093042). Sin embargo, aún no se ha dilucidado el efecto de un anticuerpo anti-Siglec-15 en la diferenciación de osteoclastos.

[Descripción]

[Problemas a resolver por la invención]

En el presente documento se proporciona un gen que se expresa específicamente en varias formas de metabolismo óseo anormal, tal como destrucción ósea que se observan en la osteoporosis, artritis reumatoide, metástasis del cáncer al hueso o similares; una sustancia que inhibe la diferenciación y maduración de osteoclastos y la actividad de los mismos; un nuevo procedimiento para explorar un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal; una sustancia que inhibe la diferenciación y maduración de osteoclastos y la actividad de los mismos; y un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal.

[Medios para resolver los problemas]

Los presentes inventores estudiaron para dilucidar el mecanismo de la diferenciación, maduración y activación de osteoclastos para encontrar una sustancia que tenga un efecto terapéutico y/o preventivo del metabolismo óseo anormal. Como resultado, descubrieron que la expresión del gen de Siglec-15 aumenta con la diferenciación y maduración de osteoclastos y también descubrieron que la diferenciación de los osteoclastos se inhibe por un anticuerpo que se une específicamente a Siglec-15.

Es decir, la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se entenderá que la invención se refiere a ADNc que codifica lo siguiente:

un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que reconoce específicamente a uno o más polipéptidos de Siglec-15 que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en una cualquiera de las siguientes (a) a (i) e inhibe la formación de osteoclastos y/o la resorción ósea osteoclástica:

- (a) una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2' en el Listado de secuencias;
- (b) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 328 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
- (c) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 260 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
- (d) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 260 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
- (e) una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
- (f) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 341 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
- (g) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 258 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
- (h) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 258 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias.
- (i) una secuencia de aminoácidos que incluye la sustitución, delección o adición de solo un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (a) a (h).

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir el proceso de fusión celular de los osteoclastos.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la formación de osteoclastos inducida por TNF-α.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la formación de osteoclastos *in vitro* a una concentración de 30 µg/ml o menos.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la formación de osteoclastos *in vitro* a una concentración de 3 µg/ml o menos.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la formación de osteoclastos *in vitro* a una

concentración de 1 µg/ml o menos.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la formación de osteoclastos *in vitro* a una concentración de desde 63 ng/ml hasta 1 µg/ml.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la resorción ósea osteoclástica.

- 5 El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir resorción ósea osteoclástica *in vitro* a una concentración de 3 µg/ml o menos.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede inhibir la resorción ósea osteoclástica *in vitro* a una concentración de desde 0,3 µg/ml hasta 3 µg/ml.

- 10 El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo producido por el hibridoma N° 32A1 (FERM BP-10999).

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede competir con un anticuerpo producido por el hibridoma N° 32A1 (FERM BP-10999).

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo producido por el hibridoma N° 41B1 (FERM BP-11000).

- 15 El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede competir con un anticuerpo producido por el hibridoma N° 41B1 (FERM BP-11000).

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede estar humanizado.

El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede ser un anticuerpo humano.

- 20 El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG.

Los vectores, células eucariotas, los anticuerpos que pueden obtenerse cultivando dichas células eucariotas y los procedimientos para producir un anticuerpo son como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

- 25 Un anticuerpo como se ha definido anteriormente puede estar presente en una composición farmacéutica. Un anticuerpo como se ha definido anteriormente puede usarse en el tratamiento o la prevención del metabolismo óseo anormal, ya sea solo o en combinación con uno o más agentes.

[Ventajas de la invención]

Usando, puede obtenerse un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal cuyo mecanismo de acción es inhibir la diferenciación y maduración de osteoclastos y la actividad de los mismos.

[Breve descripción de las figuras]

- 30 [Fig. 1]
La Fig. 1 muestra gráficas que ilustran un análisis de perfil de expresión para los genes RANKL, RANK, catepsina K, y TRAP en tejidos tumorales de células gigantes.

- [Fig. 2]
35 La Fig. 2 muestra una gráfica que ilustra un análisis de perfil de expresión para el gen Siglec-15 en tejidos tumorales de células gigantes.

[Fig. 3]

La Fig. 3 muestra una gráfica que ilustra un cambio en el nivel de expresión del gen Siglec-15 cuando se indujo la diferenciación de osteoclastos a partir de células RAW 264.7 o de células de médula ósea de ratón.

[Fig. 4]

- 40 La Fig. 4 muestra gráficas que ilustran la expresión de genes de catepsina K y TRAP que acompañan a la diferenciación de osteoclastos de células RAW 264.7.

[Fig. 5]

La Fig. 5 muestra una gráfica que ilustra la expresión del gen Siglec-15 que acompaña a la diferenciación de osteoclastos de células RAW 264.7.

- 45 [Fig. 6]

La Fig. 6 muestra los resultados de detectar un cambio en la expresión de Siglec-15-His de ratón en células 293F con tiempo de cultivo mediante electroforesis SDS-poliacrilamida y transferencia de Western usando un anticuerpo anti-6-His-HRP.

[Fig. 7]

- 50 La Fig. 7 muestra los resultados de detectar un cambio en la expresión de Siglec-15-His de ratón en células 293F con tiempo de cultivo mediante electroforesis SDS-poliacrilamida y transferencia de Western usando un

anticuerpo de IgG-Fc-HRP anti-humano.

[Fig. 8]

La Fig. 8 muestra los resultados de evaluar la pureza del Siglec-15-His de ratón purificado por cromatografía en columna de HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida y tinción de plata.

[Fig. 9]

La Fig. 9 muestra los resultados de detectar el comportamiento del Siglec-15-His purificado por cromatografía en columna de HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida y transferencia de Western usando un anticuerpo anti-V5-HRP.

[Fig. 10]

La Fig. 10 muestra los resultados de evaluar la pureza de Siglec-15-Fc de ratón purificada mediante cromatografía en columna de proteína A HiTrap mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida y tinción de plata.

[Fig. 11]

La Fig. 11 muestra los resultados de confirmar que un anticuerpo policlonal Siglec-15 anti-ratón purificado se une no solo a Siglec-15-Fc sino también a Siglec-15-His mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida y transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal Siglec-15 anti-ratón y un anticuerpo de IgG-HRP anti-conejo.

[Fig. 12]

La Fig. 12 muestra un cromatograma de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón purificado con una columna de afinidad que tenga Siglec-15-Fc de ratón inmovilizado en esta.

[Fig. 13]

La Fig. 13 muestra los resultados de evaluar la pureza de Siglec-15-Fc de ratón purificado mediante cromatografía usando una columna de afinidad que tenía Siglec-15-Fc de ratón inmovilizado en esta.

[Fig. 14]

La Fig. 14 muestra cromatogramas de anticuerpos policlonales de Siglec-15 anti-ratón purificados con una columna de filtración de gel Superose 6.

[Fig. 15]

La Fig. 15 muestra los resultados de ensayar el efecto de la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón purificado por afinidad en la diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de células no adherentes de médula ósea de ratón (N = 3).

[Fig. 16]

La Fig. 16 muestra los resultados de ensayar el efecto de la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón purificado mediante filtración en gel en la diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de células no adherentes de médula ósea de ratón basándose en la actividad enzimática de TRAP (N = 3).

[Fig. 17]

La Fig. 17 muestra los resultados de ensayar la neutralización mediante un antígeno de inhibición de la diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de células no adherentes de médula ósea de ratón mediante la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón basándose en la actividad enzimática de TRAP (N = 3).

[Fig. 18]

La Fig. 18 muestra los resultados de ensayar el efecto de la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón en la diferenciación de osteoclastos (estimulación con TNF- α) de células no adherentes de médula ósea de ratón basándose en la actividad enzimática de TRAP (N = 3).

[Fig. 19]

La Fig. 19 muestra fotomicrografías usadas para evaluar el efecto de la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón en la diferenciación de osteoclastos (estimulación con TNF- α) de células no adherentes de médula ósea de ratón mediante tinción con TRAP.

[Fig. 20]

La Fig. 20 muestra gráficas que ilustran, mediante la actividad enzimática de TRAP, la inhibición de la diferenciación de osteoclastos (estimulación con vitamina D₃ activa) de células de médula ósea de ratón mediante la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón (N = 6).

[Fig. 21]

La Fig. 21 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes (estimulación con vitamina D₃ activa) a partir de células de médula ósea de ratón mediante la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón.

[Fig. 22]

La Fig. 22 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes (estimulación con RANKL humana) a partir de células de médula ósea de ratón mediante la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón.

[Fig. 23]

La Fig. 23 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes (estimulación con RANKL humana) a partir de células RAW 264.7 mediante la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón y la anulación del efecto inhibitorio mediante Siglec-15 soluble.

[Fig. 24]

La Fig. 24 muestra los resultados de ensayar la unión de un anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón a una placa que tiene Siglec-15-Fc de ratón inmovilizado sobre esta mediante un procedimiento ELISA. El

símbolo (◆) indica anticuerpo N° 1A1, el símbolo (■) indica anticuerpo N° 3A1, el símbolo (A) indica anticuerpo N° 8A1, el símbolo (X) indica anticuerpo N° 24A1, el símbolo (·) indica anticuerpo N° 32A1, el símbolo (·) indica anticuerpo N° 32A1, el símbolo (+) indica anticuerpo N° 39A1, el símbolo (-) indica anticuerpo N° 40A1, el símbolo (-) indica anticuerpo N° 41B1, el símbolo (O) indica anticuerpo N° 61A1, y el símbolo (□) indica IgG de control.

[Fig. 25]

La Fig. 25 muestra los resultados de ensayar el efecto de la adición de un anticuerpo monoclonal de Siglec-15 anti-ratón (N° 3A1, N° 8A1, o N° 32A1) en la diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de células no adherentes de médula ósea de ratón. La IgG de control de rata en la figura es un control negativo común en las figuras Figs. 25 y 26.

[Fig. 26]

La Fig. 26 muestra los resultados de ensayar el efecto de la adición de un anticuerpo monoclonal de Siglec-15 anti-ratón (N° 34A1, N° 39A1, o N° 40A1) en la diferenciación de osteoclastos (estimulación con RANKL) de células no adherentes de médula ósea de ratón. El anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-ratón N° 3 en la figura es un control positivo para las Figs. 25 y 26.

[Fig. 27]

La Fig. 27 muestra gráficas que ilustran un cambio en la expresión de catepsina K, TRAP o el gen Siglec-15 cuando se indujo la diferenciación de osteoclastos a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales.

[Fig. 28]

La Fig. 28 muestra los resultados de examinar la pureza del Siglec-15-His humano purificado por cromatografía en columna de HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida.

[Fig. 29]

La Fig. 29 muestra los resultados de examinar la pureza de Siglec-15-Fc humana purificada mediante cromatografía en columna de proteína A mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida.

[Fig. 30]

La Fig. 30 muestra cromatogramas de anticuerpos policlonales de Siglec-15 anti-humano purificados usando una columna de afinidad que tenía Siglec-15-Fc inmovilizado sobre ésta.

[Fig. 31]

La Fig. 31 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-humano.

[Fig. 32]

La Fig. 32 muestra los resultados de evaluar el efecto de la adición de un anticuerpo policlonal de Siglec-15 anti-humano a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales contando el número de células positivas a TRAP que tenían 5 o más núcleos con un microscopio invertido.

[Fig. 33]

La Fig. 33 muestra los resultados de ensayar la unión de un anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón a una placa que tiene Siglec-15-Fc humano inmovilizado sobre esta mediante un procedimiento ELISA. El símbolo (◆) indica anticuerpo N° 1A1, el símbolo (■) indica anticuerpo N° 3A1, el símbolo (A) indica anticuerpo N° 8A1, el símbolo (X) indica anticuerpo N° 24A1, el símbolo (·) indica anticuerpo N° 32A1, el símbolo (OO) indica anticuerpo N° 34A1, el símbolo (+) indica anticuerpo N° 39A1, el símbolo (-) indica anticuerpo N° 40A1, el símbolo (-) indica anticuerpo N° 41B1, el símbolo (O) indica anticuerpo N° 61A1, y el símbolo (□) indica IgG de control.

[Fig. 34]

La Fig. 34 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo monoclonal de Siglec-15 de rata anti-ratón.

[Fig. 35]

La Fig. 35 muestra fotomicrografías que ilustran, mediante tinción de TRAP, la inhibición de formación de osteoclastos gigantes a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo monoclonal de Siglec-15 de rata anti-ratón (anticuerpo N° 32A1).

[Fig. 36]

La Fig. 36 muestra una gráfica que ilustra la inhibición de la actividad de resorción ósea de osteoclastos humanos normales mediante la adición de un anticuerpo monoclonal de Siglec-15 de rata anti-ratón (anticuerpo N° 32A1) (N = 6).

[Mejor modo de realización de la invención]

El término "gen", tal como se usa en el presente documento incluye no solo ADN, sino también ARNm, ADNc y ARNc.

El término "polinucleótido", tal como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que un ácido nucleico y también incluye ADN, RNA, sondas, oligonucleótidos y cebadores.

Los términos "polipéptidos" y "proteína", tal como se usan en el presente documento se usan sin distinción.

La expresión "fracción de ARN", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una fracción que contiene ARN.

El término "célula", tal como se usa en el presente documento, también incluye células en un animal individual y células cultivadas.

- 5 El término "Siglec-15", tal como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que proteína de Siglec-15.

La expresión "formación de osteoclastos", tal como se usa en el presente documento, se usa con el mismo significado que "diferenciación de osteoclastos" o "maduración de osteoclastos".

- 10 La expresión "fragmento funcional de un anticuerpo", tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento parcial de un anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno e incluye Fab, F(ab')₂, scFv y similares. La expresión también abarca Fab', que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras. Sin embargo, la expresión no está limitada a estas moléculas siempre que el fragmento tenga una afinidad de unión por un antígeno. Además, estos fragmentos funcionales incluyen no solo un fragmento obtenido tratando una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima adecuada, sino también una proteína producida en una célula hospedadora adecuada usando un gen de anticuerpo genéticamente modificado.

- 20 El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido parcial de Siglec-15 al que se une un anticuerpo anti-Siglec-15 específico. El epítipo anteriormente mencionado que es un péptido parcial de Siglec-15 puede determinarse mediante procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica, tales como inmunoensayo. Como alternativa, por ejemplo, puede emplearse el siguiente procedimiento. Se producen varias estructuras parciales de Siglec-15. En la producción de las estructuras parciales, puede usarse una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida. Por ejemplo, se produce una serie de polipéptidos que tienen longitudes adecuadamente reducidas obtenidas acortando secuencialmente Siglec-15 del extremo C o del extremo N usando una técnica de recombinación genética conocida para los expertos en la materia. A continuación, la reactividad de un anticuerpo contra estos polipéptidos se examina y se determina en líneas generales un sitio de reconocimiento. Después, se sintetizan péptidos que tienen longitudes más cortas y se examina la reactividad con estos péptidos, mediante lo que puede determinarse el epítipo. Si un segundo anticuerpo anti-Siglec-15 se une a un péptido parcial al que se une un primer anticuerpo anti-Siglec-15, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo comparten el mismo epítipo. Además, al confirmar que el segundo anticuerpo anti-Siglec-15 compete con el primer anticuerpo anti-Siglec-15 por la unión a Siglec-15 (es decir, el segundo anticuerpo inhibe la unión entre Siglec-15 y el primer anticuerpo), puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo comparten el mismo epítipo incluso si no se ha determinado la secuencia del epítipo específico. Además, cuando el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo y también el primer anticuerpo tiene un efecto especial, tal como una actividad neutralizante de antígeno, se puede esperar que el anticuerpo tenga la misma actividad.

- 40 La expresión "la hibridación se efectúa en condiciones rigurosas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a que se efectúa la hibridación en condiciones en las que puede efectuarse la identificación efectuando hibridación a 68 °C en una solución de hibridación comercialmente disponible, solución de hibridación ExpressHyb (fabricada por Clontech, Inc.) o efectuando la hibridación a 68 °C en presencia de NaCl de 0,7 a 1,0 M usando un filtro que tiene ADN inmovilizado en este, seguido de efectuar el lavado a 68 °C usando solución SSC de 0,1 a 2 x (solución SSC 1 x está compuesta de NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a estas.

1. Siglec-15

- 45 Los presentes inventores descubrieron que el gen de Siglec-15 se expresa específicamente en tumores de células gigantes y también descubrieron que el nivel de expresión del gen de Siglec-15 aumenta cuando una línea celular derivada de monocitos se diferencia en osteoclastos.

- 50 Para usar Siglec-15 en la invención, se purifica Siglec-15 directamente a partir de monocitos o células de célula ósea de ser humano, mamífero no humano (tal como de cobaya, rata, ratón, conejo, cerdo, oveja, ganado o mono) o pollo y se usan, o se prepara una fracción de membrana celular de las células anteriormente mencionadas y pueda usarse. Además, puede obtenerse Siglec-15 mediante síntesis *in vitro* del mismo o producción del mismo en una célula hospedadora mediante ingeniería genética. En la ingeniería genética, específicamente, se integra ADNc de Siglec-15 en un vector capaz de expresar ADNc de Siglec-15, y se sintetiza Siglec-15 en una solución que contiene enzimas, sustratos, y sustancias energéticas necesarias para la transcripción y traducción, o se transforma otra célula hospedadora procarionota o eucariota para expresar Siglec-15, mediante lo que puede obtenerse la proteína.

- 55 La secuencia de nucleótidos de ADNc de Siglec-15 humano se ha registrado en GenBank con el número de registro NM_213602 y se representa por SEQ ID NO: 1 en el Listado de secuencias, y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias. La secuencia de nucleótidos de ADNc de Siglec-15 de ratón se ha registrado en GenBank con el número de registro XM_884636 y se representa por SEQ ID NO: 3 en el

Listado de secuencias, y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias. La Siglec-15 humana madura de la que se ha eliminado la secuencia de señal corresponde a una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 21 a 328 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2. Además, la Siglec-15 de ratón de la que se ha eliminado la secuencia de señal corresponde a una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 21 a 341 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4. Incidentalmente, Siglec-15 se denomina en ocasiones antígeno 3 similar a CD33, molécula 3 similar a CD33, similar a CD33 o CD33L3, y todos estos representan la misma molécula.

El ADNc de Siglec-15 puede obtenerse, por ejemplo, mediante un procedimiento denominado PCR en el que se efectúa una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo citada como "PCR") usando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc de Siglec-15 como patrón y cebadores que amplifican específicamente ADNc de Siglec-15 (Saiki, R. K., y col., Science, (1988) 239, 487-49).

Además, también se incluye un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido compuesto de una secuencia de nucleótidos complementaria a al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias de nucleótido representada por las SEQ ID NO: 1 y 3 en el listado de secuencias en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene una actividad biológica comparable a la de Siglec-15 en el ADNc de Siglec-15. Además, también se incluye un polinucleótido que es una variante de corte y empalme del locus de Siglec-15 humana o de ratón o un polinucleótido que hibrida con esta en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene una actividad biológica comparable a la de Siglec-15 en el ADNc de Siglec-15.

Además, también se incluye en Siglec-15 una proteína que está compuesta de una secuencia de aminoácidos que incluye sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos en al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 2 y 4 en el listado de secuencias o la secuencia de aminoácidos en la que se ha eliminado la secuencia de señal y tiene una actividad biológica comparable a la de Siglec-15. Además, también se incluye en Siglec-15 una proteína que está compuesta de una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de corte y empalme transcrita a partir del locus de Siglec-15 de ser humano o una secuencia de aminoácidos que incluye sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos en esta y tiene una actividad biológica comparable a la de Siglec-15.

2. Detección de metabolismo óseo anormal

Un análisis del nivel de expresión del gen de Siglec-15 en un grupo de muestras de ensayo de varios tejidos óseos humanos demostró que el nivel de expresión del gen aumenta significativamente en tumor de células gigantes (TCG) que es un tumor óseo que surge con un gran número de células gigantes multinucleadas similares a osteoclastos y está caracterizado por hallazgos clínicos de destrucción ósea osteolítica (Bullough y col., Atlas of Orthopedic Pathology 2ª edición, págs. 17.6-17.8; Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)).

También se descubrió que el nivel de expresión del gen Siglec-15 aumenta cuando se diferencia una línea celular derivada de monocitos en osteoclastos.

Por consiguiente, se considera que Siglec-15 está asociado con la patología humana tal como TCG en el que aumenta la resorción ósea. En otras palabras, la medida del nivel de expresión del gen de Siglec-15 y/o Siglec-15 en cada célula y/o cada tejido permite la determinación del estado de metabolismo óseo anormal acompañado por la sobreexpresión de Siglec-15. Los ejemplos del metabolismo óseo anormal, tal como se usa en el presente documento, incluyen, pero sin limitación, osteoporosis (osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debida al uso de un agente terapéutico, tal como un esteroide o un inmunosupresor, u osteoporosis acompañada de artritis reumatoide), destrucción ósea acompañada de artritis reumatoide, hipercalcemia cancerosa, destrucción ósea que acompaña a mieloma múltiple o metástasis del cáncer al hueso, tumor de células gigantes, pérdida de hueso debida a la periodontitis, osteólisis alrededor de una articulación protésica, destrucción ósea en osteomielitis crónica, enfermedad ósea de Paget, osteodistrofia renal y osteogénesis imperfecta.

La "muestra de ensayo" usada para examinar el nivel de expresión del gen de Siglec-15 y/o Siglec-15 se refiere a una muestra de un tejido de médula ósea, hueso, próstata, testículo, pene, vejiga, riñón, cavidad oral, faringe, labios, lengua, encías, nasofaringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, hígado, vesícula biliar, páncreas, nariz, pulmón, tejido blando, piel, mama, útero, ovario, cerebro, tiroides, nódulo linfático, músculo, tejido adiposo o similar, o sangre, un fluido corporal o una excreción o similares, sin embargo, se prefiere sangre o médula ósea.

3. Procedimiento para explorar sustancias que inhiben la diferenciación en osteoclastos

Sirve como ejemplo un procedimiento para explorar una sustancia que inhibe la diferenciación en osteoclastos que mide el nivel de expresión del gen Siglec-15 y/o Siglec-15.

Sirve como ejemplo un procedimiento para explorar una sustancia que tiene un efecto terapéutico y/o un efecto preventivo en el metabolismo óseo anormal identificando una sustancia que inhibe la actividad de Siglec-15 de inducir la diferenciación en osteoclastos maduros.

La "sustancia de ensayo" se refiere a una sustancia para su uso en el examen de la actividad de inhibición de la diferenciación en osteoclastos mediante el procedimiento de exploración descrito en el presente documento. Los ejemplos de la sustancia de ensayo incluyen un compuesto, un metabolito microbiano, un extracto de un tejido vegetal o animal, un derivado de los mismos, y una mezcla de los mismos. Además, también puede usarse un ácido nucleico diseñado para disminuir el nivel de expresión de Siglec-15 o un derivado del mismo (tal como un oligonucleótido antisentido, una ribozima, ARNbc o ARNpi) como sustancia de ensayo. Puede ajustarse la dosis o concentración de la sustancia de ensayo de manera adecuada o puede ajustarse una pluralidad de dosis, por ejemplo, preparando diluciones en serie de la misma. La sustancia de ensayo puede administrarse en un estado adecuado, tal como un sólido o un líquido, y puede disolverse en un tampón adecuado o puede añadirse un estabilizante o similares a esta. En el caso de un procedimiento de exploración usando células cultivadas, la sustancia de ensayo se añade a un medio y las células pueden cultivarse en este. En el caso donde se añade una sustancia de ensayo a un medio, la sustancia de ensayo puede añadirse al inicio del cultivo en el medio de cultivo, y el número de operaciones de adición no está limitado a una. El periodo de cultivo en presencia de una sustancia de ensayo puede ajustarse de manera adecuada, sin embargo, es preferible de 30 minutos a 2 semanas, más preferentemente de 30 minutos a 72 horas. En el caso donde la sustancia de ensayo se administra a un individuo mamífero, la ruta de administración, incluyendo administración oral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, administración transdérmica, inyección subcutánea y similares, se determina de manera adecuada dependiendo de las propiedades físicas y características similares de la sustancia de ensayo. Incidentalmente, un tiempo adecuado hasta que se obtiene la sustancia de ensayo, después de la administración de la sustancia de ensayo, puede seleccionarse.

Las células cultivadas para ser usadas en el procedimiento de exploración descrito en el presente documento pueden ser células normales, una línea celular establecida, o células que muestran crecimiento anormal, tales como células de cáncer siempre que sean células de mamífero que expresan Siglec-15. Los ejemplos de las mismas incluyen, pero sin limitación, células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, disponibles a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. 2T-110), células RAW 264.7 derivadas de monocitos de ratón (N° de Cat de la ATCC TIB-71), células RAW 264 (N° de Cat de la ECACC 85062803), y células cultivadas primarias derivadas de médula ósea de ratón. Como especie animal de las células cultivadas, se prefieren de ser humano, ratón, u otros mamíferos (cobaya, rata, conejo, cerdo, oveja, ganado, mono, etc.), pollo y similares, pero la especie no está limitada a estas. Incidentalmente, como células cultivadas, se prefiere usar células de mamífero que sobreexpresan Siglec-15, y por ejemplo, células RAW 264.7, células RAW 264, células 293, células CHO y células COS7 modificadas introduciendo el gen de Siglec-15 junto con la región promotora del mismo para sobreexpresar Siglec-15, y similares pueden ejemplificarse.

El procedimiento de exploración descrito en el presente documento también incluye un procedimiento para detectar la expresión del gen Siglec-15 en células de un órgano o un tejido reseccionado de un individuo mamífero después de administrar una sustancia de ensayo al individuo mamífero sin usar células cultivadas. El órgano o tejido a usar para detectar la expresión del gen puede ser cualquiera siempre que exprese Siglec-15, sin embargo, se prefiere un tejido asociado con el metabolismo óseo anormal, y se prefiere más un tejido óseo y médula ósea. Como especie de mamífero, puede usarse un mamífero no humano, y se prefiere de ratón, rata o hámster, y se prefiere más de ratón o rata. Como modelo animal que tiene metabolismo óseo anormal puede usarse un animal que tiene el ovario extirpado, un animal que tiene el testículo extirpado, un animal portador de cáncer que tiene células tumorales implantadas bajo la piel, en la piel, en el ventrículo izquierdo, en la médula ósea, en una vena, en la cavidad abdominal o similares, un animal que tiene un nervio ciático extirpado, un modelo animal de artritis por adyuvante, un modelo animal de artritis inducida por colágeno, un modelo animal de osteoporosis inducida por glucocorticoides, un ratón con senescencia acelerada (ratón SAM P6, Matsushita y col., Am. J. Pathol. 125, 276-283 (1986)), un animal que tiene extirpada la tiroides/paratiroides, un animal que recibe una infusión continua de un péptido relacionado con hormona paratiroidea (PTHrP), un ratón *knockout* para factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) (Mizuno y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998) 247, 610-615), un animal con la administración de RANKL soluble o similares. Además, también puede usarse un modelo animal con pérdida de piezas dentales debido a enfermedad periodontal o un animal modificado para sobreexpresar Siglec-15. Además, se administra una sustancia de ensayo seleccionada mediante exploración a cualquiera de los modelos animales anteriormente mencionados, y se mide cada parámetro que puede obtenerse mediante la medición del número de osteoclastos maduros en un tejido óseo, una densidad ósea, una fuerza ósea o una morfología ósea, parámetros del metabolismo óseo (CTx, NTx, etc.) en sangre y orina o parámetros que varían debido al metabolismo óseo anormal, tal como niveles de calcio en sangre, mediante los cuales puede evaluarse el efecto terapéutico y/o el efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal.

Las células cultivadas para su uso en el procedimiento tal como se describe en el presente documento pueden cultivarse en cualquier condición siempre que las condiciones permitan que las células cultivadas expresen Siglec-15 son la adición de una sustancia de ensayo. Por ejemplo, hay condiciones de cultivo conocidas para las células cultivadas, y cuando las células expresan Siglec-15 en las condiciones, las células pueden cultivarse en las condiciones. Además, en el caso donde se detecta la expresión de Siglec-15 en un órgano o tejido reseccionado de un individuo mamífero, las condiciones de cría para el animal pueden ser cualquiera siempre que las condiciones permitan que el animal exprese Siglec-15 sin la adición de una sustancia de ensayo.

Para examinar el efecto de una sustancia de ensayo en la expresión de Siglec-15, existen procedimientos para

medir el nivel de expresión del gen de Siglec-15 y un procedimiento para medir el nivel de expresión de Siglec-15 que es un producto de traducción del gen de Siglec-15. Se considera que una sustancia de ensayo que inhiba la expresión del gen de Siglec-15 y/o de Siglec-15 es una sustancia que tiene un efecto terapéutico y/o un efecto preventivo en el metabolismo óseo anormal, preferentemente osteoporosis, o destrucción ósea que acompaña a artritis reumatoide y/o metástasis del cáncer al hueso.

La medida del nivel de expresión del gen Siglec-15 o de Siglec-15 en células cultivadas puede efectuarse mediante un análisis de Northern, un procedimiento de PCR cuantitativa, un procedimiento de ELISA o similares. En el caso donde se usan células de mamífero cultivadas, se añade una cantidad adecuada de RANKL, TNF- α , M-CSF, la vitamina D₃ activa, o similares, según sea necesario, a un medio junto con una sustancia de ensayo, y también en un control sin la adición de la sustancia de ensayo, se añade una cantidad adecuada de RANKL, TNF- α , M-CSF, la vitamina D₃ activa, o similares. Además, se construye un sistema experimental para medir la cantidad de unión de un ligando endógeno a Siglec-15, y se evalúa si la unión del ligando endógeno a Siglec-15 se inhibe o no mediante la adición de una sustancia de ensayo, por lo que se efectúa la exploración de una sustancia que inhibe la diferenciación en osteoclastos.

Los respectivos procedimientos de exploración se describirán en los siguientes (1) a (3).

(1) Procedimiento usando gen de Siglec-15.

Como procedimiento de exploración, por ejemplo, existe un procedimiento que usa células de mamífero cultivadas y un procedimiento que usa individuos mamíferos, que se describirá más adelante. respectivamente.

(a) Procedimiento que usa células de mamífero cultivadas

(i) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

- a) una etapa de extracción de ARN total de células de mamífero cultivadas en un medio con la adición de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de detectar una diferencia en el nivel de expresión del gen de Siglec-15 entre el ARN total obtenido en a) y el ARN total obtenido de células cultivadas de mamífero cultivadas sin la adición de la sustancia de ensayo; y
- c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando la diferencia en el nivel de expresión del gen descrito en b).

(ii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a d):

- a) una etapa de extracción de ARN total de células de mamífero cultivadas en un medio con la adición de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de extracción de ARN total de células de mamífero cultivadas en un medio sin la adición de la sustancia de ensayo;
- c) una etapa de medir el nivel de expresión del gen Siglec-15 en el ARN total obtenido en a) y se obtiene el ARN total obtenido en b). respectivamente, y
- d) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia en el nivel de expresión del gen medido en c) entre el ARN total obtenido en a) y el ARN total obtenido en b).

(b) Procedimiento que usa individuos mamíferos

(i) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas (a) a (c):

- a) una etapa de extracción de ARN total de una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero con la administración de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de detectar una diferencia en el nivel de expresión del gen de Siglec-15 entre el ARN total obtenido en a) y el ARN total obtenido de una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero sin la administración de una sustancia de ensayo; y
- c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando la diferencia en el nivel de expresión del gen descrito en b).

(ii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a d):

- a) una etapa de extracción de ARN total de una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero con la administración de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de extracción de ARN total de una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero sin la administración de la sustancia de ensayo;
- c) una etapa de medir el nivel de expresión del gen Siglec-15 en el ARN total obtenido en la etapa a) y se obtiene el ARN total obtenido en la etapa b), respectivamente, y
- d) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el

metabolismo óseo anormal analizando una diferencia en el nivel de expresión del gen descrito en c).

(2) Procedimiento usando Siglec-15.

Al igual que el procedimiento utilizando la medición del nivel de expresión de Siglec-15, existe un procedimiento usando células cultivadas de mamífero y un procedimiento que usa individuos mamíferos, cada uno de los cuales incluye las siguientes etapas:

(a) Procedimiento que usa células de mamífero cultivadas

(i) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) y b):

- a) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en células de mamífero cultivadas en un medio con la adición de una sustancia de ensayo; y
- b) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de la proteína medido en a) y el nivel de expresión de la proteína en células de mamífero cultivadas en un medio sin la adición de la sustancia de ensayo.

(ii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

- a) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en células de mamífero cultivadas en un medio con la adición de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de medir el nivel de expresión de la proteína descrita en a) en células de mamífero cultivadas en un medio sin la adición de la sustancia de ensayo; y
- c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal*** detectando una diferencia entre el nivel de expresión de la proteína medido en a) y el nivel de expresión de la proteína medido en b).

(iii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

- a) una etapa de inmovilización de proteína total obtenida de células de mamífero cultivadas en un medio con la adición de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en la proteína inmovilizada; y
- c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de Siglec-15 detectada en b) y el nivel de expresión de la proteína en la proteína total obtenida de células de mamífero cultivadas en un medio sin la adición de la sustancia de ensayo.

(iv) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a e):

- a) una etapa de inmovilización de proteína total obtenida de células de mamífero cultivadas en un medio con la adición de una sustancia de ensayo;
- b) una etapa de inmovilización de proteína total obtenida de células de mamífero cultivadas en un medio sin la adición de la sustancia de ensayo;
- c) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en la proteína inmovilizada descrito en la etapa a) usando un anticuerpo o un ligando que se une específicamente a la proteína;
- d) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en la proteína inmovilizada descrito en la etapa b) usando un anticuerpo o un ligando que se une específicamente a la proteína; y
- e) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de la proteína medido en la etapa c) y el nivel de expresión de la proteína medido en la etapa d).

(b) Procedimiento que usa individuos mamíferos

(i) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) y b):

- a) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero al que se le ha administrado una sustancia de ensayo; y
- b) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o el efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de Siglec-15 medido en la etapa a) y el nivel de expresión de la proteína en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero sin la administración de la sustancia de ensayo.

(ii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

- a) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero al que se le ha administrado una sustancia de ensayo, usando un anticuerpo o un

ligando que se une específicamente a la proteína;

b) una etapa de medir el nivel de expresión de la proteína en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero sin la administración de la sustancia de ensayo; y

5 c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de Siglec-15 medido en a) y el nivel de expresión de la proteína medido en b).

(iii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

a) una etapa de inmovilizar la proteína total en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero al que se le ha administrado una sustancia de ensayo;

10 b) una etapa de medir el nivel de expresión de Siglec-15 en la proteína inmovilizada; y

c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de Siglec-15 detectado en b) y el nivel de expresión de la proteína en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero sin la administración de la sustancia de ensayo.

15 (iv) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a e):

a) una etapa de inmovilizar la proteína total en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero al que se le ha administrado una sustancia de ensayo;

20 b) una etapa de inmovilización de proteína total en una muestra de ensayo recogida de un individuo mamífero sin la administración de la sustancia de ensayo;

c) una etapa de detectar el nivel de expresión de Siglec-15 en la proteína inmovilizada descrito en la etapa a) usando un anticuerpo o un ligando que se une específicamente a la proteína;

d) una etapa de detectar el nivel de expresión de Siglec-15 en la proteína inmovilizada descrito en b) usando un anticuerpo o un ligando que se une específicamente a la proteína; y

25 e) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o efecto preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal analizando una diferencia entre el nivel de expresión de la proteína detectado en c) y el nivel de expresión de la proteína detectado en d).

(3) Procedimiento de exploración usando ligando endógeno

También puede efectuarse la exploración de una sustancia que inhibe la diferenciación en osteoclastos observando si se inhibe o no la unión de un ligando endógeno a Siglec-15 mediante la adición de una sustancia de ensayo. Los ejemplos de un glucano sialilado que sirve como ligando endógeno para Siglec-15 incluyen la unión de Neu5Ac α 2-6GalNAc a Siglec-15 de ser humano y de ratón y la unión de Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc a Siglec-15 de ratón. Sin embargo, el ligando endógeno para Siglec-15 no está limitado a estos glicanos, siempre que tenga una afinidad de unión a Siglec-15. Estos ligandos endógenos pueden marcarse con un marcador adecuado, un radioisótopo o una sustancia fluorescente con el fin de examinar la unión del mismo a Siglec-15. Por ejemplo, puede usarse poliacrilamida biotilada a la que se le ha unido un oligosacárido sialilado, tal como Neu5Ac α 2-6GalNAc, en la exploración como sonda que se une a Siglec-15. Como Siglec-15 al que se une un ligando endógeno, pueden usarse células que expresan Siglec-15 o una fracción de membrana preparada a partir de las células. Además, Siglec-15 puede someterse a exploración después de que se haya aislado Siglec-15 de células que expresan Siglec-15, seguido de purificación. Como células que expresan Siglec-15, puede usarse cualquier línea celular cultivada que expresa Siglec-15, células a las que se hace expresar transitoria o constantemente el gen de Siglec-15 sometiendo a las células cultivadas adecuadas a modificación por ingeniería genética, y células que expresan Siglec-15 obtenido *in vivo*. El procedimiento de exploración usando dicho ligando endógeno puede llevarse a cabo de acuerdo con las etapas tal como se describen a continuación.

(i) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) y b):

45 a) una etapa de añadir un ligando endógeno para Siglec-15 y una sustancia de ensayo a células que expresan Siglec-15; y

b) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal comparando la cantidad de unión del ligando endógeno a las células que expresan Siglec-15 entre el caso donde se añadió la sustancia de ensayo y el caso donde no se añadió la sustancia de ensayo.

50 (ii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

a) una etapa de preparar una fracción de membrana celular de células que expresan Siglec-15;

b) una etapa de añadir un ligando endógeno para Siglec-15 y una sustancia de ensayo a la fracción de membrana celular; y

55 c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal comparando la cantidad de unión del ligando endógeno a la fracción de membrana celular entre el caso donde se añadió la sustancia de ensayo y el caso donde no se añadió la sustancia de ensayo.

(iii) Un procedimiento que incluye las siguientes etapas a) a c):

- a) una etapa de preparar Siglec-15;
 b) una etapa de añadir un ligando endógeno para Siglec-15 y una sustancia de ensayo para Siglec-15 en a);
 y
 c) una etapa de determinar el efecto terapéutico y/o preventivo de la sustancia de ensayo en el metabolismo óseo anormal comparando la cantidad de unión del ligando endógeno a Siglec-15 entre el caso donde se añadió la sustancia de ensayo y el caso donde no se añadió la sustancia de ensayo.

En el caso donde se hace que las células adecuadas expresan Siglec-15 mediante ingeniería genética y la Siglec-15 resultante se purifica y somete a exploración, la Siglec-15 a explorar puede seleccionarse entre polipéptidos compuestos de las secuencias de aminoácidos mostradas en las siguientes (a) a (i):

- (a) una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (b) una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 21 a 328 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (c) una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 1 a 260 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (d) una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 21 a 260 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (e) una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
 (f) una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 21 a 341 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
 (g) una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 1 a 258 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
 (h) una secuencia de aminoácidos compuesta de los restos de aminoácidos 21 a 258 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias; y
 (i) una secuencia de aminoácidos que incluye sustitución, delección o adición de uno o varios restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita en (a) a (h).

La Siglec-15 a explorar también puede seleccionarse de polipéptidos compuestos de secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos mostradas en los siguientes (j) a (n):

- (j) una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1;
 (k) una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 3;
 (l) una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19;
 (m) una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 43; y
 (n) una secuencia de un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido compuesto de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (j) a (m) en condiciones rigurosas.

Además, también es posible usar un polipéptido obtenido mediante el acoplamiento de un marcador adecuado a cualquiera de estos polipéptidos, o un polipéptido fusionado con una proteína soluble diferente, como una diana para exploración. Incidentalmente, el polipéptido compuesto de los restos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias corresponde con el péptido de señal de Siglec-15 humana, y el polipéptido compuesto de los restos de aminoácidos 21 a 260 del mismo se corresponden con el dominio extracelular de la proteína madura de Siglec-15 humana. Además, el polipéptido compuesto de los restos de aminoácidos 1 a 20 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias corresponde con el péptido de señal de Siglec-15 de ratón, y el polipéptido compuesto de los restos de aminoácidos 21 a 258 del mismo se corresponden con el dominio extracelular de la proteína madura de Siglec-15 de ratón. Además, la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 43 codifica el dominio extracelular de Siglec-15 humana codificado por la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 codifica el dominio extracelular de Siglec-15 de ratón codificado por la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 3.

Las sustancias candidatas para una sustancia que inhibe la diferenciación en osteoclastos seleccionados mediante cualquiera de los procedimientos de exploración (1) a (3) pueden evaluarse de manera secundaria usando la inhibición de la actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) en forma de un índice, tal como se muestra en los Ejemplos 17, 19 y 20. Además, la evaluación secundaria del mismo también puede efectuarse usando la inhibición de la formación de osteoclastos multinucleados positivos a TRAP, es decir, la inhibición de la fusión celular de osteoclastos en forma de un índice se muestra en los Ejemplos 19, 21, 22 y 35.

(4) Otros procedimientos

La tasa de incidencia de metabolismo óseo anormal a lo largo del tiempo, el grado de metabolismo óseo anormal, y/o la tasa de supervivencia, etc. se determinan para el caso donde una sustancia de ensayo se administró a un individuo mamífero al que se le hace sobreexpresar Siglec-15 y el caso donde la sustancia de ensayo no se administró a esto. En los casos donde en el mamífero con la administración de la sustancia de ensayo la tasa de incidencia de metabolismo óseo anormal disminuye significativamente, el grado de metabolismo óseo anormal es

significativamente más bajo, y/o la tasa de supervivencia aumenta en aproximadamente un 10 % o más, preferentemente aproximadamente un 30 % o más, más preferentemente aproximadamente un 50 % o más, la sustancia de ensayo puede seleccionarse como un compuesto que tiene un efecto terapéutico y/o preventivo en el metabolismo óseo anormal.

5 4. Producción de anticuerpo anti-Siglec-15

El anticuerpo contra Siglec-15 puede obtenerse inmunizando un animal con Siglec-15 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de Siglec-15, y recogiendo y purificando el anticuerpo producido *in vivo* de acuerdo con un procedimiento convencional. Las especies biológicas de Siglec-15 a emplear como antígeno no están limitadas a humano, y un animal puede inmunizarse con Siglec-15 derivado de un animal distinto de un ser humano, tal como un ratón o rata. En este caso, al examinar la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une a los Siglec-15 heterólogo y Siglec-15 humano obtenidos, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a una enfermedad en el ser humano.

Además, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal fusionando células productoras de anticuerpo que producen un anticuerpo frente a Siglec-15 con células de mieloma para establecer un hibridoma, de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, (1975) 256, págs. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibody*, págs. 365-367; Prentiss Press, N.Y. (1980)).

El Siglec-15 para su uso como antígeno puede obtenerse mediante ingeniería genética para hacer que la célula hospedadora exprese el gen de Siglec-15.

Específicamente, la ingeniería genética puede llevarse a cabo del modo siguiente. Se produce un vector capaz de expresar el gen de Siglec-15, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y, después, se purifica la Siglec-15 expresada. A continuación, se describirá específicamente un procedimiento para obtener un anticuerpo contra Siglec-15.

(1) Preparación del antígeno

Los ejemplos del antígeno a usar para producir el anticuerpo anti-Siglec-15 incluyen Siglec-15, un polipéptido compuesto de una secuencia parcial de aminoácidos que consiste en al menos 6 restos de aminoácidos consecutivos de Siglec-15, y un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos dada o transportador al mismo. Además, en la sección "3. Procedimiento para explorar sustancias que inhiben la diferenciación en osteoclastos", la Siglec-15 ejemplificada como diana para exploración también puede ejemplificarse como antígeno a usar para producir el anticuerpo anti-Siglec-15.

Siglec-15 puede usarse después de purificarla directamente de tejidos tumorales humanos o células tumorales. Además, puede obtenerse Siglec-15 sintetizándola *in vitro* o haciendo que una célula hospedadora lo produzca por ingeniería genética.

En la ingeniería genética, específicamente, el ADNc de Siglec-15 se integra en un vector capaz de expresar ADNc de Siglec-15 y se sintetiza Siglec-15 en una solución que contiene enzimas, sustratos, y sustancias energéticas necesarias para la transcripción y traducción, o se transforma otra célula hospedadora procarionota o eucariota para expresar Siglec-15, mediante lo que puede obtenerse el antígeno.

Además, también puede obtenerse el antígeno como una proteína secretada mediante la expresión de una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de Siglec-15, que es una proteína de membrana, a la región constante del anticuerpo en un sistema de hospedador-vector adecuado.

El ADNc de Siglec-15 puede obtenerse, por ejemplo, mediante un procedimiento denominado PCR en el que se efectúa una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo citada como "PCR") usando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc de Siglec-15 como patrón y cebadores que amplifican específicamente ADNc de Siglec-15 (véase Saiki, R. K., y col., *Science*, (1988) 239, págs. 487-489).

Como sistema de síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, puede ejemplificarse el sistema Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc., pero no está limitado a éste.

Los ejemplos del hospedador procarionota incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar la célula hospedadora con un gen diana, se transforma la célula hospedadora usando un vector plasmídico que contiene un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el hospedador, y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

Los ejemplos de la célula hospedadora eucariota incluyen células de vertebrado, células de insecto, y células de levadura. Como células cultivadas, por ejemplo, se usan frecuentemente cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, págs. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, págs. 175-182; ATCC CRL-1650), fibroblastos NIH3T3 murinos (ATCC N°: CLR-

1658), y células de ovario de cáncer chino (células CHO; ATCC: CCL-61) y similares, sin embargo, no están limitadas a estas.

El transformante obtenido de este modo puede cultivarse de acuerdo a un procedimiento común, y mediante el cultivo del transformante, se produce intracelular o extracelularmente un polipéptido diana.

- 5 Puede seleccionarse un medio a usar adecuado para el cultivo entre varios medios de cultivo usados de manera común dependiendo de la célula hospedadora empleada. Si se emplea *Escherichia coli*, puede usarse un medio LB suplementado con un antibiótico, tal como ampicilina o IPMG, si es necesario.

10 Puede separarse y purificarse una proteína recombinante producida intracelular o extracelularmente por el cultivo del transformante mediante cualquiera de varios procedimientos de separación conocidos que utilizan una propiedad física o química de la proteína.

Los ejemplos específicos de procedimientos incluyen tratamiento con un precipitante común de proteínas, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida, tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de las mismas.

- 15 Además, al unir seis restos de histidina a una proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse de manera eficaz con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, al unir la región Fc de IgG a una proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse de manera eficaz con una columna de proteína A.

20 Al combinar los procedimientos anteriormente mencionados, puede producirse fácilmente una gran cantidad de polipéptido diana con un alto rendimiento y una elevada pureza.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15

Los ejemplos del anticuerpo que se une específicamente a Siglec-15 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Siglec-15, y un procedimiento para obtener el anticuerpo es como se describe a continuación.

La producción de un anticuerpo monoclonal requiere generalmente de las siguientes etapas operativas:

- 25 (a) purificar un biopolímero a usar como antígeno;
 (b) preparar células productoras de anticuerpos inmunizando a un animal mediante inyección del antígeno, recogiendo la sangre, ensayando su titulación de anticuerpo y determinando cuando se debe reseccionar el bazo;
 30 (c) preparando células de mieloma (en lo sucesivo citado como "mieloma");
 (d) fusionar las células productoras de anticuerpo con el mieloma;
 (e) explorar un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo diana;
 (f) dividir los hibridomas en clones de una sola célula (clonación);
 (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar a un animal con el hibridoma implantado para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;
 35 (h) examinar la actividad biológica y la especificidad de unión del anticuerpo producido de este modo, o ensayar las mismas propiedades con un reactivo marcado; y similares.

A continuación, se describirá en detalle el procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal siguiendo las etapas anteriores, sin embargo, el procedimiento no está limitado a este, y, por ejemplo, pueden usarse células productoras de anticuerpo y mielomas distintos de células de bazo.

40 (a) Purificación de antígeno

Como antígeno, puede usarse Siglec-15 preparado mediante el procedimiento descrito anteriormente o un péptido parcial del mismo.

45 Además, también puede usarse como antígeno una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan Siglec-15 o las células recombinantes que expresan Siglec-15 en sí, y también un péptido parcial de la proteína sintetizada químicamente mediante un procedimiento conocido para los expertos en la materia.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpo

50 El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o con sulfato de potasio y aluminio, y la mezcla resultante se usa como inmunógeno para inmunizar a un animal experimental. Como animal experimental, puede usarse sin problema cualquier animal usado en un procedimiento de producción de hibridoma conocido. Específicamente, por ejemplo, ratón, rata, una cabra, oveja, ganado, caballo o similares pueden usarse. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de biodisponibilidad de células de mieloma para fusionarlas con las células productoras de anticuerpos extraídas, se usan

preferentemente ratones o ratas como animal a inmunizar.

Además, la raza de ratón o rata a usar no está particularmente limitada, y en el caso de ratones, por ejemplo, pueden usarse varias líneas, tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129, y en el caso de ratas pueden usarse, por ejemplo, Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Estos ratones y ratas están comercialmente disponibles a través de criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Entre estas, teniendo en consideración la compatibilidad de fusión con las células de mieloma descritas más adelante, se prefieren particularmente en el caso de ratones la raza BALB/c y en el caso de ratas, las líneas Wistar y Low.

Además, teniendo en consideración la homología antigénica entre seres humanos y ratones, también se prefiere usar un ratón que tenga una función biológica disminuida para eliminar autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

La edad del ratón o rata en el momento de la inmunización es preferentemente de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente de 6 a 8 semanas de edad.

Para inmunizar a un animal con Siglec-15 o un recombinante de la misma, por ejemplo, se describe en detalle un procedimiento conocido en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III.; Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), o similares.

Entre estos procedimientos de inmunización, un procedimiento específico citado es, por ejemplo, del siguiente modo.

Es decir, en primer lugar, se administra a un animal una fracción de proteína de membrana que sirve como antígeno o células a las que se hace expresar el antígeno por vía intradérmica o intraperitoneal.

Sin embargo, la combinación de ambas rutas de administración se prefiere para aumentar la eficacia de la inmunización, y cuando se efectúa administración intradérmica en la primera mitad y administración intraperitoneal en la última mitad o solo en la última dosificación, puede aumentarse particularmente la eficacia de la inmunización.

La pauta de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal a inmunizar, de diferencias individuales o similares. Sin embargo, en general, la frecuencia de administración del antígeno es preferentemente de 3 a 6 veces, más preferentemente de 3 a 4 veces, y el intervalo de dosificación es preferentemente de 2 a 6 semanas, más preferentemente de 2 a 4 semanas.

Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal a inmunizar, de diferencias individuales o similares. Sin embargo, la dosis se ajusta generalmente a de 0,05 a 5 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg.

Se efectúa una inmunización de refuerzo de 1 a 6 semanas, preferentemente de 2 a 4 semanas, más preferentemente de 2 a 3 semanas después de la administración del antígeno, tal como se ha descrito anteriormente.

La dosis del antígeno en el momento de efectuar la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño del animal, o similares, sin embargo, en el caso de un ratón, la dosis se ajusta generalmente a de 0,05 a 5 mg, preferentemente de 0,1 a 0,5 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg.

Se retiran de manera aséptica células del bazo o linfocitos que incluyen células productoras de anticuerpos del animal después de 1 a 10 días, preferentemente de 2 a 5 días, más preferentemente de 2 a 3 días después de la inmunización de refuerzo.

En ese momento, se mide el título de anticuerpo, y si se usa un animal que tiene un título de anticuerpo suficientemente elevado como fuente de células productoras de anticuerpo, el procedimiento posterior puede llevarse a cabo más eficazmente.

El procedimiento para medir el título de anticuerpo para su uso en el presente documento incluye, por ejemplo, un procedimiento RIA y un procedimiento ELISA, pero no está limitado a estos.

Por ejemplo, se emplea un procedimiento ELISA, puede llevarse a cabo la medida del título de anticuerpo de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación.

En primer lugar, se adsorbe un antígeno purificado o parcialmente purificado sobre la superficie de una fase sólida, tal como una placa de 96 pocillos para ELISA, y la superficie de la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno, tal como albúmina de suero bovina (en lo sucesivo citada

como "BSA"). Después de lavar la superficie, ésta se pone en contacto con una muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) como anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo contenido en la muestra se una al antígeno.

- 5 Además, como anticuerpo secundario, se añade un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón y se deja unir al anticuerpo de ratón. Después de lavar, se añade una sustancia para la enzima y se mide el cambio en la absorbancia que sucede debido al revelado del color inducido por la degradación del sustrato o similares para calcular el título de anticuerpo.

10 La separación de las células productoras de anticuerpo de las células del bazo o linfocitos puede llevarse a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y col., *Nature* (1975), 256, pág. 495; Kohler y col., *Eur. J. Immunol.* (1977), 6, pág. 511; Milstein y col., *Nature* (1977), 266, pág. 550; Walsh, *Nature* (1977), 266, p. 495).

Por ejemplo, en el caso de células de bazo, puede emplearse un procedimiento general en el que las células productoras de anticuerpo se separan homogenizando el bazo para obtener células mediante filtración con un tamiz de acero inoxidable y suspendiendo las células en medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

(c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo citadas como "mieloma")

- 15 Las células de mieloma a usar para la fusión celular no están particularmente limitadas y las células adecuadas pueden seleccionarse de líneas celulares conocidas. Sin embargo, teniendo en consideración la conveniencia cuando un hibridoma se selecciona de células fusionadas, se prefiere usar una cepa defectuosa en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se haya establecido.

20 Más específicamente, los ejemplos de cepa defectuosa en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63- Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), F0, S149/5XXO y BU.1 derivadas de ratones, 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivada de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500.GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) y 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de seres humanos.

Estas cepas defectuosas en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o similares.

- 25 Estas cepas celulares se subcultivan en un medio adecuado, tal como un medio de 8-azaguanina [un medio obtenido añadiendo 8-azaguanina a un medio RPMI-1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero de ternero fetal (en lo sucesivo citado como "STF")]; medio modificado de Dulbecco de Iscove (en lo sucesivo citado como "IMDM"), o medio Eagle modificado de Dulbecco (en lo sucesivo citado como "DMEM"). En este caso, de 3 a 4 días antes de efectuar la fusión celular, se subcultivan las células en un medio normal [por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contiene STF al 10 %] para obtener no menos de 30 2×10^7 células en el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

- 35 La fusión entre las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma se lleva a cabo de manera adecuada de acuerdo con un procedimiento conocido (Weis, D. M. *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., *Experimental Immunochimistry*, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), en condiciones tales que la tasa de supervivencia de las células no se reduce de manera excesiva.

40 Los ejemplos del procedimiento incluyen un procedimiento químico en el que las células productoras de anticuerpo se mezclan en una solución de polímero de alta concentración de polietilenglicol o similares, y un procedimiento físico usando estimulación eléctrica.

Entre estos procedimientos, un ejemplo específico del procedimiento químico es como se describe a continuación.

- 45 Es decir, en el caso donde se usa polietilenglicol para la solución de polímero de alta concentración, las células productoras de anticuerpo y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferentemente de 2000 a 4000 a una temperatura de 30 a 40 °C, preferentemente de 35 a 38 °C durante 1 a 10 minutos, preferentemente de 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

El procedimiento de selección de hibridomas obtenidos mediante la fusión celular anteriormente mencionada no está particularmente limitado. Normalmente, se usa un procedimiento de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler y col., *Nature* (1975), 256, pág. 495; Milstein y col., *Nature* (1977), 266, pág. 550).

- 50 Este procedimiento es eficaz cuando se obtienen los hibridomas usando las células de mieloma de una cepa defectuosa en HGPRT incapaz de sobrevivir en presencia de aminopterina.

Es decir, al cultivar células sin fusionar e hibridomas en un medio HAT, solo se deja sobrevivir y proliferar de manera

selectiva a los hibridomas resistentes a aminopterina.

(f) División en clon de una sola célula (clonación)

5 Como procedimiento de clonación para hibridomas, puede usarse un procedimiento conocido, tal como un procedimiento de metilcelulosa, un procedimiento de agarosa blanda, o un procedimiento de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos procedimientos, en concreto, se prefiere un procedimiento de dilución limitante.

En este procedimiento, se siembra una cepa celular de fibroblastos derivada de feto de rata o de células nodriza, tales como células de bazo de ratón normales, células glandulares del timo, o células de ascitis, en una microplaca.

10 Mientras tanto, se diluyen los hibridomas en un medio para dar una densidad de células de 0,2 a 0,5 células por cada 0,2 ml. Se pone una alícuota de 0,1 ml de la suspensión de hibridoma diluido en cada pocillo y se continúa cultivando durante aproximadamente 2 semanas mientras que se reemplaza aproximadamente 1/3 de la solución de cultivo con medio fresco a intervalos de tiempo predeterminados (por ejemplo, cada 3 días), mediante lo que pueden proliferarse los clones.

15 Los hibridomas en los pocillos para los que se ha confirmado el título del anticuerpo se someten, por ejemplo, a clonación mediante el procedimiento de dilución limitadamente repetidamente de 2 a 4 veces. Se selecciona un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpo estable como una cepa de hibridoma productora de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15.

20 Los ejemplos de cepa de hibridoma clonada de este modo incluyen el hibridoma N° 32A1 y el hibridoma N° 41B1. El hibridoma N° 32A1 y el hibridoma N° 41B1 se depositaron en el Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Depósito de Organismos de Patente del Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología) (localizado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 28 de agosto de 2008. Al hibridoma N° 32A1 se le ha asignado el número de depósito FERM BP-10999 con el nombre de hibridoma anti-Siglec-15 N° 32A1, y al hibridoma N° 41B1 se le ha asignado el número de depósito FERM BP-11000 con el nombre de hibridoma anti-Siglec-15 N° 41B1. En la presente descripción, el anticuerpo producido por el hibridoma N° 32A1 se representa como "anticuerpo N° 32A1" o simplemente como "N° 32A1", y el anticuerpo producido por el hibridoma N° 41B1 se representa como "anticuerpo N° 41B1" o simplemente como "N° 41B1". Además, los anticuerpos obtenidos en los Ejemplos de la presente descripción que forman el hibridoma N° 32A1 y el hibridoma N° 41B1 también se representan por los nombres de anticuerpos del mismo modo.

30 (g) Preparación de anticuerpo monoclonal cultivando hibridoma

Mediante el cultivo del hibridoma seleccionado de este modo, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal de manera eficiente. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere efectuar una exploración de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal diana.

En la exploración, puede emplearse un procedimiento conocido.

35 La medición del título de anticuerpo puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, un procedimiento ELISA explicado en el artículo (b) descrito anteriormente.

El hibridoma obtenido mediante el procedimiento tal como se describe anteriormente puede almacenarse en estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80 °C o menos.

40 Después de completar la clonación, se cambia el medio de un medio HT a un medio normal, y se cultiva el hibridoma.

Se efectúa un cultivo a gran escala mediante cultivo rotatorio usando una botella grande de cultivo o mediante cultivo rotativo.

45 Del sobrenadante obtenido por el cultivo a gran escala, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína mediante purificación usando un procedimiento conocido para los expertos en la materia, tal como filtración en gel.

Además, se inyecta el hibridoma en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma (por ejemplo, el BALB/c anteriormente mencionado) o en un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma, mediante lo que puede obtenerse la ascitis que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal.

50 En el caso donde el hibridoma se administra en la cavidad abdominal, si se administra un aceite mineral, tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristine) de 3 a 7 días antes de este, puede obtenerse una cantidad mayor de la ascitis.

Por ejemplo, se inyecta previamente un inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que

el hibridoma para inactivar a los linfocitos T. 20 días después, se suspenden de 10^6 a 10^7 células clones de hibridoma en un medio sin suero (0,5 ml), y se inyecta la suspensión en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando se expande el abdomen y se llena con la ascitis, se recoge la ascitis.

5 Mediante este procedimiento, puede obtenerse el anticuerpo monoclonal a una concentración aproximadamente 100 veces mayor que la de la solución de cultivo.

El anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento anteriormente mencionado puede purificarse mediante el procedimiento descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

10 Es decir, los ejemplos del procedimiento incluyen un procedimiento de precipitación por sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad.

Como un procedimiento de purificación sencillo, puede usarse un kit de purificación de anticuerpo monoclonal comercialmente disponible (por ejemplo, el kit MAbTrap GII fabricado por Pharmacia, Inc.) o similares.

El anticuerpo monoclonal obtenido de este modo tiene una elevada especificidad antigénica por Siglec-15.

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

15 El isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de este modo puede determinarse del modo siguiente.

En primer lugar, los ejemplos del procedimiento de identificación incluyen el procedimiento de Ouchterlony, un procedimiento ELISA y un procedimiento RIA.

El procedimiento de Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se necesita una operación de condensación.

20 Por otra parte, cuando se emplea un procedimiento ELISA o un procedimiento RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante de cultivo con una fase sólida con antígeno adsorbido y usando anticuerpos correspondientes a varios tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulina como anticuerpos secundarios, puede identificarse el isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal.

25 Además, como procedimiento más sencillo, puede usarse un kit de identificación comercialmente disponible (por ejemplo, el kit Mouse Typer fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similares.

Además, puede efectuarse una determinación cuantitativa de una proteína mediante el procedimiento de Folin Lowry y un procedimiento de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [$1,4 (DO\ 280) = 1\ \text{mg/ml}$ de inmunoglobulina].

(3) Otros anticuerpos

30 El anticuerpo descrito en el presente documento incluye no solo el anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente contra Siglec-15, sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga a humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse usando un procedimiento conocido.

35 Como anticuerpo quimérico, sirve como ejemplo un anticuerpo en el que las regiones variable y constante de anticuerpo se derivan de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el que una región variable de anticuerpo derivada de ratón se conecta a una región constante derivada de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984)).

40 Como anticuerpo humanizado, sirve como ejemplo un anticuerpo obtenido integrando solo una región determinante de la complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525), y un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácidos del armazón así como la secuencia de CDR en un anticuerpo humano o mediante un procedimiento de injerto de CDR (documento WO 90/07861).

45 Además, el anticuerpo descrito en el presente documento incluye un anticuerpo humano. Un anticuerpo humano anti-Siglec-15 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solo una secuencia génica de un anticuerpo derivada de un cromosoma humano. El anticuerpo humano anti-Siglec-15 puede obtenerse mediante un procedimiento usando un ratón que produce anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que contiene los genes de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. y col., Nature Genetics (1997) 16, págs. 133-143; Kuroiwa, Y. y col., Nuc. Acids Res. (1998) 26, págs. 3447-3448; Yoshida, H. y col., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, págs. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, págs. 722-727; etc.).

50 Dicho animal transgénico puede crearse específicamente del modo siguiente. Se crea un animal genéticamente modificado en el que se han eliminado los locus génicos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina endógenas de mamífero no humano, y en su lugar, se han introducido los locus génicos de las cadenas ligera y

pesada de inmunoglobulina humana a través de un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC) o similar produciendo un animal *knockout* y un animal transgénico y emparejando a estos animales.

Además, de acuerdo con una técnica de ingeniería genética, usando ADNc que codifican dichas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano, respectivamente, preferentemente un vector que contiene los ADNc, se transforman células eucariotas, y se cultiva un transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, por lo que también puede obtenerse el anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo.

En el presente documento, como hospedador, por ejemplo, pueden usarse células eucariotas, preferentemente células de mamífero, tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.

Además, también se conoce un procedimiento para obtener un anticuerpo humano derivado de una presentación en fagos explorado a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. y col., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), págs. 2301-2308; Carmen, S. y col., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), págs. 189-203; Siriwardena, D. y col., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), págs. 427-431; etc.).

Por ejemplo, puede usarse un procedimiento de presentación en fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa sobre la superficie de un fago como un anticuerpo monocatenario (scFv), y se selecciona un fago que se une a un antígeno (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), págs. 1105-1116).

Mediante el análisis del gen del fago seleccionado basándose en la unión a un antígeno, puede determinarse la secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.

Si se determina la secuencia de ADN de un scFv que se une a un antígeno, puede obtenerse un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que tiene la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador adecuado para expresarlo (documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, *Annu. Rev. Immunol* (1994) 12, págs. 433-455; *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), págs. 1105-1116).

En el caso donde se produce un anticuerpo aislando una vez un gen de anticuerpo y después introduciendo el gen en un hospedador adecuado, puede usarse una combinación adecuada de hospedador y vector de expresión.

En el caso donde se usan células eucariotas como hospedador, pueden usarse células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas.

Como células animales, sirven de ejemplo (1) células de mamífero, por ejemplo, cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, págs. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, págs. 175-182; ATCC CRL-1650), fibroblastos NIH3T3 murinos (ATCC N°: CLR-1658), y células de ovario de cáncer chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

En los casos donde se usan células procariontas, por ejemplo, sirven de ejemplo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Al introducir un gen de un anticuerpo diana en estas células mediante transformación, y cultivar las células transformadas de este modo *in vitro*, puede obtenerse el anticuerpo.

No hay limitación en cuanto al isotipo del anticuerpo descrito en el presente documento, y los ejemplos del mismo incluyen IgG (IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD e IgE, y los ejemplos preferidos del mismo incluyen IgG e IgM.

Además, el anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un fragmento funcional del anticuerpo que tiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo o un fragmento modificado del mismo. El fragmento del anticuerpo puede obtenerse tratando al anticuerpo con una proteasa, tal como papaína o pepsina, o modificando el gen de anticuerpo de acuerdo con una técnica de ingeniería genética y expresando el gen modificado en células cultivadas adecuadas. Entre estos fragmentos de anticuerpo, un fragmento que tenga la totalidad o parte de las funciones de la molécula de longitud completa del anticuerpo puede denominarse fragmento funcional del anticuerpo. En cuanto a las funciones del anticuerpo, sirven generalmente de ejemplo una actividad de unión a antígeno, una actividad de neutralizar la actividad de un antígeno, una actividad de aumentar la actividad de un antígeno, una actividad citotóxica dependiente de anticuerpo, una actividad citotóxica dependiente de complemento, y una actividad citotóxica celular dependiente de complemento. La función del fragmento funcional del anticuerpo descrito en el presente documento es preferentemente una actividad de inhibición de la formación de osteoclastos, más preferentemente, una actividad de inhibir el proceso de fusión de osteoclastos.

Los ejemplos del fragmento de anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, Fv monocatenario (scFv) en el que las moléculas de la cadena pesada y de la cadena ligera están ligadas a través de un enlazador adecuado, un diacuerpo (diacuerpos), un anticuerpo lineal, y un anticuerpo poliespecífico compuesto del fragmento de anticuerpo. Además, Fab', que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras también está incluido en el fragmento de anticuerpo.

Además, el anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo poliespecífico con especificidad por al menos dos antígenos diferentes.

En general, dicha molécula se une a dos antígenos (es decir, anticuerpo biespecífico), sin embargo, el "anticuerpo poliespecífico", tal como se usa en el presente documento incluye un anticuerpo que tiene especificidad por dos o más (por ejemplo, tres) antígenos.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo poliespecífico compuesto de un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de dicho anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico F(ab')₂). El anticuerpo biespecífico puede producirse ligando las cadenas ligera y pesada (pares HL) de dos tipos de anticuerpos, o también pueden producirse fusionando hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células fusionadas que producen el anticuerpo biespecífico (Millstein y col., Nature (1983) 305, págs. 537-539).

El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo monocatenario (también citado como scFv). El anticuerpo monocatenario puede obtenerse ligando las regiones V de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo mediante un enlazador polipeptídico (Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (Editado por Rosenberg y Moore, Springer Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, págs. 1126-1136). Además, también puede usarse un fragmento BiscFv producido ligando dos moléculas scFv mediante un enlazador polipeptídico como anticuerpo biespecífico.

Se conoce en este campo técnico un procedimiento para producir un anticuerpo monocatenario (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 4.946.778, 5.260.203, 5.091.513, 5.455.030, etc.). En este scFv, las regiones V de la cadena pesada y de la cadena ligera se ligan mediante un enlazador que no forma un conjugado, preferentemente mediante un enlazador polipeptídico (Huston, J. S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, págs. 5879-5883). En los scFv, las regiones V de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden derivarse del mismo anticuerpo o de anticuerpos distintos. Como enlazador polipeptídico a usar para ligar las regiones V, por ejemplo, se usa un péptido monocatenario dado compuesto de 12 a 19 restos.

El ADN que codifica al scFv puede obtenerse efectuando amplificación usando un ADN parcial que codifica una secuencia completa o una deseada de un ADN seleccionado de un ADN que codifica la cadena pesada o la región V de la cadena pesada del anticuerpo anteriormente mencionado y un ADN que codifica la cadena ligera o la región V de la cadena ligera del mismo como molde mediante un procedimiento PCR usando un par de cebadores que define ambos extremos del mismo, y efectuar adicionalmente amplificación combinando un ADN que codifica una porción de enlazante polipeptídico y un par de cebadores que define ambos extremos del mismo para ligar ambos extremos a la cadena pesada y a la cadena ligera, respectivamente.

Además, una vez se ha producido el ADN que codifica el scFv, puede obtenerse un vector de expresión que contiene al mismo y transformarse un hospedador mediante el vector de expresión de acuerdo con un procedimiento común. Además, mediante el uso del hospedador resultante, puede obtenerse el scFv de acuerdo con un procedimiento común.

Puede producirse un fragmento de anticuerpo del mismo en un hospedador obteniendo un gen y expresando el gen del mismo modo descrito anteriormente.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede multimerizarse para aumentar la afinidad por un antígeno. El anticuerpo a multimerizar puede ser un tipo de anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítomos del mismo antígeno. Como procedimiento de multimerización del anticuerpo, la unión del dominio CH3 de IgG a dos moléculas scFv, unión a estreptavidina, introducción de un motivo hélice-bucle-hélice y similares sirven como ejemplos.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de diversos tipos de anticuerpos anti-Siglec-15 que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Como ejemplo del anticuerpo policlonal, sirve de ejemplo una mezcla de varios tipos de anticuerpos que tienen diferentes CDR. Como dicho anticuerpo policlonal, se cultiva una mezcla de células que producen diferentes anticuerpos, y puede usarse un anticuerpo purificado a partir del cultivo resultante (véase el documento WO 2004/061104).

Como anticuerpo modificado, también puede usarse un anticuerpo unido a cualquiera de varios tipos de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG).

Además, el anticuerpo descrito en el presente documento puede estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente medicinal (inmunoconjugado). Los ejemplos de dicho anticuerpo incluyen uno en el que el anticuerpo está conjugado a un material radiactivo o a un compuesto que tiene una acción farmacológica (Nature Biotechnology (2005) 23, págs. 1137-1146).

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta la homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo puede efectuarse empleando un procedimiento de separación y purificación de proteínas convencional.

Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando de manera adecuada el uso de una columna de cromatografía, filtrado, ultrafiltración, precipitación de sal, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis de focalización isoelectrica, y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak y col. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el procedimiento no está limitado a esto.

Los ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa, y cromatografía de adsorción.

10 Dicha cromatografía puede efectuarse empleando cromatografía líquida, tal como HPLC o FPLC.

Como columna para su uso en la cromatografía de afinidad, sirven como ejemplo una columna de proteína A y una columna de proteína G.

Por ejemplo, como columna que usa una columna de proteína A, sirven como ejemplos Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Farmacia) y similares.

15 Además, mediante el uso de un vehículo que tiene un antígeno inmovilizado sobre este, también puede purificarse el anticuerpo utilizando la propiedad de unión del anticuerpo al antígeno.

5. Medicina que contiene anticuerpo anti-Siglec-15

A partir de los anticuerpos anti-Siglec-15 obtenidos mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior "4. Producción de anticuerpo anti-Siglec-15", puede obtenerse un anticuerpo que neutraliza la actividad biológica de Siglec-15. Dicho anticuerpo que neutraliza la actividad biológica de Siglec-15 inhibe la actividad biológica de Siglec-15 *in vivo*, es decir, la diferenciación y/o maduración de osteoclastos, y por lo tanto puede usarse como un agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal causado por una diferenciación y/o maduración anormal de los osteoclastos, como una medicina. El metabolismo óseo anormal puede ser un trastorno caracterizado por una pérdida neta de hueso (osteopenia u osteólisis). En general, el tratamiento y/o prevención mediante el anticuerpo anti-Siglec-15 se aplica a un caso donde se necesita la inhibición de la resorción ósea. Los ejemplos del metabolismo óseo anormal que puede tratarse y/o prevenirse mediante el anticuerpo anti-Siglec-15 incluyen: osteoporosis (osteoporosis postmenopáusicas, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debida al uso de un agente terapéutico, tal como un esteroide o un inmunosupresor, u osteoporosis acompañada de artritis reumatoide), destrucción ósea acompañada de artritis reumatoide, hipercalcemia cancerosa, destrucción ósea que acompaña a mieloma múltiple o metástasis del cáncer al hueso, tumor de células gigantes, pérdida de hueso debida a la periodontitis, osteólisis alrededor de una articulación protésica, destrucción ósea en osteomielitis crónica, enfermedad ósea de Paget, osteodistrofia renal y osteogénesis imperfecta, aunque el metabolismo óseo anormal no se limita a los mismos, en tanto que haya una enfermedad acompañada por una pérdida ósea neta causada por osteoclastos. Los ejemplos del anticuerpo anti-Siglec-15 para su uso como la medicina anteriormente mencionada incluye un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado producido a partir del anticuerpo N° 32A1 o el anticuerpo N° 41B1 mediante el procedimiento descrito en 4. (3) "Otros anticuerpos". Además, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano que comparten el mismo epítipo que el anticuerpo N° 32A1 o el anticuerpo N° 41B1 también puede usarse como medicina. Puede confirmarse si un anticuerpo anti-Siglec-15 determinado comparte el mismo epítipo que el anticuerpo N° 32A1 o el anticuerpo N° 41B1 observando si estos anticuerpos se unen o no al mismo péptido parcial específico de Siglec-15. Además, también puede determinarse que si el anticuerpo anti-Siglec-15 determinado compite con el anticuerpo N° 32A1 o con el anticuerpo N° 41B1 por la unión a Siglec-15, estos anticuerpos comparten el mismo epítipo.

La actividad *in vitro* del anticuerpo anti-Siglec-15 de neutralizar la actividad biológica de Siglec-15 puede determinarse, por ejemplo, mediante la actividad de inhibir la diferenciación de células que sobreexpresan Siglec-15 en osteoclastos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Siglec-15 se añade a células RAW 364.7 o a células RAW 264, que son una línea celular derivada de monocitos de ratón, a varias concentraciones, y puede determinarse la actividad de inhibir la diferenciación en osteoclastos mediante estimulación con RANKL o TNF- α . Además, el anticuerpo anti-Siglec-15 se añade a células primarias cultivadas derivadas de médula ósea a varias concentraciones, y puede determinarse la actividad de inhibir la diferenciación en osteoclastos mediante estimulación con RANKL, TNF- α o vitamina D₃ activa. Además, el anticuerpo anti-Siglec-15 se añade a células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, disponibles a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. 2T-11) a varias concentraciones, y puede determinarse la actividad de inhibir la diferenciación en osteoclastos mediante estimulación con RANKL o M-CSF. Dicho efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos puede determinarse usando la inhibición de la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos como un índice, tal como se muestra en los Ejemplos 17, 19, 20 y 26. Además, también puede determinarse el efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos usando la inhibición de la formación de osteoclastos multinucleados positivos a TRAP, es decir, la inhibición de la fusión celular de osteoclastos en forma de un índice se muestra en los Ejemplos 19, 21, 22 y 35. Los anticuerpos mostraron un efecto inhibitor en la fusión celular a una concentración de 30 μ g/ml o menos en el sistema de ensayo anteriormente mencionado para

diferenciación de osteoclastos, y algunos anticuerpos mostraron el efecto inhibitorio incluso a una concentración de 3 µg/ml o menos o a 1 µg/ml o menos. Además, en el caso donde se ensayó el efecto a una concentración aún menor, se descubrió que una variedad de anticuerpos mostró un efecto inhibitorio en la diferenciación de osteoclastos incluso a un intervalo de concentraciones de 63 ng/ml a 1 µg/ml. Además, en un experimento de un ensayo de fosa (Takada y col., Bone and Mineral, (1992) 17, 347-359) usando células derivadas del fémur y/o de la tibia, puede determinarse la actividad *in vitro* de inhibición de la resorción ósea por osteoclastos añadiendo el anticuerpo anti-Siglec-15 a células derivadas del fémur y/o de la tibia a varias concentraciones, y observando la formación de fosas en una lámina de dentina. Como sistema para determinar la actividad *in vitro* de inhibición de la resorción ósea por osteoclastos, tal como se muestra en el Ejemplo 37, también es posible usar una placa recubierta con colágeno humano conjugado con europio. En el sistema de ensayo anteriormente mencionado para resorción ósea por osteoclastos, el anticuerpo inhibió la resorción ósea a una concentración de 3 µg/ml o menor, es decir, a un intervalo de concentración de desde 0,3 µg/ml hasta 3 µg/ml. El efecto terapéutico o preventivo *in vivo* del anticuerpo anti-Siglec-15 en el metabolismo óseo anormal usando un animal experimental puede confirmarse administrando en anticuerpo anti-Siglec-15 a un modelo animal de osteoporosis o a un animal transgénico que sobreexpresa Siglec-15 y midiendo un cambio en los osteoclastos.

El anticuerpo obtenido de este modo que neutraliza la actividad biológica de Siglec-14 es útil como medicina, particularmente como una composición farmacéutica para tratar o prevenir el metabolismo óseo anormal, tal como osteoporosis, destrucción ósea que acompaña a artritis reumatoide o destrucción ósea que acompaña a la metástasis cancerosa al hueso, o como un anticuerpo para el diagnóstico inmunológico de dicha enfermedad.

En el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), el principal problema es la pérdida ósea que acompaña a la aparición de la enfermedad. Se ha comunicado que en esta pérdida ósea que acompaña a la AR, los osteoclastos juegan un papel principal. Las citocinas consideradas más importantes para la inducción (diferenciación y maduración) y activación de osteoclastos, y la causa de la destrucción ósea en la AR son RANKL y TNF-α (Román E. y col., Bone 30, págs. 340-346; 2002). Tal como se muestra en el Ejemplo 19 de la presente descripción, OCIF/OPG que es un receptor señuelo para RANKL puede inhibir la formación de osteoclastos inducida por RANKL pero no inhibe la formación de osteoclastos inducida por TNF-α. Por otra parte, el anticuerpo anti-Siglec-15 inhibió de manera efectiva la formación de osteoclastos inducida tanto por RANKL como por TNF-α. Por lo tanto, se espera que el anticuerpo anti-Siglec-15 descrito en el presente documento pueda inhibir la pérdida ósea y la destrucción ósea inducida por TNF-α en AR o similares más fuertemente que un bloqueante de RANKL (OCIF/OPG, un anticuerpo anti-RANKL o similares).

Como ejemplo, para el tratamiento o prevención del metabolismo óseo anormal, puede administrarse el anticuerpo anti-Siglec-15 solo o junto con al menos un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con los huesos. Como otro ejemplo, el anticuerpo anti-Siglec-15 puede administrarse junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para el metabolismo óseo anormal. Los ejemplos del agente terapéutico que pueden administrarse junto con el anticuerpo anti-Siglec-15 incluyen, pero sin limitación, los bifosfonatos, la vitamina D₃ activa, la calcitonina y derivados de los mismos, las preparaciones de hormonas, tales como el estradiol, los SERM (moduladores selectivos del receptor de estrógeno), ipriflavone, vitamina K₂ (menatetrenona), preparaciones de calcio, preparaciones de PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, preparaciones de receptor de TNF soluble, anticuerpos anti-TNF-α o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con hormona paratiroidea) o fragmentos funcionales de los anticuerpos, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos anti-IL-6 o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anticuerpos anti-RANKL o fragmentos funcionales de los anticuerpos y OCIF (factor inhibitorio de la osteoclastogénesis). Dependiendo del estado del metabolismo óseo anormal o del grado previsto del tratamiento y/o prevención, pueden administrarse dos o tres o más tipos de agentes medicinales, y estos agentes medicinales pueden administrarse juntos, encapsulándolos en la misma preparación. Estos agentes medicinales y el anticuerpo anti-Siglec-15 pueden suministrarse juntos, encapsulándolos en la misma preparación. Además, estos agentes medicinales pueden suministrarse juntos encapsulándolos en forma de kit para usarlos para el tratamiento y/o prevención. Además, estos agentes medicinales y el anticuerpo anti-Siglec-15 pueden administrarse por separado. En el caso de administración en terapia génica, puede insertarse un gen de un agente terapéutico proteínico para una enfermedad ósea y un gen del anticuerpo anti-Siglec-15 cadena abajo de la misma región promotora o en diferentes regiones promotoras, y puede introducirse en el mismo vector o en diferentes vectores.

Al conjugar un agente terapéutico para una enfermedad ósea al anticuerpo anti-Siglec-15 o un fragmento del mismo, puede producirse un conjugado de fármaco dirigido, tal como se describe en M. C. Garnet "Targeted drug conjugates: principles and progress", Advanced Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216. Para lograr este fin, en vez de la molécula de anticuerpo, puede aplicarse un fragmento de anticuerpo siempre que no pierda completamente la capacidad de reconocer osteoclastos, y los ejemplos del mismo incluyen fragmentos, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv. En el presente caso, el anticuerpo y el fragmento pueden usarse del mismo modo. El conjugado formado por el anticuerpo anti-Siglec-15 o un fragmento del mismo y un agente terapéutico para una enfermedad ósea puede ser cualquiera de varias formas descritas en 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 y J. Kopecek "Polymer Conjugates with Anticancer Activity" Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123 y similares. Es decir, sirven como ejemplos una forma conjugada en la que el anticuerpo anti-Siglec-15 y un agente terapéutico para una enfermedad ósea se conjugan entre sí química y

directamente o a través de un espaciador, tal como un oligopéptido y una forma conjugada a través de un vehículo farmacológico. Los ejemplos del vehículo farmacológico incluyen un liposoma y un polímero soluble en agua. Los ejemplos más específicos de la forma de conjugado mediante dicho vehículo farmacológico incluyen una forma conjugada en la que el anticuerpo y un agente terapéutico para una enfermedad ósea se incorporan en un liposoma y el liposoma y el anticuerpo se conjugan entre sí, y una forma conjugada en la que se conjugan un agente terapéutico para una enfermedad ósea a un polímero soluble en agua (un compuesto que tenga un peso molecular de desde aproximadamente 1000 a 100000) de manera química y directamente o mediante un espaciador, tal como un oligopéptido y el anticuerpo se conjugan al polímero soluble en agua. La conjugación del anticuerpo (o un fragmento del mismo) a un agente terapéutico para una enfermedad ósea o un vehículo farmacológico, tal como un liposoma o un polímero soluble en agua, puede efectuarse mediante un procedimiento conocido para los expertos en la materia, tal como el procedimiento descrito en G. T. Hermanson "Bioconjugate Techniques" Academic Press, California (1996), Putnam y J. Kopecek "Polymer Conjugates with Anticancer Activity" Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123. La incorporación de un agente terapéutico para una enfermedad ósea en un liposoma puede efectuarse mediante un procedimiento conocido para los expertos en la materia, tal como el procedimiento descrito en D. D. Lasic "Liposomes: From Physics to Applications" Elsevier Science Publishers B. V., Ámsterdam (1993) o similares. La conjugación de un agente terapéutico para una enfermedad ósea a un polímero soluble en agua puede efectuarse mediante un procedimiento conocido para los expertos en la materia, tal como mediante el procedimiento descrito en D. Putnam y J. Kopecek "Polymer Conjugates with Anticancer Activity" Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123. Un conjugado entre el anticuerpo (o un fragmento del mismo) y un agente terapéutico proteínico para una enfermedad ósea (o un fragmento del mismo) pueden producirse mediante un procedimiento conocido para los expertos en la materia mediante ingeniería genética distinta al procedimiento anteriormente mencionado.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente y/o preventivamente eficaz del anticuerpo anti-Siglec-15 y un diluyente, vehículo, agente solubilizante, agente emulsionante, conservante o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente y/o preventivamente eficaz del anticuerpo anti-Siglec-15, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico para una enfermedad ósea, y un diluyente, vehículo, agente solubilizante, agente emulsionante, conservante o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos del agente terapéutico para una enfermedad ósea incluyen, pero sin limitación, los bifosfonatos, la vitamina D₃ activa, la calcitonina y derivados de los mismos, las preparaciones de hormonas, tales como el estradiol, los SERM (moduladores selectivos del receptor de estrógeno), ipriflavone, vitamina K₂ (menatetreona), preparaciones de calcio, preparaciones de PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, preparaciones de receptor de TNF soluble, anticuerpos anti-TNF- α o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con hormona paratiroidea) o fragmentos funcionales de los anticuerpos, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos anti-IL-6 o fragmentos funcionales de los anticuerpos, anticuerpos anti-RANKL o fragmentos funcionales de los anticuerpos y OCIF (factor inhibidor de la osteoclastogénesis).

Una sustancia para su uso en una preparación aceptable en una composición farmacéutica como se describe en el presente documento es preferentemente no tóxica para una persona a la que se le va a administrar la composición farmacéutica, en cuanto a la dosificación y concentración.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede contener una sustancia para uso farmacéutico que es capaz de cambiar o mantener el pH, la presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el color, el estado aséptico, la estabilidad, la solubilidad, la tasa de liberación, la tasa de absorción, y la permeabilidad. Los ejemplos de la sustancia para uso farmacéutico incluyen, pero sin limitación, aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio e hidrogenosulfito de sodio; tampones, tales como tampones fosfato, citrato, borato, bicarbonato y soluciones Tris-HCl; cargas, tales como manitol y glicina; agentes quelantes, tales como tetraacetato de etilendiamina (EDTA); agentes complejantes, tales como cafeína, polivinilpirrolidona, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina; expansores, tales como glucosa, manosa y dextrina; otros carbohidratos, tales como monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; aromas; diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidina; conservantes, tales como polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de bases, cloruro de benzalconio, benzoato, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenilético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, y peróxido de hidrógeno; disolventes, tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; alcoholes de azúcar, tales como manitol y sorbitol; agentes sensores; tensioactivos, tales como éster de sorbitán, polisorbato, incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina y colesterol; agentes potenciadores de la estabilidad, tales como sacarosa y sorbitol; agentes potenciadores de la elasticidad, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y manitol y sorbitol; agentes transportadores; diluyentes; excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos. La cantidad de adición de estas sustancias para uso farmacéutico es preferentemente de 0,01 a 100 veces, particularmente preferentemente de 0,1 a 10 veces el peso del anticuerpo anti-Siglec-15. Los expertos en la materia pueden determinar de manera adecuada una formulación preferida de la composición farmacéutica en una preparación dependiendo de la enfermedad a la que se va a aplicar, de la ruta de administración que se va a aplicar o similares.

El excipiente o transportador en la composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido o un sólido. Un excipiente o vehículo adecuado puede ser agua inyectable, suero salino fisiológico, y fluido cefalorraquídeo artificial u otra sustancia usada de manera común para administración parenteral. Además, también puede usarse como vehículo suero salino fisiológico neutro o suero salino fisiológico que contiene albúmina de suero. La composición farmacéutica puede contener un tampón Tris de pH 7,0 a 8,5 o un tampón acetato de pH 4,0 a 5,5 que puede suplementarse con sorbitol u otro compuesto. Los ejemplos de la composición farmacéutica descrita en el presente documento incluyen una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y al menos un agente terapéutico para una enfermedad ósea. La composición farmacéutica descrita en el presente documento se prepara en forma de un producto liofilizado o un líquido como agente medicinal que tiene una composición seleccionada y una pureza necesaria. La composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 y al menos un agente terapéutico para el metabolismo óseo anormal también puede formarse en un producto liofilizado usando un excipiente adecuado, tal como sacarosa.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede prepararse para administración parenteral o para absorción gastrointestinal mediante administración oral. La composición y concentración puede determinarse dependiendo del procedimiento de administración. A medida que aumenta la afinidad del anticuerpo anti-Siglec-15 contenido en la composición farmacéutica descrita en el presente documento por Siglec-15, es decir, a medida que la constante de disociación (valor de K_d) por Siglec-15 es menor, el anticuerpo anti-Siglec-15 puede mostrar su eficacia farmacológica a una dosis menor para seres humanos, y por lo tanto, la dosis de la composición farmacéutica descrita en el presente documento para seres humanos también puede determinarse basándose en este resultado. En cuanto a la dosis, en el caso donde se administra un anticuerpo anti-Siglec-15 humano a seres humanos, el anticuerpo puede administrarse a una dosis de desde aproximadamente 0,1 hasta 100 mg/kg una vez cada uno a 180 días.

Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica descrita en el presente documento incluyen inyecciones que incluyen infusiones, supositorios, agentes transnasales, agentes sublinguales y absorbentes percutáneos.

6. Búsqueda de una sustancia de interacción directa

La divulgación también incluye un procedimiento de diseño de fármaco basado en la conformación de Siglec-15 para obtener una sustancia que inhibe la actividad de Siglec-15. Dicho procedimiento se conoce como un procedimiento racional de diseño de fármaco y se usa para investigar en busca de un compuesto que inhiba o active eficazmente la actividad enzimática o la unión a un ligando, un cofactor o un ADN. Como ejemplo de dicho compuesto, se conoce bien un inhibidor de proteasa que sirve como agente anti-VIH que ya se ha empezado a comercializar. También en un análisis estructural tridimensional de Siglec-15, tal como se desvela en el presente documento, puede usarse un procedimiento generalmente bien conocido, tal como un análisis cristalográfico por rayos X o un procedimiento de resonancia magnética nuclear. Además, en la búsqueda de una sustancia que inhibe la función de Siglec-15, también puede efectuarse el diseño del fármaco utilizando diseño de fármaco asistido por ordenador (CADD). Como ejemplo de este caso, se conoce un compuesto de bajo peso molecular (documento WO 99/58515) que inhibe la acción de AP-1 y se espera que sea un fármaco genómico novedoso para tratar la artritis reumatoide y similares. Por virtud de dicho procedimiento, es posible obtener una sustancia que inhiba la función de Siglec-15 uniéndose directamente a Siglec-15 o inhibiendo la interacción entre Siglec-15 y otros factores.

Además, otra realización se refiere a un polipéptido con el que se asocia el Siglec-15 descrito en el presente documento, en otras palabras, una proteína compañera del Siglec-15. Es decir, la divulgación se refiere a un procedimiento de exploración de una proteína compañera que regula la actividad de Siglec-15.

Una realización de este procedimiento de exploración incluye una etapa de poner en contacto una proteína de ensayo con Siglec-15 y seleccionar una proteína que se une a Siglec-15. Como dicho procedimiento, por ejemplo, sirve de ejemplo un procedimiento en el que se usa Siglec-15 purificada y se efectúa purificación por afinidad de una proteína que se une a esta. Un ejemplo específico del procedimiento se describirá más adelante. Se fusiona una secuencia compuesta de seis histidinas como marcador de afinidad con Siglec-15 para preparar una proteína de fusión, y la proteína resultante se incuba a 4 °C durante 12 horas junto con una solución de extracto celular (una fracción pasada a través de una columna de níquel-agarosa después de cargar la columna con una solución de células). Después, se añade otro vehículo de níquel-agarosa a la mezcla y la mezcla se incuba a 4 °C durante 1 hora. Después de que el vehículo de níquel-agarosa esté suficientemente lavado con un tampón de lavado, se añade imidazol 100 mM a la mezcla para eluir y purificar una proteína que se une específicamente a Siglec-15 en la solución de extracto celular. Después, la proteína purificada se analiza para determinar su estructura. De este modo, puede purificarse una proteína que se une directamente a Siglec-15 y una proteína que no tiene una actividad de unión a Siglec-15 pero que se une indirectamente a Siglec-15 formando un complejo con una proteína como una subunidad que se une directamente a Siglec-15. Como procedimiento alternativo, también es posible efectuar clonación mediante un ensayo de transferencia de Western lejano o un ensayo de sistema de dos híbridos usando células de levadura o de mamífero, sin embargo, no está limitado a estos procedimientos.

Si un ADNc o una proteína compañera que interactúa directa o indirectamente con Siglec-15 se obtiene de este

- modo, el ADNc puede usarse en una exploración funcional de una sustancia que inhibe la interacción entre Siglec-15 y la proteína compañera. Específicamente, se prepara una proteína de fusión entre Siglec-15 y glutatión-S-transferasa y se une a una microplaca cubierta con un anticuerpo anti-glutatión-S-transferasa. Después, se pone en contacto una proteína compañera biotinilada con la proteína de fusión, y se detecta la unión de la proteína compañera con la proteína de fusión usando fosfatasa alcalina conjugada a estreptavidina. Cuando se añade la proteína compañera biotinilada, también se añade una sustancia para seleccionar una sustancia que promueve o inhibe la unión de la proteína de fusión a la proteína compañera. Mediante este procedimiento, puede obtenerse una sustancia que actúa directamente en la proteína de fusión o una sustancia que actúa directamente en la proteína compañera.
- En el caso donde la proteína de fusión se une indirectamente a la proteína compañera a través de otro factor, el ensayo se efectúa en presencia de, por ejemplo, una solución de extracto celular que contiene este factor. En este caso, hay una posibilidad de que también se pueda seleccionar una sustancia que pueda actuar sobre el factor.
- Además, en el caso donde la proteína compañera obtenida tenga la actividad de promover la función de Siglec-15, es posible explorar una sustancia candidata útil como agente terapéutico y/o preventivo para el metabolismo óseo anormal, por ejemplo, un agente terapéutico y/o preventivo para la osteoporosis de acuerdo con un procedimiento de ensayo que emplea un vector de expresión del gen de Siglec-15 tal como se describe anteriormente. Además, en el caso donde la proteína compañera obtenida tiene una actividad de inhibir la función de Siglec-15, es posible usar un polinucleótido que codifica dicho inhibidor en terapia génica para el metabolismo óseo anormal.
- Dicho polinucleótido puede obtenerse, por ejemplo, mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del inhibidor identificado, sintetizando una sonda oligonucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos, y efectuando la exploración de una biblioteca de ADNc o una biblioteca genómica. Además, en el caso donde se deriva un polipéptido que tiene la actividad de inhibir la función de Siglec-15 a partir de una biblioteca peptídica artificial sintetizada al azar, se sintetiza químicamente un ADN compuesto de una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido.
- En la terapia génica, el gen obtenido de este modo que codifica el inhibidor se integra, por ejemplo, en un vector viral y se infecta a un paciente con un virus (atenuado) que tiene el vector viral recombinante resultante. En el cuerpo del paciente, se produce un factor anti-destrucción ósea y funciona para inhibir la diferenciación de osteoclastos, y por lo tanto, puede realizarse el tratamiento y/o prevención del metabolismo óseo anormal.
- Como procedimiento para introducir un agente terapéutico génico en una célula, puede usarse un procedimiento de transferencia génica usando un vector viral o un procedimiento de transferencia génica no viral.
- Los ejemplos del procedimiento de transferencia génica usando un vector viral incluyen un procedimiento para integrar un ADN que codifica un inhibidor de Siglec-15 o un mutante del mismo en un virus de ADN o en un virus de ARN, tal como un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un herpes virus, un virus de vaccinia, un poxvirus, un poliovirus, o un sindbis virus para efectuar la transferencia génica. Entre estos, se prefiere particularmente un procedimiento que usa un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, o un virus vaccinia. Los ejemplos de procedimiento de transferencia génica no viral incluyen un procedimiento de administración de un plásmido de expresión directamente en el músculo (un procedimiento de vacunación de ADN), un procedimiento de liposoma, un procedimiento de lipofección, un procedimiento de microinyección, un procedimiento de fosfato de calcio, y un procedimiento de electroporación. En particular, se prefieren un procedimiento de vacunación de ADN y un procedimiento de liposoma.
- Además, para usar realmente el agente terapéutico génico como agente medicinal, existen un procedimiento *in vivo* en el que el ADN se introduce directamente en el cuerpo y un procedimiento *ex vivo* en el que se toma un determinado tipo de célula de un ser humano y se introduce un ADN en la célula *ex vivo*, y se devuelve la célula al cuerpo.
- Por ejemplo, en el caso donde el agente terapéutico génico se administra mediante el procedimiento *in vivo*, se administra a través de una ruta de administración adecuada, tal como a través de una vena o una arteria, o debajo de la piel, en la piel, o dentro del músculo según la enfermedad, los síntomas o similares. Además, en el caso donde se administra mediante el procedimiento *in vivo*, el agente terapéutico génico se formula generalmente en forma de una inyección, sin embargo, puede añadirse un vehículo usado de manera común según sea necesario. Además, en el caso donde se formula en un liposoma o en un liposoma de fusión de membrana (tal como un liposoma de virus Sendai), puede formularse en una preparación de liposoma, tal como una suspensión, un agente liofilizado, o un agente concentrado por centrifugación y liofilizado.
- Puede usarse una secuencia nucleotídica complementaria a una secuencia de longitud completa o parcial de la secuencia nucleotídica representada por SEQ ID NO: 1 o 3 en el Listado de secuencias para la denominada terapia antisentido. Puede usarse una molécula antisentido como un ADN que está compuesto generalmente de desde 15 hasta 30 nucleótidos y es complementario a una parte de una secuencia nucleotídica seleccionada de las secuencias nucleotídicas representadas por las SEQ ID NO: 1 y 3 en el Listado de secuencias o un derivado de ADN estable del mismo, tal como un derivado de fosforotioato, metilfosfonato, o morfolino del mismo, o un derivado de

ARN estable, tal como 2'-O-alquilo ARN. Dicha molécula antisentido puede introducirse en una célula mediante un procedimiento conocido en el campo técnico de la invención, por ejemplo, inyectando una cantidad extremadamente pequeña de la molécula antisentido, formando la molécula en una cápsula de liposoma, o expresando la molécula mediante el uso de un vector que tiene una secuencia antisentido. Dicha terapia antisentido es útil para tratar una enfermedad causada por aumentar excesivamente la actividad de una proteína codificada por la secuencia nucleotídica representada por SEQ ID NO: 1 o 3 en el Listado de secuencias.

Además, también sirve de ejemplo un procedimiento que usa un ARN corto bicatenario (ARNpi) (Genes and Developments, 15 de enero de 2001, vol. 15, N° 2, págs. 188-200). Por ejemplo, se prepara ARNpi contra el gen de Siglec-15 y se introduce en una célula de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento, mediante el cual puede prepararse un agente terapéutico para una enfermedad metabólica ósea acompañada de la sobreexpresión de Siglec-15.

[Ejemplos]

Nótese que las operaciones respectivas referentes a la manipulación génica en los siguientes Ejemplos se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos en "Molecular Cloning" (escrito por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1989), o en el caso de usar reactivos o kits comercialmente disponibles, se efectuaron de acuerdo con los protocolos adjuntos a estos.

Ejemplo 1. Expresión de gen Siglec-15 humano en tejido de tumor de células gigantes

Un tumor de células gigantes (TCG) es histológicamente un tumor óseo con un gran número de células gigantes multinucleadas similares a osteoclastos que surgen y se caracterizan por hallazgos clínicos de destrucción ósea osteolítica (Bullough et al., Atlas of Orthopedic Pathology 2ª edición, 17,6-17,8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)). Se efectuó un análisis de perfil de expresión para una sonda EST (sonda Affymetrix GeneChip HG-U133 215856_at, fabricada por Affymetrix, Inc.) que tiene una secuencia nucleotídica parcialmente solapante con aquella del gen de Siglec-15 humana en tejidos de TCG usando la base de datos (Genesis 2006 Release 3.0) elaborada por Gene Logic, Inc. Además, también se efectuó un análisis de perfil de expresión para las sondas EST para RANK (sonda Affymetrix GeneChip HG-U133 207037_at, fabricada por Affymetrix, Inc.) y RANKL (sonda Affymetrix GeneChip HG-U133 210643_at, fabricada por Affymetrix, Inc.) que juega un papel clave en la diferenciación en osteoclastos; y para catepsina K (sonda Affymetrix GeneChip HG-U133 202450_s_at, fabricada por Affymetrix, Inc.) y TRAP (sonda Affymetrix GeneChip HG-U133 204638_at, fabricada por Affymetrix, Inc.) que son marcadores para la diferenciación en osteoclastos en tejidos de TCG del mismo modo.

Cuando se compararon los niveles de expresión entre 13 casos de tejidos óseos normales, 2 casos de tejidos de TCG y 16 casos de tejidos de tumor óseo diferentes de TCG, se reveló que la transcripción de RANK y RANKL aumenta específicamente en los tejidos de TCG en comparación con el tejido normal (Fig. 1-A). Por otra parte, en los tejidos de tumor óseo distintos de TCG en los que se cree que no siempre se causa un aumento en la resorción ósea, la transcripción de RANK y RANKL fue menor que en TCG, y por lo tanto, se sugirió que TCG proporciona un ambiente en el que se promueve la formación y activación de osteoclastos. Además, cuando se compararon los niveles de expresión de genes de catepsina K y TRAP, los genes se transcribieron a alto nivel en TCG (Fig. 1-B), y se sugirió que surgían un gran número de osteoclastos que tienen una actividad de resorción ósea. De igual forma, cuando se compararon los niveles de transcripción del gen de Siglec-15, se reveló que el gen se transcribía a un alto nivel específicamente en TCG del mismo modo que los genes de RANK, RANKL, catepsina K y TRAP, respectivamente (Fig. 2). A partir de estos resultados, se sugirió que Siglec-15 se asocia con patologías humanas en las que aumenta la resorción ósea por TCG.

Ejemplo 2. Extracción de ARN total de osteoclastos maduros derivados de ratón

a) Las células RAW 264.7 derivadas de monocitos de ratón (N° ATCC TIB-71) se prepararon a $4,5 \times 10^4$ células/ml en medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 %. La preparación resultante de células se puso en un matraz de 75 cm² a 10 ml/matraz, y se añadió a este RANKL humana (fabricada por Peptrotech Inc.) para dar una concentración final de 40 ng/ml, y las células se incubaron durante 3 días en un incubador con CO₂. Además, el cultivo sin la adición de RANKL humana se llevó a cabo del mismo modo.

Después de terminar el cultivo, se extrajo en ARN total de las RAP 264.7 cultivadas en las respectivas condiciones usando un reactivo de extracción de ARN total (ISOGEN, fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al reactivo. El ARN total recogido se almacenó a -80 °C.

b) Cuando se cultivaron células primarias derivadas de médula ósea de ratón en presencia de vitamina D₃ activa, surgieron un gran número de osteoclastos multinucleados positivos a TRAP (Takahashi et al., Endocrinology, (1988) 122, 1373-1382).

Se eutanasió un ratón ddY macho de 8 semanas mediante dislocación cervical con anestesia de éter y se reseccionaron el fémur y la tibia. Después de retirar los tejidos blandos, se cortaron ambos extremos del fémur o la tibia. Después, se inyectó medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 % en la médula ósea usando una jeringa con una aguja para inyección del calibre 25, y se recogieron las células de la médula ósea. Después de contar el número de células, se prepararon las células a 5×10^6 células/ml en medio α -MEM que contenía suero fetal

5 bovino al 10 %. La preparación celular resultante se plantó en 60 pocillos de una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se añadió vitamina D₃ activa (fabricada por Sigma Co., Ltd.) para dar una concentración final de 2×10^{-8} M, y las células se incubaron durante 8 días en un incubador con CO₂. Además, el cultivo sin la adición de vitamina D₃ activa se llevó a cabo del mismo modo. Incidentalmente, el reemplazo del medio y la adición de vitamina D₃ activa se llevó a cabo en los días 3 y 6.

A continuación, se extrajo en ARN total de las células cultivadas en las respectivas condiciones usando un reactivo de extracción de ARN total (ISOGEN, fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al reactivo. El ARN total recogido se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 3. Adquisición de secuencia de marco abierto de lectura (ORF) para Siglec-15 de ratón

10 a) Síntesis de la primera hebra de ADNc

15 A 1 µg del ARN total producido en a) del Ejemplo 2, se añadieron 1 µl de DNasa I 1 U/µl y 1 µl de tampón de DNasa 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), y, después, se enrasó el volumen hasta 10 µl con H₂O. Después de dejar proceder la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió a esta 1 µl de EDTA 25 mM y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 10 minutos. De esta solución, se tomó una alícuota de 8 µl, y se añadieron a esta 1 µl de cebador oligo(dT)₂₀ 50 µM y 1 µl de dNTP 10 mM, y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo. A esta solución, se le añadieron 2 µl de tampón RT 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de ditiotreitól 0,1 M, 1 µl de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.), y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript III (200 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.) y el volumen total se enrasó a 20 µl. Después de dejar proceder la reacción a 50 °C durante 50 minutos, la mezcla se calentó a 85 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo durante 1 minuto. A continuación, la mezcla se almacenó a -20 °C.

b) Reacción de PCR

25 Se sintetizaron los oligonucleótidos que tienen las secuencias: 5'-agaattccac cATGGAGGGG TCCCTCCAAC TC-3' (mSiglec-15- EcoRI kozak-F: SEQ ID NO: 5 en el Listado de secuencias); y 5'-cgccgctcga gTTATTCTC ATGGTGAATG AC-3' (mSiglec-15-XhoI-R: SEQ ID NO: 6 en el Listado de secuencias) como cebadores para amplificar el ADNc de ORF para Siglec-15 de ratón mediante PCR de acuerdo con un procedimiento común. La PCR se llevó a cabo usando esta combinación de cebadores y el ADNc producido en a) y polimerasa de alta fidelidad (fabricada por Invitrogen, Inc.) de acuerdo con un procedimiento común. Las condiciones para el termociclador se ajustaron del siguiente modo: después de calentar a 94 °C durante 2 minutos, se repitió un ciclo de temperatura de "94 °C durante 0,5 minutos, 55 °C durante 0,5 minutos y 68 °C durante 1,5 minutos" 35 veces, seguido de calentamiento a 68 °C durante 5 minutos e incubación a 4 °C.

c) clonación en vector pcDNA3.1(+)

35 La solución de reacción de la PRC obtenida en b) y el vector pcDNA3.1(+) (fabricado por Invitrogen, Inc.) se trataron con enzimas de restricción (EcoRI, XhoI), seguido de purificación en columna, y después, se llevó a cabo una reacción de ligasa de acuerdo con un procedimiento común. Se transformaron *Escherichia coli* DH5a-T1 con el vector resultante y se emplacaron en una placa que contenía ampicilina. A partir de las colonias de *Escherichia coli* obtenidas de este modo, se aislaron *Escherichia coli* que contenían el plásmido de ratón Siglec-15/pcDNA3.1(+).

40 La secuencia completa de nucleótidos del ADNc de ORF insertada en el plásmido obtenido se analizó usando un secuenciador de ADN, y como resultado, se descubrió que era la secuencia representada por SEQ ID NO: 3 en el Listado de secuencias. Esta secuencia nucleotídica fue la misma que una región codificante de ORF de una secuencia predicha registrada en la base de datos GenBank del NCBI como "mouse CD33L3" (número de registro: XM_884636), y además, la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias) codificada por la secuencia nucleotídica fue un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos predicha de CD33L3 de ratón.

45 **Ejemplo 4. Expresión de ARNm para diferenciación de osteoclastos de ratón acompañados de Siglec-15 (análisis de PCR en tiempo real)**

50 a) A 1 µg del ARN total producido en a) o en b) del Ejemplo 2, se añadieron 1 µl de DNasa I 1 U/µl y 1 µl de tampón de DNasa 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), y, después, se enrasó el volumen hasta 10 µl con H₂O. Después de dejar proceder la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió a esta 1 µl de EDTA 25 mM y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 10 minutos. A partir de esta solución, se tomó una alícuota de 8 µl, y se añadieron a esta 1 µl de cebador oligo(dT)₂₀ 50 µM y 1 µl de dNTP 10 mM, y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo. A esta solución, se le añadieron 2 µl de tampón RT 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de ditiotreitól 0,1 M, 1 µl de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.), y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript III (200 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.) y el volumen total se enrasó a 20 µl. Después de dejar proceder la reacción a 50 °C durante 50 minutos, la mezcla se calentó a 85 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo.

Mediante el uso del ADNc monocatenario producido de este modo, se llevó a cabo la PCR en tiempo real con una combinación de los siguientes cebadores y sondas marcadas fluorescentemente (sonda TaqMan, fabricada por Applied Biosystems, Inc.). Condiciones para la PCR en tiempo real:

Cebadores para amplificar Siglec-15 de ratón:

5 5'-tcaggctcag gactccaatt at-3' (TqM-mSiglec-15-F: SEQ ID NO: 7 en el Listado de secuencias) y
5'-ggtctagcct ggtactgtcc tt-3' (TqM-mSiglec-15-R: SEQ ID NO: 8 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar Siglec-15 de ratón:

5'-Fam-atttgagcca gatgagtctt ccaggcca-TAMRA-3' (sonda TqM-mSiglec-15: SEQ ID NO: 9 en el Listado de secuencias)

10 Cebadores para amplificar proteína ribosomal L32 de ratón:

5'-aagaagtcca tcaggcacca gt-3' (TqM-mL32-F: SEQ ID NO: 10 en el Listado de secuencias) y
5'-cttgacattg tggaccagga ac-3' (TqM-mL32-R: SEQ ID NO: 11 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar proteína ribosomal L32 de ratón:

15 5'-Fam-aaaccagag gcattgaca cagggtgc-TAMRA-3' (sonda TqM-mL32: SEQ ID NO: 12 en el Listado de secuencias)

Se llevó a cabo un análisis de PCR en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real (Detector de Secuencia ABI Prism 7700, fabricado por Perkin Elmer Japan, Applied Biosystems Division) en las siguientes condiciones. En la reacción, se usó Mezcla Maestra de PCR universal TaqMan (fabricado por Applied Biosystems, Inc.). En primer lugar, se añadió agua destilada a 25 pmol de cada cebador, 8 ng de ADNc monocatenario y 10 pmol de sonda TaqMan para enrasar el volumen a 25 µl, y después, se añadió a esto 25 µl de Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan, preparando de este modo 50 µl de una solución de reacción. Esta solución de reacción se calentó a 50 °C durante 2 minutos y después se calentó a 95 °C durante 10 minutos, y posteriormente se sometió a 40 ciclos de temperatura de "95 °C durante 0,25 minutos y 60 °C durante 1 minuto", efectuando de este modo el análisis de PCR en tiempo real. Incidentalmente, el nivel de expresión de ARNm para Siglec-15 de ratón se corrigió por el nivel de expresión de ARNm para proteína ribosomal L32.

Como resultado, el nivel de expresión del gen de Siglec-15 aumentó significativamente en ambos casos donde se introdujeron los osteoclastos añadiendo RANKL a RAW 264.7 y donde se indujeron los osteoclastos añadiendo vitamina D₃ activa a células primarias cultivadas derivadas de médula ósea de ratón (Fig. 3).

30 b) Las células RAW 264.7 se prepararon a 4,5 x 10⁴ células/ml en medio α-MEM que contenía suero fetal bovino al 10 %, y la preparación resultante de células se puso en un matraz de 75 cm² a 10 ml/matraz, y, después, y se añadió a este RANKL humana (fabricada por PeproTech Inc.) para dar una concentración final de 40 ng/ml. Las células se cultivaron durante 0, 1, 2, y 3 días en un incubador de CO₂. Además, el cultivo sin la adición de RANKL humana se llevó a cabo del mismo modo.

35 Después de terminar el cultivo, se extrajo en ARN total de las RAP 264.7 cultivadas en las respectivas condiciones usando un reactivo de extracción de ARN total (ISOGEN, fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al reactivo. El ARN total recogido se almacenó a -80 °C.

40 A 1 µg del ARN total recogido de este modo, se añadieron 1 µl de DNasa I 1 U/µl y 1 µl de tampón de DNasa 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), y, después, se enrasó el volumen hasta 10 µl con H₂O. Después de dejar proceder la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió a esta 1 µl de EDTA 25 mM y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 10 minutos. A partir de esta solución, se tomó una alícuota de 8 µl, y se añadieron a esta 1 µl de cebador oligo(dT)₂₀ 50 µM y 1 µl de dNTP 10 mM, y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo. A esta solución, se le añadieron 2 µl de tampón RT 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de ditiotreitól 0,1 M, 1 µl de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.), y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript III (200 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.) y el volumen total se enrasó a 20 µl. Después de dejar proceder la reacción a 50 °C durante 50 minutos, la mezcla se calentó a 85 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo.

Mediante el uso del ADNc monocatenario producido de este modo, se llevó a cabo la PCR en tiempo real con una combinación de los siguientes cebadores y sondas marcadas fluorescentemente (sonda TaqMan, fabricada por Applied Biosystems, Inc.).

50 Condiciones para la PCR en tiempo real:

Cebadores para amplificar catepsina K de ratón:

5'-ggcatctttc cagttttaca gc-3' (TqM-mcatK-F: SEQ ID NO: 13 en el Listado de secuencias) y
5'-gtgtgttcta ttccgagcca ag-3' (TqM-mcatK-R: SEQ ID NO: 14 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar catepsina K de ratón:

55 5'-Fam-atgtgaacca tgcagtgttg gtggtggg-TAMRA-3' (sonda TqM-mcatK: SEQ ID NO: 15 en el Listado de secuencias)

Cebadores para amplificar TRAP de ratón:

5'-gaactcccc agcccttact ac-3' (TqM-mTRAP-F: SEQ ID NO: 16 en el Listado de secuencias) y
5'-aactgctttt tgagccagga c-3' (TqM-mTRAP-R: SEQ ID NO: 17 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar TRAP de ratón:

5 5'-Fam-ttgccagtca gcagcccaaa atgctt-TAMRA-3' (sonda TqM-mTRAP: SEQ ID NO: 18 en el Listado de secuencias)

Cebadores para amplificar Siglec-15 de ratón:

5'-tcaggctcag gactccaatt at-3' (TqM-mSiglec-15-F: SEQ ID NO: 7 en el Listado de secuencias) y
5'-ggctagcct ggtactgtcc ttt-3' (TqM-mSiglec-15-R: SEQ ID NO: 8 en el Listado de secuencias)

10 Sonda TaqMan para detectar Siglec-15 de ratón:

5'-Fam-atttgagcca gatgagtctt ccaggcca-TAMRA-3' (sonda TqM-mSiglec-15: SEQ ID NO: 9 en el Listado de secuencias)

Cebadores para amplificar proteína ribosomal L32 de ratón:

15 5'-aagaagtca tcaggcacca gt-3' (TqM-mL32-F: SEQ ID NO: 10 en el Listado de secuencias) y
5'-cttgacattg tgaccagga ac-3' (TqM-mL32-R: SEQ ID NO: 11 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar proteína ribosomal L32 de ratón:

5'-Fam-aaaccagag gcattgacaa cagggtgc-TAMRA-3' (sonda TqM-mL32: SEQ ID NO: 12 en el Listado de secuencias)

20 Se llevó a cabo un análisis de PCR en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real (Detector de Secuencia ABI Prism 7700, fabricado por Perkin Elmer Japan, Applied Biosystems Division) en las siguientes condiciones. En la reacción, se usó Mezcla Maestra de PCR universal TaqMan (fabricado por Applied Biosystems, Inc.). En primer lugar, se añadió agua destilada a 25 pmol de cada cebador, 8 ng de ADNc monocatenario y 10 pmol de sonda TaqMan para enrasar el volumen a 25 µl, y, después, se añadió a esto 25 µl de Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan, preparando de este modo 50 µl de una solución de reacción. Esta solución de reacción se calentó a 50 °C durante 2 minutos y después se calentó a 95 °C durante 10 minutos, y posteriormente se sometió a 40 ciclos de temperatura de "95 °C durante 0,25 minutos y 60 °C durante 1 minuto", efectuando de este modo el análisis de PCR en tiempo real. Incidentalmente, el nivel de expresión de ARNm para cada gen se corrigió por el nivel de expresión de ARNm para proteína ribosomal L32.

30 Como resultado, los niveles de expresión de los genes de cathepsina K y TRAP que se conocen como moléculas marcadoras para osteoclastos, aumentaron significativamente del día 2 al día 3 después de la adición de RANKL (Figs. 4-A, B). De igual forma, el nivel de expresión del gen de Siglec-15 aumentó también significativamente del día 2 al día 3 después de la adición de RANKL (Fig. 5). A partir de estos resultados, se reveló que la expresión del gen de Siglec-15 aumenta acompañando la diferenciación de osteoblastos, y particularmente, el gen de Siglec-15 se expresa con fuerza en un estado de diferenciación tardío.

35 **Ejemplo 5. Producción de construcción de expresión de proteína Siglec-15 de ratón soluble**

Se representa una secuencia parcial de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de proteína Siglec-15 de ratón por la SEQ ID NO: 19 en el Listado de secuencias y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 20 en el Listado de secuencias. Al utilizar dicha secuencia parcial, puede producirse proteína Siglec-15 de ratón soluble en un sobrenadante de cultivo de una célula animal o similares.

40 a) Amplificación de gen de Siglec-15 de ratón soluble mediante PCR

Se sintetizaron los oligonucleótidos que tienen las secuencias: 5'-ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt caccATGGAG GGGTC- CCTCC AACTC-3' (mSiglec-15-ECD-F: SEQ ID NO: 21 en el Listado de secuencias); y 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagct- gggtc TCCGGGGGCG CCGTGGGAAGC GGAAC-3' (mSiglec-15-ECD-R: SEQ ID NO: 22 en el listado de secuencias) como cebadores para amplificar el ADNc del dominio extracelular de Siglec-15 mediante la PCR de acuerdo con un procedimiento común. Incidentalmente, Estos cebadores se diseñaron como cebadores de amplificación para producir una puerta de entrada al clon, tal como añadiendo una secuencia attB1 a mSiglec-15-ECD-F y una secuencia attB2 a mSiglec-15-ECD-R. La PCR llevó a cabo usando esta combinación de cebadores y el plásmido Siglec-15/pcDNA3.1(+) producido en el Ejemplo 3 como molde de acuerdo con un procedimiento conocido. Las condiciones para el termociclador se ajustaron del siguiente modo: después de calentar a 94 °C durante 2 minutos, se repitió un ciclo de temperatura de "94 °C durante 0,5 minutos, 55 °C durante 0,5 minutos y 68 °C durante 1,5 minutos" 15 veces, seguido de calentamiento a 68 °C durante 5 minutos e incubación a 4 °C.

b) Producción de clon de entrada mediante reacción Gateway BP

Se produjo un clon de entrada en el que se integró el ADNc del dominio extracelular de Siglec-15 mediante la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) empleando, un sistema de recombinación específico de sitio de fago lambda

mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se efectuó una reacción BP usando BP clonasa entre el producto de la PCR que tenía una secuencia attB en ambos extremos producida en a) y pDNOR221 (fabricado por Invitrogen, Inc.) que es un vector donante que tiene una secuencia attP. Usando esta solución de reacción, se transformaron *Escherichia coli* DH10B, y se efectuó una PCR de colonia para los clones resistentes a fármacos, y se confirmó el tamaño de las inserciones. Después, para un clon que se confirmó que tenía una inserción con el tamaño correcto, se efectuó un análisis de la secuencia de ADN total de la inserción. Como resultado, se obtuvo un clon de entrada que es completamente idéntico a la secuencia de ácido nucleico diana (SEQ ID NO: 19 en el Listado de secuencias) que codifica el dominio extracelular de la proteína Siglec-15 de ratón.

c) Producción de clon de expresión mediante reacción Gateway LR

Se produjo un clon de expresión en el que se integró el ADNc del dominio extracelular de Siglec-15 mediante la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) empleando un sistema de recombinación específico de sitio de fago lambda mediante el siguiente procedimiento. El clon de entrada producido en b) contiene una inserción que tiene una secuencia attL en ambos extremos. Se llevó a cabo una reacción LR usando clonasa LR entre este clon de entrada y dos tipos de vectores de destino que tenían una secuencia attR. Incidentalmente, como vector de destino, se usaron dos tipos de vectores de destino: pDONM diseñado de tal forma que el marcador del epítipo V5 y un marcador 6 x His se añaden al extremo C-terminal de la inserción; y pHLgFc diseñado de tal forma que un marcador Fc humano se añade al extremo C-terminal de la inserción. Usando la solución de reacción obtenida por la reacción LR, se transformaron *Escherichia coli* DH10B, y se efectuó una PCR de colonia para los clones resistentes a fármacos obtenidos, y se confirmó el tamaño de las inserciones. Después, para un clon que se confirmó que tenía una inserción con el tamaño correcto, se efectuó un análisis de secuencia de ambos extremos desde el lado de la inserción hasta el lado del vector.

Secuencias de cebadores para el análisis de secuencias

5'-tgcgtgaagg tgcagggcag-3' (mSiglec-15-ECD-seq-upstm: SEQ ID NO: 23 en el Listado de secuencias)

y

5'-cctcgcctgg tcgggtc-3' (mSiglec-15-ECD-seq-dnstm: SEQ ID NO: 24 en el Listado de secuencias)

Como resultado del análisis de secuencias, se obtuvieron clones de expresión (Siglec-15 soluble de ratón/pDONM y Siglec-15 soluble de ratón/pHLgFc) en la que sucedió la recombinación correcta para pDONM y pHLgFc, respectivamente. Transfectando el Siglec-15 soluble de ratón/pDONM en una célula animal o similares, el ARNm que tenía la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 25 en el Listado de secuencias se transcribió y tradujo en una proteína (Siglec-15- His de ratón) que tenía la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 26 en el Listado de secuencias. Además, transfectando el Siglec-15 soluble de ratón/pHLgFc en una célula animal o similares, el ARNm que tenía la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 27 en el Listado de secuencias se transcribió y tradujo en una proteína (Siglec-15-Fc de ratón) que tenía la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28 en el Listado de secuencias.

Ejemplo 6. Examen de tiempo óptimo de cultivo para producir proteína Siglec-15 soluble de ratón

a) Expresión de proteína usando células 293-F

Los dos tipos de plásmidos de expresión (Siglec-15 soluble de ratón/pDONM y Siglec-15 soluble de ratón/pHLgFc) obtenidos en el Ejemplo 5 se prepararon en una cantidad de aproximadamente 100 µg, respectivamente. 50 µg de cada uno de los plásmidos preparados se mezcló con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, Inc.), seguido de esterilización por filtración. Después, 64 µl de un reactivo de transfección 293fectina (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió a esta, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos. Cada una de las muestras obtenidas de este modo se añadió a células FreeStyle 293-F (producidas por Invitrogen, Inc.) cultivadas en un matraz agitado hasta que la densidad celular alcanzó $1,0 \times 10^6$ células/ml x 50 ml en medio de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Invitrogen, Inc.), y se sometió a las células a cultivo rotatorio (125 rotaciones/min) a una concentración de CO₂ del 8,0 % durante 96 horas (4 días) a 37 °C. Una pequeña porción de la solución de cultivo se recogió a intervalos de 24 horas (tiempo de cultivo: 0, 24, 48, 72, 96 horas), y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se considera que en los sobrenadantes de cultivo preparados de este modo, se expresan una proteína en la que se han añadido un marcador de epítipo V5 y un marcador 6 x His al extremo C-terminal del dominio extracelular de Siglec-15 (Siglec-15-His de ratón) y una proteína en la que se ha añadido un marcador Fc humano al extremo C-terminal del dominio extracelular de Siglec-15 de ratón (Siglec-15-Fc de ratón), respectivamente.

b) Cambio en el nivel de expresión en función del tiempo de cultivo para células 293F que expresan Siglec-15-His de ratón.

Usando las muestras de solución de cultivo (tiempo de cultivo: 0, 24, 48, 72, 96 horas) de células 293F que expresaban Siglec-15-His de ratón preparadas en a) y una proteína comercial que contenían un marcador His, osteoprotegerina humana recombinante/his (OPG-Fc-His) (fabricado por R&D systems, Inc.), se analizaron los niveles de expresión mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y transferencia de Western. Es decir, a 5 µl de una muestra obtenida concentrando cada solución de cultivo 20 veces usando Microcon YM-10 (fabricado por Millipore Co., Ltd.) o 5 µl de una solución OPG-Fc-His, se añadió una cantidad equivalente de

solución de tratamiento SDS (Tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 1 mM, SDS al 2,5 %, azul de bromofenol al 0,1 %, y 2-mercaptoetanol al 5 %), y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 10 minutos. 0,8 µl de cada una de las muestras tratadas termalmente se usaron para la electroforesis en SDS-poliacrilamida. Como gel para electroforesis, se usó un gel de gradiente de poli(acrilamida) al 8-25 % (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.), y se llevó a cabo la electroforesis usando un dispositivo PhastSystem (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.). Además, como marcadores de peso molecular, se usaron marcadores ECL DualVue de transferencia de Western (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.). Tras finalizar la electroforesis, se transfirió la proteína en el gel a una membrana de PVDF (Hybond-P, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) usando el kit de transferencia semiseca PhastTransfer (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Esta membrana de PVDF se transfirió en 10 ml de un agente de bloqueo (BlockAce, fabricado por Snow Brand Milk Products, Co., Ltd.) que contenía Tween 20 al 0,1 % y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución de bloqueo, se le añadieron 5 µl de una solución de proteína S-HRP (Marcadores ECL DualVue de transferencia de Western, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y 2 µl de un anticuerpo anti-6-His-HRP (PentaHis. kit HRP Conjugate, fabricado por Qiagen, Inc.) y se agitó suavemente la membrana en la solución a temperatura ambiente durante 1 hora más. Esta membrana de PVDF se lavó 4 veces agitándola suavemente en 50 ml de suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 al 0,01 % durante 5 minutos. Después de lavar, se trató la membrana de PVDF de acuerdo con el protocolo adjunto al kit de detección ECL (reactivos y sistema de análisis ECL de detección por transferencia de Western, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) para revelar el color de la banda de la proteína que contenía His, y el color revelado se detectó usando una minicámara ECL (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y película Polaroid (Polapan 3200B, fabricado por Polaroid, Inc.). Los resultados se muestran en la Fig. 6. A partir de estos resultados, se seleccionó un tiempo de cultivo de 96 horas como tiempo de cultivo para células 293F que produjeron la concentración más alta de una proteína (Siglec-15-His de ratón) que tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa y reacciona con un anticuerpo anti-6-His-HRP.

b) Cambio en el nivel de expresión en función del tiempo de cultivo para células 293F que expresan Siglec-15-Fc de ratón

Usando la solución de cultivo (tiempo de cultivo: 0, 24, 48, 72, 96 horas) de células 293F que expresaban Siglec-15-Fc de ratón preparadas en a) y una IgG humana (fabricado por Sigma Co., Ltd), se analizaron los niveles de expresión mediante electroforesis de SDS-poliacrilamida en condiciones no reductoras y transferencia de Western. Es decir, a 5 µl de cada muestra de solución de cultivo o 5 µl of de una solución de IgG humana, se le añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS, y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 10 minutos. De igual modo al procedimiento descrito en el apartado b) anterior usando 0,8 µl de cada una de las muestras tratadas térmicamente, se efectuaron electroforesis en SDS-poliacrilamida, transferencia a una membrana de PVDF, y bloqueo de la membrana de PVDF. A la membrana de PVDF después de bloquear, se le añadieron 5 µl de una solución de proteína S-HRP (Marcadores ECL DualVue de transferencia de Western, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y 2 µl de un anticuerpo IgG-Fc-HRP anti-humano (IgG anti-humano (específica de Fc) conjugado a peroxidasa, fabricado por Sigma Co., Ltd) y se agitó suavemente la membrana en la solución a temperatura ambiente durante 1 hora más. Después de efectuar el lavado del mismo modo al descrito en el procedimiento del apartado b) anterior, el color revelado de la banda de la proteína que contenía Fc se detectó. Los resultados se muestran en la Fig. 7. A partir de estos resultados, se seleccionó un tiempo de cultivo de 96 horas como tiempo de cultivo para células 293F que produjeron la concentración más alta de una proteína (Siglec-15-Fc de ratón) que tiene un peso molecular de aproximadamente 110 kDa y reacciona con un anticuerpo Fc anti-humano.

Ejemplo 7. Preparación de solución de cultivo a gran escala que contiene proteína Siglec-15 soluble de ratón usando células 293-F

Los dos tipos de plásmidos de expresión (Siglec-15 soluble de ratón/pDONM y Siglec-15 soluble de ratón/pHlgFc) obtenidos en el Ejemplo 5 se prepararon en una cantidad de aproximadamente 5 mg, respectivamente. Incidentalmente, en la purificación de los plásmidos de la *Escherichia coli* cultivada a gran escala, se usó el kit Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep (fabricado por Invitrogen, Inc.). Los plásmidos preparados de este modo se mezclaron con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, inc.), seguido de esterilización por filtración. Después, 10 ml de un reactivo de transfección 293fectina (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió a esta, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Cada una de las muestras obtenidas de este modo se añadió a células FreeStyle 293-F (producidas por Invitrogen, Inc.) cultivadas en matraces Erlenmeyer hasta que la densidad celular alcanzó $1,1 \times 10^6$ células/ml x 5 l (1 l/matraz por 5 matraces) en medio de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Invitrogen, Inc.). Después de someter a las células a cultivo rotatorio (125 rotaciones/min) a una concentración de CO₂ del 8,0 % durante 96 horas (4 días) a 37 °C, se recogió la solución de cultivo y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se considera que en los sobrenadantes de cultivo preparados de este modo, se expresan una proteína en la que se han añadido un marcador de epítipo V5 y un marcador 6 x His al extremo C-terminal del dominio extracelular de Siglec-15 (Siglec-15-His de ratón) y una proteína en la que se ha añadido un marcador Fc humano al extremo C-terminal del dominio extracelular de Siglec-15 de ratón (Siglec-15-Fc de ratón), respectivamente.

Ejemplo 8. Purificación de Siglec-15-His de ratón

a) Columna de cromatografía HisTrap HP

A 2 l de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-His de ratón preparadas en el Ejemplo, se le añadieron 225 ml de tampón 10 x (Tris 500 mM, NaCl 1,5 M, imidazol 200 mM, pH 8,0), y la mezcla resultante se agitó bien y se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Esta solución de cultivo se aplicó a una columna que comprendía tres columnas de 5 ml HisTrap HP (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) conectadas en serie y se trató previamente con un agente eliminador de pirógenos, PyroCLEAN (fabricado por ALerCHEK, Inc.) y se lavó con agua destilada para inyección a un caudal de 2 ml/min. Después de lavar la columna con 60 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 300 mM a un caudal de 1 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en columna con 50 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 300 mM e imidazol 500 mM a un caudal de 1 ml/min. El eluato se fraccionó a 1 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.) a los que se les había añadido anteriormente 10 µl de Tween 20. Después de concentrar aproximadamente 20 ml de una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 14 a 20) que contenían las proteínas a 2,5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), se aplicó el concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que había sido equilibrada previamente con suero salino tamponado con fosfato que contenía Tween 20 al 0,01 % (T-PBS), seguido de elución con T-PBS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por T-PBS.

b) Cromatografía en columna Resource Q

A 3,5 ml de la muestra que se había purificado mediante columna HisTrap HO y cuyo disolvente se había reemplazado por T-PBS, se le añadieron 22,5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1 % y se agitó la mezcla resultante. Después, la mezcla se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 3.000 rpm y se retiró el precipitado. Después de filtrar el sobrenadante resultante a través de un filtro Miller-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el filtrado se aplicó a una columna de 6 ml Resource Q (fabricado por Amersham Biosciences, inc.) que se había equilibrado previamente con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1 % a un caudal de 1 ml/min. A continuación, se lavó la columna con este tampón a un caudal de 1 ml/min y se recogió una fracción de proteína que no había sido adsorbida en la columna. Se eluyó una proteína adsorbida en la columna con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1 % y NaCl 1 M a un caudal de 1 ml/min. Después de concentrar 26,5 ml de la fracción que no estaba adsorbida en la columna a 2,0 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el concentrado se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 3.000 rpm y se retiró el precipitado. Se criopreservó el sobrenadante después de la centrifugación a -80 °C hasta su uso. El procedimiento de purificación anteriormente mencionado (cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q) se realizó dos veces repitiéndolo.

c) Ensayo de detección y pureza de Siglec-15-His de ratón purificada

Usando una muestra preparada por el procedimiento de purificación anteriormente mencionado (cromatografía en columna HisTrap HP y cromatografía en columna Resource Q), se efectuó electroforesis en SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y tinción de plata. Es decir, a 5 µl de cada una de las muestras purificadas mediante las respectivas etapas de purificación, se le añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS, y la mezcla resultante se trató térmicamente a 95 °C durante 10 minutos. 0,3 µl de cada una de las muestras tratadas termalmente se usaron para la electroforesis en SDS-poliacrilamida. El procedimiento de electroforesis se llevó a cabo del mismo modo que en el apartado b) anteriormente mencionado del Ejemplo 6, excepto en que se usaron marcadores de peso molecular Rainbow (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) como marcadores de peso molecular. Tras finalizar la electroforesis, se llevó a cabo la tinción de plata usando el kit PhastGel Silver (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Los resultados se muestran en la Fig. 8. Se demostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (Siglec-15-His de ratón) se purificaba eficazmente y se concentraba en la fracción de proteína que no se adsorbía en la columna Resource Q.

La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones, excepto que se usaron los marcadores ECL DualVue de transferencia de Western (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) como marcadores de peso molecular, y se transfirió la proteína en el gel a una membrana de PVDF (Hybond-P, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) usando el kit de transferencia semiseca PhastTransfer (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Esta membrana de PVDF se agitó suavemente en 10 ml de un agente de bloqueo (BlockAce, fabricado por Snow Brand Milk Products, Co., Ltd.) que contenía Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución de bloqueo, se añadieron 10 µl de proteína S-HRP (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y 10 µl de un anticuerpo anti-V5-HRP (anticuerpo monoclonal contra Pk-TAG-HRP, fabricado por Acris Antibodies GmbH) y se agitó suavemente la membrana en la solución a temperatura ambiente durante 1 hora más. La membrana de PVDF se lavó 4 veces agitándola suavemente en 50 ml de suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 al 0,01 % durante 5 minutos. Después de lavar, se trató la membrana de PVDF de acuerdo con el protocolo adjunto al kit de detección ECL (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) para revelar el color de la banda de la proteína, y el color revelado se detectó usando una minicámara ECL (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y película Polaroid (Polapan 3200B, fabricado por Polaroid, Inc.). Los resultados se muestran en la Fig. 9. También a partir de estos resultados, se pudo confirmar que una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (Siglec-15-His de ratón) y reacciona con anticuerpo anti-VH-HRP se purificaba eficazmente y se concentraba en la fracción de proteína que no se adsorbía en la columna Resource Q.

d) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-His de ratón purificada

Para la Siglec-15-His purificada de ratón (la fracción de proteína que no se adsorbió en la columna Resource Q), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando albúmina de suero bovino como patrón de muestra. Tal como se muestra en la Tabla 1, se obtuvo un total de 1,66 mg de proteína Siglec-15-His de ratón llevando a cabo dos veces el procedimiento de purificación.

Tabla 1

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
1 ^a	0,475	2,0	0,95
2 ^a	0,354	2,0	0,71
Total			1,66

Ejemplo 9. Purificación de Siglec-15-Fc de ratón

a) Cromatografía en columna de proteína A HiTrap

1,8 l de la solución de cultivo de células 293F que contenían Siglec-15-Fc de ratón preparada en el Ejemplo 7 se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), y, después, el filtrado se aplicó a una columna de 5 ml de proteína A HiTrap (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) a un caudal de 5 ml/min. Después de lavar la columna con D-PBS a un caudal de 5 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 50 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) a un caudal de 5 ml/min. El eluato se fraccionó a 5 ml por fracción en tubos minisorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 1,3 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Después de concentrar una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 1 y 2) en la que se detectó proteínas a 2,5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), se aplicó el concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino fisiológico Otsuka para inyección (TO-SS, fabricado por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. Esta muestra se crioconservó a -80 °C hasta su uso. Usando 2,9 l de una solución de cultivo de células 293F, se llevó a cabo el mismo procedimiento de purificación una y otra vez repitiéndolo.

b) Ensayo de detección y pureza de Siglec-15-Fc de ratón purificada

Usando una muestra preparada por el procedimiento de purificación anteriormente mencionado, se efectuó electroforesis en SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y tinción de plata. Es decir, a 5 ml de cada una de las muestras purificadas mediante las respectivas etapas de purificación, se le añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS, y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 10 minutos. Se usaron 0,3 µl de una muestra obtenida diluyendo cada una de las muestras tratadas termalmente a 1/300 o 1/900 con una concentración media de la solución de tratamiento de SDS para la electroforesis en gel de poli(acrilamida). La electroforesis y la tinción de plata se llevaron a cabo del mismo modo que en el ensayo de pureza de Siglec-15-His de ratón descrito en c) del Ejemplo 8. Los resultados de muestran en la Figura 10 junto con los resultados del examen preliminar de las condiciones de purificación a pequeña escala (el pH de la solución de cultivo aplicada fue 8,9 o 7,0). Se demostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 55 kDa (Siglec-15-Fc de ratón) se purificaba eficazmente y se concentraba en la fracción de proteína eluida de la columna de proteína A HiTrap.

c) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-Fc de ratón purificada

Para Siglec-15-Fc de ratón purificada (la fracción de proteína eluida de la columna de desalado PD-10), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando albúmina de suero bovino como patrón de muestra. Tal como se muestra en la Tabla 2, se obtuvo un total de 92 mg de proteína Siglec-15-Fc de ratón llevando a cabo dos veces el procedimiento de purificación.

Tabla 2

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
1 ^a	8,0	3,5	28
2 ^a	18,5	3,5	64
Total			92

Ejemplo 10. Producción de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ratón (inmunización de conejo)

a) Preparación del antígeno

La proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el Ejemplo 9 se preparó a 100 µg/0,5 ml, y se añadió a esta una cantidad equivalente de un adyuvante y se produjo una emulsión usando una jeringa de vidrio. Como adyuvante, se usó adyuvante incompleto de Freund (FCA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) solo para la primera inmunización, y adyuvante incompleto de Freund (FICA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) para la segunda inmunización y las posteriores.

b) Inmunización de conejo

Tres conejos (conejos japoneses hembra de color blanco con un peso corporal de 3 kg) se usaron como animales inmunizados. Incidentalmente, se recogió sangre antes de la inmunización, y se obtuvo 1 ml de suero preinmune por cada conejo. La emulsión obtenida en a) se inyectó por vía subcutánea e intradérmicamente usando una agua de inyección del calibre 27 a razón de 1 ml/conejo. La inmunización se llevó a cabo un total de 8 veces cada 14 días después de la primera inmunización. La sangre completa se recogió después de 7 días desde la fecha de la 8ª inmunización, y se obtuvieron de 76 a 79 ml de antisuero por conejo. Los títulos de anticuerpo en el suero preinmune y el antisuero se confirmaron mediante un procedimiento ELISA usando un antígeno inmovilizado. Como resultado, se confirmó un aumento en el título de anticuerpo en los tres conejos. El antisuero se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 11. Purificación de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón

a) Cromatografía en columna de proteína A HiTrap

A 20 ml de cada uno de los tres lotes de antisuero de conejo preparados en el Ejemplo 10, se le añadió 20 ml de PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) y se mezcló, y la mezcla resultante se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Después, el filtrado se aplicó a una columna de 5 ml de proteína A HiTrap (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con D-PBS a un caudal de 2 ml/min. Después de lavar la columna con 37,5 ml de D-PBS a un caudal de 2,5 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 50 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) a un caudal de 2,5 ml/min. El eluato se fraccionó a 2,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 0,65 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Después de concentrar aproximadamente 10 ml de una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 2 a 5) que contenían las proteínas a 2,5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), se aplicó el concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino Otsuka para inyección (TOSS) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. La muestra preparada de este modo se criopreservó a -80 °C hasta su uso.

b) Ensayo de detección y pureza de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón

Usando las muestras (tres lotes, N° 1, 2, y 3) preparadas mediante el procedimiento de purificación descrito en el apartado a) anterior, se efectuó electroforesis en SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y tinción de plata. Es decir, a 5 µl de cada una de las muestras purificadas mediante las respectivas etapas de purificación, una cantidad equivalente de solución de tratamiento SDS (Tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 1 mM, SDS al 2,5 %, azul de bromofenol al 0,1 %, y 2-mercaptoetanol al 5 %), y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 10 minutos. 0,3 µl de una muestra obtenida diluyendo cada una de las muestras tratadas térmicamente a 1/100, 1/300 o 1/900 con una concentración media de la solución de tratamiento de SDS se usaron para la electroforesis de SDS-poliacrilamida. La electroforesis y la tinción de plata se llevaron a cabo del mismo modo que en el ensayo de pureza de Siglec-15-His de ratón descrito en c) del Ejemplo 8. Se demostró que una proteína IgG compuesta de una cadena pesada que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa y una cadena ligera que tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa se purificó eficazmente y se concentró en la fracción de proteína que se eluyó de la columna de desalado PD-10.

c) Medición de la concentración de proteína de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado

Para el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado (la fracción de proteína eluida de la columna de desalado PD-10), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando IgG bovina como patrón de muestra. Tal como se muestra en la Tabla 3, se pudieron purificar de 100 a 170 mg del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en cada uno de los lotes con N° 1 a 3.

Tabla 3

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
Nº 1	39,9	3,5	140
Nº 2	28,8	3,5	100
Nº 3	487	3,5	170

d) Examen de la reactividad de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado con el dominio extracelular de Siglec-15

Se llevó a cabo un ensayo para confirmar que el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón preparado en el apartado a) anterior se une no solo a un marcador Fc, sino también al dominio extracelular de proteína Siglec-15. A 5 µl de la muestra purificada de Siglec-15-His de ratón (Ejemplo 8) o 5 µl de la muestra purificada de Siglec-15-Fc, se añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento SDS (con o sin adición de 2-mercaptoetanol al 5 %), y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 10 minutos. 0,3 µl de cada una de las muestras tratadas termalmente se usaron para la electroforesis en SDS-poliacrilamida, y se llevaron a cabo la electroforesis y la transferencia a una membrana de PVDF del mismo modo que en el procedimiento descrito en apartado b) del Ejemplo 6 anterior. Esta membrana de PVDF se agitó suavemente en 8 ml de un agente de bloqueo (BlockAce, fabricado por Snow Brand Milk Products, Co., Ltd.) que contenía Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución de bloqueo, se le añadieron 1,6 µl del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón Nº 1 (Tabla 3), y la membrana de PVDF se agitó suavemente la membrana en la solución a temperatura ambiente durante 1 hora más. Esta membrana de PVDF se lavó 4 veces agitándola suavemente en 50 ml de PBS que contenía Tween 20 al 0,01 % durante 5 minutos. La membrana de PVD lavada se inmersió en 8 ml de agente de bloqueo diluyente de anticuerpo ECL Advance (kit de detección de transferencia de Western ECL Advance, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.), se IgG-HRP anti-conejo (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) para dar una concentración final de 2 x 1/200.000 M. Después, se le añadieron 0,8 µl de una solución de proteína S-HRP (Marcadores ECL DualVue de transferencia de Western, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) se añadió a esta, y la membrana se agitó suavemente la membrana en la solución a temperatura ambiente durante 1 hora más. Esta membrana de PVDF se lavó 4 veces agitándola suavemente en 50 ml de PBS que contenía Tween 20 al 0,01 % durante 5 minutos. Después de lavar, se trató la membrana de PVDF de acuerdo con el protocolo adjunto al kit de detección de transferencia de Western ECL Advance (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.), y el color revelado de la banda de proteína se detectó usando una minicámara ECL (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y película Polaroid (Polapan 3200B, fabricado, por Polaroid, Inc.). Los resultados se muestran en la Fig. 11. A partir de estos resultados, se demostró que el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón también se une a Siglec-15-His de ratón, y se pudo confirmar que el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón se une no solo a un marcador Fc, sino también al dominio extracelular de la proteína Siglec-15. Se efectuó el mismo ensayo repitiéndolo, y se confirmó que los anticuerpos policlonales anti-Siglec-15 de ratón Nº 2 y Nº 3 también se unen a Siglec-15-His de ratón.

Ejemplo 12. Purificación de IgG de conejo preinmune

Se había recogido sangre previamente de cada uno de los tres conejos usados en el Ejemplo 10, antes de iniciar la inmunización con Siglec-15-Fc de ratón, y se preparó suero preinmune a partir de esta. Después de mezclar entre sí una alícuota de 0,8 ml de cada una de estas muestras de suero, se le añadió 2,4 ml de PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió a esta, y la mezcla resultante se filtró a través de un filtro Millex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Después, la muestra resultante se aplicó a una columna de 5 ml de proteína A HiTrap (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con D-PBS a un caudal de 1 ml/min. Después de lavar la columna con 50 ml de D-PBS a un caudal de 2,5 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 50 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) a un caudal de 2,5 ml/min. El eluato se fraccionó a 2,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 0,65 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Después de concentrar una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 2 a 4) que contenían las proteínas a 2,5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), se aplicó el concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino Otsuka para inyección (TO-SS) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. La muestra de IgG preinmune de conejo purificada de este modo se sometió a electroforesis de poli(acrilamida) y tinción de plata mediante el procedimiento descrito en el apartado c) anterior del Ejemplo 8 para confirmar que la proteína de IgG estaba suficientemente purificada, y después se midió la concentración de proteína. La muestra purificada de este modo se criopreservó a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 13. Preparación de columna de afinidad que tiene Siglec-15-Fc de ratón inmovilizado sobre este

Después de reemplazar 0,54 ml del disolvente de la solución de Siglec-15-Fc de ratón de 18,5 mg/ml descrita en el

Ejemplo 9 (un total de 10 mg de proteína) con un tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) usando una columna de desalado PD-10, la solución resultante se concentró a 1 ml usando un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra 4 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Después se reemplaza el isopropanol en una columna HiTrap activada con NHS (1 ml, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) con ácido clorhídrico 1 mM, se inyectó 1 ml de un tampón de acoplamiento que contenía Siglec-15-Fc de ratón 10 mg/ml en la columna usando una jeringa. Después de dejar proceder la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, para inactivar los grupos excesivamente activos, se inyectaron 6 ml de un tampón de bloqueo (tampón de etanolamina que contiene NaCl 0,5 M, pH 8,3), 6 ml de un tampón de lavado (tampón de acetato de sodio que contiene NaCl 0,5 M, pH 4,0), y 6 ml del tampón de bloqueo secuencialmente de acuerdo con el protocolo de Amersham Biosciences, Inc., y, después, la columna se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, 6 ml del tampón de lavado, 6 ml del tampón de bloqueo, y 6 ml del tampón de lavado se inyectaron en la columna secuencialmente de nuevo, y finalmente, se reemplazó el tampón en la columna con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 1 M y Tween 20 al 0,01 %. Esta muestra se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 14. Purificación de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón con columna de afinidad

15 a) Cromatografía de afinidad en columna

A 2 ml de cada uno de los anticuerpos policlonales anti-Siglec-15 de ratón N° 1, 2 y 3 preparados en el Ejemplo 11, se le añadieron 8 ml de un tampón de aplicación (tampón Tris-HCl 10 mM que contiene NaCl 0,15 M, pH 7,2), y la mezcla resultantes se aplicó a la columna de afinidad (Ejemplo 13) que se había equilibrado anteriormente con el Tampón de aplicación a un caudal del 0,25 ml/min. Después de lavar la columna con 5 ml del tampón de aplicación a un caudal de 0,25 ml/min, en primer lugar, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 5 ml de tampón de clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 2,7) que contenía NaCl 0,5 M a un caudal de 0,25 ml/min, y posteriormente, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 5 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0) que contenía NaCl 0,5 M a un caudal de 0,25 ml/min. El cromatograma del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón N° 3 purificado con la columna de afinidad se muestra en la Fig. 12. El eluato se fraccionó a 0,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 16 µl de Tris 1 M a 0,5 ml de cada fracción eluida con el tampón de clorhidrato de glicina, y se añadieron 150 µl de Tris 1 M a 0,5 ml de cada fracción eluida con el tampón de citrato de sodio para neutralizar el eluido. La mayor parte del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón se eluyó con el tampón de clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 2,7) que contenía NaCl 0,5. Aproximadamente 2,5 ml de una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 3 a 7) en la que la proteína IgG eluida con el tampón de clorhidrato de glicina se detectó para cada lote, se aplicó a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino Otsuka para inyección (TO-SS) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. Con respecto a las fracciones de proteína IgG (fracciones 16 a 19) eluidas con el tampón de citrato de sodio en una cantidad de aproximadamente 2,5 ml, las fracciones para los tres lotes se combinaron y la solución resultante se concentró a 2,5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra 4 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Después, se aplicó el concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con TO-SS, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra (citrato-E) cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. Las muestras preparadas de este modo se criopreservaron a -80 °C hasta su uso.

40 b) Medición de la concentración de proteína de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad

Para las muestras del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado (las fracciones de proteína eluida de la columna de desalado PD-10), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando IgG bovina como patrón de muestra. Las muestras en las que la concentración de proteína se midió se prepararon de tal forma que la concentración del anticuerpo era 15 o 50 µg/ml, y se sometieron a electroforesis y tinción de plata del mismo modo que en b) del Ejemplo 11. Los resultados se muestran en la Fig. 13. Se demostró que una proteína IgG compuesta de una cadena pesada que tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa y una cadena ligera que tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa se purificó eficazmente y se concentró en las fracciones eluidas de la columna de desalado PD-10. Tal como se muestra en la Tabla 4, de aproximadamente 2,3 a 7,4 mg de un anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad pudieron prepararse en cada uno de los lotes N° 1 a 3 como fracción de Citrato-E.

Tabla 4

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
N° 1	0,661	3,5	2,31
N° 2	1,715	3,5	6,00
N° 3	2,112	3,5	7,39
Citrato-E	1,155	3,5	4,04

Ejemplo 15. Purificación de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad con columna de filtración en gel

a) Cromatografía en columna Superose 6

5 Para eliminar por completo endotoxinas e impurezas de bajo peso molecular del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad preparado en el Ejemplo 14, se llevó a cabo una purificación adicional con columna de filtración en gel. 1 ml de cada uno de los anticuerpos policlonales anti-Siglec-15 de ratón purificados por afinidad N° 2 y 3 se aplicaron a una columna Superose 6 HR 10/30 (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que se trató previamente con un agente eliminador de pirógenos, PyroCLEAN (fabricado por ALerCHEK, Inc.) y se equilibró con PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con D-PBS que contenía Tween 20 al 0,01 % a un caudal de 0,4 ml/min. Los cromatogramas de los mismos se muestran en la Figura 14. El eluato se fraccionó a 0,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), y se obtuvieron 2,0 ml de una muestra de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificada por filtración en gel (fracciones 28 a 31). La muestra preparada de este modo se criopreservó a -80 °C hasta su uso.

b) Medida de la concentración de proteína de IgG de conejo purificada con columna de filtración en gel

15 también para la muestra de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón purificado por filtración en gel (las fracciones de proteína eluidas de la columna Superose 6), se midió la concentración de proteína. Tal como se muestra en la Tabla 5, el anticuerpo policlonal anti-Siglec-14 purificado por filtración en una cantidad de 2,25 mg y 3,34 mg pudo prepararse en los lotes N° 2 y 3, respectivamente.

Tabla 5

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
N° 2	0,643	3,5	2,25
N° 3	0,955	3,5	3,34

20 **Ejemplo 16. Preparación de células no adherentes de médula ósea**

Se reseccionaron el fémur y la tibia de un ratón ddY macho de 5 a 8 semanas de edad y se eliminaron los tejidos blandos. Se cortaron ambos extremos del fémur o la tibia, y se inyectó D-PBS usando una jeringa con una aguja de inyección del calibre 25 para expulsar las células de médula ósea, que se recogieron en un tubo para centrifugación. La centrifugación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 minutos a 100 g, y se retiró el sobrenadante. Al precipitado celular se le añadió 1 ml de un tampón hemolítico (tampón de lisis de glóbulos rojos, fabricado por Sigma Co., Ltd.) para suspenderlo, y la suspensión resultante se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron a esto 20 ml de D-PBS, y se centrifugó la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos a 100 g, y se retiró el sobrenadante. Al precipitado celular se le añadieron 10 ml de medio MEM- α (fabricado por Invitrogen, Inc.) que contenía 5 ng/ml de M-CSF (fabricado por R&D systems, Inc.) y suero fetal bovino al 10 % (FBS) para suspenderlo. Después, se hizo pasar la suspensión resultante a través de un filtro celular (Nylon, 40 μ m, fabricado por BD Falcon) para retirar los agregados. Las células resultantes se transfirieron a un matraz T de 75 cm² (para su uso con células adherentes) y se cultivaron durante toda la noche en un incubador de CO₂. Después de cultivar durante toda la noche, las células que no se adhirieron al matraz T se recuperaron y usaron como células de médula ósea no adherentes.

35 **Ejemplo 17. Efecto de la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la diferenciación en osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón (estimulación con RANKL)**

Mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-Siglec-15 de ratón producidos en los Ejemplos 14 y 15, se estudió un efecto en la diferenciación en osteoclastos de células no adherentes de médula ósea. Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas mediante el procedimiento anteriormente mencionado en el Ejemplo 16 se prepararon a 1,5 x 10⁵ células/ml en medio α -MEM que contenía FBS al 10 % y M-CSF a 10 ng/ml (fabricado por R&D Systems, Inc.), y la preparación de células resultante se sembró en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una cantidad de 200 μ l y las células se cultivaron durante 2 días en un incubador de CO₂. La solución de cultivo usada en la placa de 96 pocillos se retiró, y se añadieron 100 μ l de medio MEM- α que contenía FBS al 10 % al que se le había añadido RANKL (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente, a cada pocillo. A la solución de cultivo, se le añadieron anticuerpo N° 3 purificado por afinidad, anticuerpo de citrato-E, anticuerpo N° 2 purificado por filtración en gel, anticuerpo N° 3 purificado por filtración en gel, IgG de conejo preinmune (producido en los Ejemplos 12, 14, y 15), o IgG de control de conejo comercial (IgG de conejo no inmune CLRB00, fabricado por Cedarlane Laboratories Ltd.) a una concentración de 30 a 1,000 ng/ml, y las células se incubaron durante 3 días más en un incubador con CO₂. Después de terminar el cultivo, se midió la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados mediante el siguiente procedimiento. La solución de cultivo en cada pocillo de la placa de 96 pocillos se retiró mediante succión, y se añadieron 50 μ l de tampón de citrato de sodio 50 mM (pH 6,1) que contenía Triton X-100 al 1 % a cada pocillo.

Después, se agitó la placa durante 5 minutos en un agitador de placas para lisar las células. A cada pocillo, se le añadieron 50 µl de una solución de sustrato (tampón de citrato de sodio 50 mM (pH 6,1) que contenía fosfato de p-nitrofenilo a 5 mg/ml y tartrato de sodio al 0,46 %), y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadieron 50 µl de una solución de hidróxido de sodio 1 N a cada pocillo de la placa de 96 pocillos para detener la reacción enzimática. Después de detener la reacción enzimática, se midió la absorbancia de cada pocillo a 405 nm, y se usó la medida como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en las Figs. 15 y 16. No se observó una inhibición significativa de TRAP en los casos de la IgG de conejo preinmune y de la IgG de control de conejo comercial. Por otra parte, se observó una inhibición significativa de la actividad de TRAP en los casos del anticuerpo N° 3 purificado por afinidad a 30 ng/ml o mayor y de anticuerpo de Citrato E a aproximadamente 130 ng/ml o mayor (Fig. 15). También en el caso del anticuerpo N° 3 purificado por filtración en gel, se observó una inhibición significativa de TRAP a 30 ng/ml o más. Además, se observó una actividad inhibidora más potente en el caso del anticuerpo N° 3 purificado por filtración en gel que en el caso del anticuerpo N° 2 purificado por filtración en gel (Fig. 16). Ya que se observó la actividad de inhibir la formación de osteoclastos en el anticuerpo purificado por filtración en gel, se demostró que la actividad de inhibir la formación de osteoclastos observada en el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón no se atribuye a endotoxinas o impurezas de bajo peso molecular en la muestra de anticuerpo, sino que se atribuye a la actividad de la molécula de anticuerpo en sí misma. A partir de los resultados anteriores, se demostró que el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón tiene un efecto inhibitor potente en la formación de osteoclastos (diferenciación y maduración de osteoclastos).

Ejemplo 18. Neutralización por antígeno de la inhibición de la diferenciación de osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón mediante la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón (estimulación con RANKL)

Se confirmó que el efecto del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón depende de la unión del mismo a un antígeno añadiendo previamente el antígeno al anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón para formar un inmunoprecipitado. A 10 µg/ml del anticuerpo N° 3 purificado por afinidad producido en el Ejemplo 14, se le añadió el Siglec-15-His o Siglec-15-Fc de ratón preparado en el Ejemplo 8 o 9 a una concentración de 10, 30, 100 o 300 µg/ml, y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 2 horas. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos mediante Chibitan. y el sobrenadante resultante se esterilizó por filtración a través de un filtro Millex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas por el método en el Ejemplo 16 se sembraron en una placa de 96 pocillos a 200 µl/pocillo, y las células se incubaron durante 2 días en un incubador con CO₂. La solución de cultivo usada en la placa de 96 pocillos se retiró, y se añadieron 100 µl de medio MEM-α que contenía FBS al 10 % al que se le había añadido RANKL (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente, a cada pocillo. A la solución de cultivo, se le añadió cada una de las muestras de ensayo preparadas en lo anterior a 1/200 (v/v), y las células se incubaron durante 3 días más en un incubador con CO₂. Después de terminar el cultivo, se midió la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 17. Los resultados se muestran en la Fig. 17. En ambos casos donde el anticuerpo se neutralizó mediante Siglec-15-His y donde el anticuerpo se neutralizó mediante Siglec-15-Fc, se neutralizó y perdió el efecto del anticuerpo. Estos resultados demuestran que el efecto inhibitor del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la formación de osteoclastos se debe a la unión de los mismos a la proteína Siglec-15 y al bloqueo de su función.

Ejemplo 19. Efecto de la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la diferenciación en osteoclastos de células no adherentes de médula ósea de ratón (estimulación con TNF)

Usando el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón, se estudió un efecto en la diferenciación en osteoclastos de células no adherentes de médula ósea mediante estimulación con TNF. Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas mediante el procedimiento en el Ejemplo 16 se prepararon a 1 x 10⁵ células/ml en medio α-MEM que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10 %, 10 ng/ml de M-CSF y 2 ng/ml de TGF-β (fabricado por R&D systems, Inc.), y la preparación de células resultante se sembró en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una cantidad de 200 µl y las células se cultivaron durante 2 días en un incubador de CO₂. La solución de cultivo usada en la placa de 96 pocillos se retiró, y se añadieron 100 µl de medio MEM-α que contenía FBS al 10 % al que se le había añadido TNF-α humano recombinante (fabricado por R&D Systems, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 30 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente, a cada pocillo. A la solución de cultivo, se le añadió la IgG preinmune producida en el Ejemplo 12 o el anticuerpo N° 3 anti-Siglec-15 de ratón purificado por filtración producido en el Ejemplo 15 a una concentración de 30 a 1.000 ng/ml, y las células se incubaron durante 3 días más en un incubador con CO₂. Al mismo tiempo, también se preparó un pocillo en el que las células se cultivaron añadiendo OCIF/OPG humano recombinante preparado mediante el procedimiento descrito en la descripción de la Patente N° WO 96/26217 a una concentración de desde 3 hasta 100 ng/ml. Después de terminar el cultivo, se midió la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 17. Los resultados se muestran en la Fig. 18. En los casos de la IgG preinmune y de OCIF/OPG, no se observó una inhibición significativa de TRAP. Por otra parte, en el caso del anticuerpo N° 3 anti-Siglec-15 de ratón purificado por filtración en gel, se observó una inhibición de aproximadamente el 50 % de la actividad de TRAP a una concentración de 250 ng/ml o mayor. A partir de estos resultados, se demostró que el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón también puede inhibir la formación de osteoclastos inducida por TNF (maduración y diferenciación de osteoclastos) que no puede inhibirse por OCIF/OPG.

Para cada pocillo de una placa de 96 pocillos preparada llevando a cabo el cultivo del mismo modo descrito anteriormente, se llevó a cabo la tinción con TRAP usando un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (fabricado por Sigma Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit, y se observó la formación de osteoclastos multinucleados positivos a TRAP. Como resultado, la formación de osteoclastos gigantes multinucleados positivos a TRAP se inhibió por la adición del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón (Fig. 19). Ya que se formaron osteoclastos mononucleados incluso en el caso donde se añadió anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón, se demostró que el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón inhibe fuertemente el proceso de fusión celular en la diferenciación de osteoclastos y maduración inducida por TNF.

Ejemplo 20. Efecto de la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la diferenciación en osteoclastos de células cultivadas primarias derivadas de médula ósea de ratón (actividad de TRAP)

Se eutanasió un ratón ddY macho de 7 semanas mediante dislocación cervical con anestesia de éter y se reseccionaron el fémur y la tibia. Después de retirar los tejidos blandos, se cortaron ambos extremos del fémur o la tibia. Después, se inyectó medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 % en la médula ósea usando una jeringa con una aguja para inyección del calibre 25, y se recogieron las células de la médula ósea. Después de contar el número de células, se prepararon las células a 5×10^6 células/ml en medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 %. La preparación celular resultante se plantó en una placa de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo, y se añadió vitamina D₃ activa (fabricada por Sigma Co., Ltd.) para dar una concentración final de 2×10^{-8} M. A este sobrenadante de cultivo, se le añadió el anticuerpo N° 3 anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad producido en el Ejemplo 14 o la IgG de conejo preinmune producida en el Ejemplo 12 para dar una concentración final de 4,57, 13,7, 41,2, 123, 370, 1.111, 3.333, o 10.000 ng/ml, y las células se incubaron durante 8 días en un incubador con CO₂. Incidentalmente, el reemplazo del medio y la adición de una sustancia de ensayo se llevó a cabo en los días 3 y 6. El sobrenadante de cultivo se retiró en el día 8 de cultivo, y se añadió formalina neutra al 10 % para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y se añadieron una solución de sustrato de TRAP (fosfato de p-nitrofenilo 15 mM, tartrato de sodio 50 mM, tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) a la mezcla a 100 μ l/pocillo, y se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se añadió a esto NaOH 1 N a 50 μ l/pocillo para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 405 nm usando un lector de microplacas, evaluando de este modo la actividad de TRAP en las células. Como resultado, la actividad de TRAP se inhibió dependiendo de la dosis del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón (Fig. 20-A). Por otra parte, en el caso donde se añadió la IgG preinmune, no se observó una disminución en la actividad de TRAP (Fig. 20-B). De este modo, se reveló que la formación de osteoclastos positivos a TRAP a partir de células de médula ósea de ratón inducida por vitamina D₃ activa se inhibe por la unión específica del anticuerpo a Siglec-15.

Ejemplo 21. Efecto de la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la fusión celular de osteoclastos a partir de células cultivadas primarias derivadas de médula ósea de ratón (tinción de TRAP)

Se eutanasió un ratón ddY macho de 7 semanas mediante dislocación cervical con anestesia de éter y se reseccionaron el fémur y la tibia. Después de retirar los tejidos blandos, se cortaron ambos extremos del fémur o la tibia. Después, se inyectó medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 % en la médula ósea usando una jeringa con una aguja para inyección del calibre 25, y se recogieron las células de la médula ósea. Después de contar el número de células, se prepararon las células a 5×10^6 células/ml en medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 %. La preparación celular resultante se plantó en una placa de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo. Añadiendo vitamina D₃ activa (fabricada por Sigma Co., Ltd.) a una concentración final de 2×10^{-8} M o RANKL (fabricado por PeproTech Inc.) a una concentración final de 80 ng/ml a este sobrenadante de cultivo como factor inductor de la diferenciación en osteoclastos, se prepararon los sobrenadantes de cultivo. A cada uno de estos sobrenadantes de cultivo se le añadió el anticuerpo N° 3 anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad producido en el Ejemplo 14 para dar una concentración final de 370 o 3.333 ng/ml, o se añadió la IgG de conejo preinmune producida en el Ejemplo 12 para dar una concentración final de 3.333 ng/ml. En el sistema de cultivo de inducir la diferenciación en osteoclastos por vitamina D₃ activa, las células se incubaron durante 8 días en un incubador con CO₂, y en el sistema de inducir la diferenciación por RANKL humana, las células se incubaron durante 6 días en un incubador con CO₂. Incidentalmente, el reemplazo del medio y la adición de una sustancia de ensayo se llevó a cabo en los días 3 y 6. Después del cultivo, se retiró el sobrenadante, y se añadió formalina neutra al 10 % para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y se añadió una solución de tinción de TRAP (fosfato AS-MX de naftol 0,27 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), violeta rojo rápido en sal LB 1,6 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), dimetilformamida al 1 %, tartrato de sodio 50 mM, 0. tampón acetato de sodio 1 M (pH 5,0) a 100 μ l/pocillo, y se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y, después, se observó por microscopía. Como resultado, en el caso donde se indujo la diferenciación en osteoclastos por vitamina D₃ activa (Fig. 21) o RANKL humana (Fig. 22), se inhibió la fusión celular de osteoclastos por la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón, y no se observó la formación de osteoclastos gigantes. Por otra parte, en el caso donde se añadió la IgG preinmune, dicha inhibición de la fusión celular de osteoclastos no se observó. De este modo, se reveló que la multinucleación y la fusión celular de osteoclastos positivos a TRAP a partir de células de médula ósea de ratón inducida por vitamina D₃ activa o RANKL humana se inhiben por la unión específica del anticuerpo a Siglec-15.

Ejemplo 22. Efecto de la adición de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la fusión celular de osteoclastos a partir de RAW 264.7 (tinción de TRAP)

a) Producción de anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón adsorbido a proteína antigénica

5 Se prepararon cinco soluciones mezcladas (A a E) usando D-PBS (fabricado por Invitrogen, Inc.) que contenían Tween 20 al 0,01 %, de tal forma que las concentraciones respectivas del anticuerpo N° 3 anti-Siglec-15 de ratón purificado por afinidad producido en el Ejemplo 14, la proteína Siglec-15-His de ratón y la proteína Siglec-15-Fc de ratón producidas en los Ejemplos 8 y 9 fueron tal como se muestra en la Tabla 6. Estas soluciones mezcladas se incubaron a 37 °C durante 2 horas y se centrifugaron a 20.000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes resultantes se usaron como muestras de ensayo a una concentración de 20 veces.

10

Tabla 6

	A	B	C	D	E
anticuerpo anti-Siglec-15	20	20	20	20	20
Siglec-15-Fc	0	20	200	0	0
Siglec-15-His	0	0	0	20	200
(Unidad: µg/ml)					

b) Evaluación usando RAW 264.7 por tinción de TRAP

15 Las células RAW 264.7 se prepararon a $2,25 \times 10^4$ células/ml en medio α -MEM que contenía suero fetal bovino al 10 %, y la preparación celular resultante se plantó en una placa de 96 pocillos a 200 µl/pocillo, y se añadió a esta RANKL humana (fabricada por PeptroTech Inc.) para dar una concentración final de 40 ng/ml. A este sobrenadante de cultivo, se le añadieron cada una de las muestras de ensayo A a E producidas en a) a una concentración final de 1/20, y las células se incubaron durante 3 días en un incubador con CO₂. Después del cultivo, se retiró el sobrenadante, y se añadió formalina neutra al 10 % para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y se añadió una solución de tinción de TRAP (fosfato AS-MX de naftol 0,27 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), violeta rojo rápido en sal LB 1,6 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), dimetilformamida al 1 %, tartrato de sodio 50 mM, tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) a 100 µl/pocillo, y se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y, después, se observó por microscopía. Como resultado, al añadir el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón, se inhibió significativamente la fusión celular de osteoclastos (Fig. 23-A) en comparación con el caso del control (Fig. 23-0) sin la adición de la muestra de ensayo. Sin embargo, al absorber el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la proteína Siglec-15-Fc de ratón usada como agente inmunizante, el efecto inhibitor del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la fusión celular de osteoclastos se anuló (Figs. 23-B, C). Además, también al absorber el anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la proteína Siglec-15-His, el efecto inhibitor del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ratón en la fusión celular de osteoclastos se anuló del mismo modo (Figs. 23-D, E). A partir de estos resultados, se reveló que la multinucleación y la fusión celular de osteoclastos positivos a TRAP a partir de células RAW 264.7 inducidas por RANKL humana se inhiben por la unión específica del anticuerpo a Siglec-15. Incidentalmente, los resultados representados por los símbolos A a E en la Figura 23 corresponden a las muestras de ensayo A a E en la Tabla 6, respectivamente.

30

Ejemplo 23. Establecimiento de hibridoma productor de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón

35 a) Preparación del antígeno

La proteína Siglec-15-His de ratón producida en el Ejemplo 8 se preparó a 100 µg/0,5 ml, y se añadió a esta una cantidad equivalente de un adyuvante y se produjo una emulsión usando una jeringa de vidrio. Como adyuvante, se usó adyuvante incompleto de Freund (FCA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) solo para la primera inmunización, y adyuvante incompleto de Freund (FICA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) para la segunda inmunización y las posteriores.

40

b) Inmunización de rata

45 Cuatro ratas (Wistar, hembras; 6 semanas de edad, compradas a CLEA Japan, Inc.) se usaron como animales inmunizados. La emulsión obtenida en a) se inyectó por vía subcutánea e intradérmica usando una aguja de inyección del calibre 27 de tal forma que la cantidad del antígeno era de 50 µg por rata. La inmunización se llevó a cabo un total de 4 veces cada 7 días después de la primera inmunización. Una pequeña cantidad (200 µl) de sangre se recogió por la vena caudal a los 7 días desde la fecha de la 4ª inmunización, y se preparó un antisuero. Para confirmar el título de anticuerpo del antisuero, se efectuó un ELISA usando proteína Siglec-15-His de ratón inmovilizada como antígeno, la proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el Ejemplo 9, o albúmina de suero

bovina (BSA). Como resultado, se observó la reactividad con la proteína Siglec-15-His de ratón y con la proteína Siglec-15-Fc de ratón en las cuatro ratas (ratas Nº 1 a 4). Por otra parte, no se observó la reactividad con BSA. A partir de estos resultados, se confirmó que el título de anticuerpo en el suero de cada una de las ratas inmunizadas aumentó, y por lo tanto, la rata Nº 2, que mostró el mayor título de anticuerpo, se sometió a un procedimiento de fusión celular.

c) Fusión celular

La fusión celular se llevó a cabo de acuerdo con un procedimiento común de fusión de células de bazo de ratón (o rata) con células de mieloma. Se recogió sangre completa del corazón de la rata con anestesia de éter y se eutanasió a la rata, y, después, se reseccionó el bazo. Las células del bazo recogidas y las células P3X63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) que son células de mieloma de ratón, se sometieron a fusión celular usando polietilenglicol (PEG). Las células resultantes se sembraron en una placa de 96 pocillos, y se añadió a estas un medio que contenía hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T) (medio de selección HAT), y después, las células se cultivaron durante 7 a 10 días. El sobrenadante de cultivo se recogió de 61 pocillos en los que se confirmó la supervivencia de los hibridomas obtenidos por fusión celular. Después, se evaluó el título de anticuerpo mediante ELISA usando proteína Siglec-15-His de ratón inmovilizada, la proteína Siglec-15-Fc de ratón producida en el Ejemplo 9, o BSA como antígeno, se exploraron los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 de ratón. A partir de los resultados de la exploración, se seleccionaron 12 pocillos que mostraban un título de anticuerpo elevado y se sometió a los hibridomas contenidos en los pocillos a un procedimiento de clonación.

d) Clonación de hibridomas

Para los hibridomas seleccionados de este modo, se llevó a cabo una primera clonación mediante un procedimiento de dilución limitante. Después de la dilución limitante, se cultivaron los hibridomas durante 2 semanas, y se confirmó el título del anticuerpo en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA usando proteína Siglec-15-Fc de ratón inmovilizada producida en el Ejemplo 9 o BSA. Para los 11 clones que se confirmó que eran clones positivos, se llevó a cabo una segunda clonación (del mismo modo que la primera clonación), se establecieron finalmente 10 clones de los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 de ratón (Nº 1A1, Nº 3A1, Nº 8A1, Nº 24A1, Nº 32A1, Nº 34A1, Nº 39A1, Nº 40A1, Nº 41B1, Nº 61A1). Incidentalmente, los hibridomas Nº 32A1 y Nº 41B1 se depositaron en el Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Depósito de Organismos de Patente del Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología) (localizado en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 28 de agosto de 2008. Al hibridoma Nº 32A1 se le ha asignado el número de depósito FERM BP-10999 con el nombre de hibridoma anti-Siglec-15 Nº 32A1, y al hibridoma Nº 41B1 se le ha asignado el número de depósito FERM BP-11000 con el nombre de hibridoma anti-Siglec-15 Nº 41B1,

Ejemplo 24. Preparación de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón

a) Preparación de ascitis de ratones desnudos

Los hibridomas establecidos en el Ejemplo 23 se cultivaron usando medio TIL Media I (fabricado por Immunobiological Laboratories Co., Ltd.), que contenía FCS al 10 %. El subcultivo de las células se llevó a cabo efectuando un procedimiento en el que la solución de cultivo se diluyó a aproximadamente un cuarto cada dos o tres días usando el punto temporal donde las células crecieron a aproximadamente 5×10^5 células/ml a modo orientativo. Cada hibridoma cultivado de este modo se implantó intraperitonealmente en un ratón desnudo al que se le había administrado previamente prisa por vía intravenosa (0,2 ml/ratón) a 1×10^7 células por ratón. En la implantación, se usaron tres ratones desnudos para cada uno de los 10 clones de hibridomas. Después de la implantación, se recogió la ascitis en el momento en el que se observó una acumulación de ascitis suficiente, que se combinó con aquellas recogidas de los otros dos ratones implantados con el mismo hibridoma y se midió la cantidad de ascitis combinada de este modo, y se crioconservó la ascitis hasta la purificación del anticuerpo. Las cantidades de las ascitis recogidas para los respectivos hibridomas se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7

Hibridoma	Cantidad de ascitis recogida (ml)	Hibridoma	Cantidad de ascitis recogida (ml)
Nº 1A1	12,5	Nº 34A1	8,2
Nº 3A1	8,0	Nº 39A1	14,5
Nº 8A1	6,0	Nº 40A1	20,3
Nº 24A1	7,8	Nº 41B1	10,5
Nº 32A1	5,5	Nº 61A1	12,3

b) Purificación de anticuerpo

La cantidad total de la ascitis recogida se sometió a purificación de IgG usando una columna de proteína G de 20 ml (fabricada por GE Healthcare, Co., Ltd.). Se ensayó la pureza de la IgG purificada mediante un análisis de filtración en gel (cromatografía en columna Superdex 200), y parte de los anticuerpos se sometieron a concentración por membrana de centrifugación. Es decir, se concentraron 9 tipos de anticuerpo excepto el anticuerpo N° 24A1 a aproximadamente entre un sexto a un octavo del volumen original centrifugando los anticuerpos a 3.000 rpm durante 30 a 60 minutos a 4 °C usando un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Posteriormente, para el anticuerpo N° 24A1 y los otros 9 tipos de anticuerpos concentrados, se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de muestra. Mediante el procedimiento anteriormente mencionado, se preparó el anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 de ratón.

Ejemplo 25. Evaluación de la propiedad de unión del anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón a proteína Siglec-15 de ratón

Se evaluó la propiedad de unión del anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón mediante un procedimiento ELISA. La proteína Siglec-15-Fc producida en el Ejemplo 9 se diluyó a 5 µg/ml con tampón de carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,5), y la solución resultante se añadió a una placa de 96 pocillos (fabricada por Nalge Nunc International, Inc., N° de Cat. 430341) a 100 µl/pocillo. Después de dejar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se retiró la solución y se añadió tampón de lavado (suero salino tamponado con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 %) a 300 µl/pocillo y se retiró. Después de efectuar este procedimiento de lavado una vez más, se añadió suero salino tamponado con fosfato que contenía BlockAce al 25 % (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a 200 µl/pocillo, y se dejó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, efectuando de este modo el bloqueo. Se retiró el líquido, y la placa se lavó dos veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado. Después, cada uno de los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón preparados en el Ejemplo 24 o la IgG de control de rata (fabricada por R&D Systems, Inc.) se diluyeron a una concentración final de 1,28 a 20.000 ng/ml (dilución en serie de 5 veces) con un tampón de ELISA (suero salino tamponado con fosfato que contenía BlockAce al 12,5 % y Tween 20 al 0,05 %), y la solución de anticuerpo diluido resultante se añadió a la placa a 100 µl/pocillo. Después de dejar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se retiró el líquido, y la placa se lavó tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado. Posteriormente, se añadió anticuerpo IgG de cabra anti-rata marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (fabricado por Beckman Coulter, Inc.) diluido 1.000 veces con el tampón de ELISA a 100 µl/pocillo, y se dejó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. El líquido se retiró y la placa se lavó tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado, y después, usando un kit de revelado de color para peroxidasa (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), se reveló el color de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Después de revelar el color, se midió la absorbancia a 492 nm usando un lector de microplacas (fabricado por Molecular Devices Corporation, Japón). Como resultado, se confirmó que las 10 sustancias de ensayo de los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón examinadas se unieron a la proteína Siglec-15 de ratón de manera dependiente de la concentración de anticuerpo (Fig. 24). Por otra parte, en el caso de la IgG de control de rata, la unión a la proteína Siglec-15 de ratón no se observó.

Ejemplo 26. Evaluación de la actividad biológica de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón basado en el ensayo para la formación de osteoclastos de ratón

Usando las 10 sustancias de ensayo de los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón producidas en el Ejemplo 24, se examinó un efecto en la diferenciación en osteoclastos de células no adherentes de médula ósea. Las células no adherentes de médula ósea de ratón preparadas mediante el procedimiento en el Ejemplo 16 se prepararon a 1,5 x 10⁵ células/ml en medio α -MEM que contenía FBS al 10 % y M-CSF a 10 ng/ml (fabricado por R&D Systems, Inc.), y la preparación de células resultante se sembró en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una cantidad de 200 µl y las células se cultivaron durante 2 días en un incubador de CO₂. La solución de cultivo usada en la placa de 96 pocillos se retiró, y se añadieron 100 µl de medio MEM- α que contenía FBS al 10 % al que se le había añadido RANKL (RANKL, fabricado por Peprotech, Inc.) y M-CSF para dar concentraciones finales de 20 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente, a cada pocillo. A la solución de cultivo, se añadieron cada uno de los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón producidos en el Ejemplo 24, una muestra obtenida retirando azida de sodio de una IgG de control de rata comercial (IgG de rata purificada, fabricada por R&D Systems, Inc.) o el anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ratón (No. 3) producido en el Ejemplo 14 a una concentración de desde 32 hasta 1,000 ng/ml, y las células se incubaron durante 3 días más en un incubador con CO₂. Después de terminar el cultivo, se midió la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de los osteoclastos formados mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 17. Después de detener la reacción enzimática, se midió la absorbancia de cada pocillo a 405 nm, y se usó la medida como un índice de actividad de TRAP. Los resultados se muestran en las Figs. 25 y 26. No se observó una inhibición significativa de TRAP en el caso de la IgG de control de rata comercial. Por otra parte, se observó una inhibición significativa de la actividad de TRAP en los casos del anticuerpo N° 32A1 en el intervalo de desde 32 ng/ml hasta 1000 ng/ml, del anticuerpo N° 8A1 y del anticuerpo policlonal N° 3 de conejo purificado por afinidad en el intervalo de desde 63 ng/ml hasta 1000 ng/ml. También en los casos del anticuerpo N° 3A1, anticuerpo N° 34A1, y del anticuerpo N° 39A1, se observó una inhibición de la actividad de TRAP a una concentración relativamente mayor de 500 ng/ml o mayor. No se observó inhibición de la formación de osteoclastos de ratón por los otros anticuerpos. A partir de los resultados anteriores, se encontraron anticuerpos

que inhiben fuertemente la formación de osteoclastos de ratón (diferenciación y maduración de osteoclastos) entre los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón. Además, como una propiedad común al anticuerpo N° 3A1, anticuerpo N° 8A1, anticuerpo N° 32A1, anticuerpo N° 34A1, y al anticuerpo N° 39A1, puede usarse como ejemplo la actividad de inhibir la formación de osteoclastos a una concentración de 1000 ng/ml, es decir, 1 µg/ml o menos.

Ejemplo 27. Extracción de ARN total de osteoclastos maduros derivados de ser humano

Cuando se cultivan células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. 2T-110) en un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat PT-8201) suplementadas con un kit de suplemento de OPGM (kit Osteoclast SingleQuot™, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-9501) que contenía suero fetal bovino (concentración final: 10 %), RANKL humana, M-CSF humano y similares, surge un gran número de osteoclastos multinucleados positivos a TRAP después de 3 a 7 días. Usando este sistema de cultivo celular de acuerdo con el protocolo adjunto al kit, se produjeron osteoclastos maduros derivados de ser humano.

a) Las células precursoras de osteoclastos humanos normales se sembraron en 60 pocillos de una placa de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo, y se añadió RANKL humana a esto para dar una concentración final de 66 ng/ml, y las células se incubaron durante 4 días en un incubador con CO₂. Después, se extrajo el ARN total de los osteoclastos multinucleados usando un reactivo de extracción de ARN total (ISOGEN, fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al reactivo. El ARN total recogido se almacenó a -80 °C hasta su uso.

b) Las células precursoras de osteoclastos humanos normales se sembraron en 84 pocillos de cada una de dos placas de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo, y se añadió RANKL humana a cada pocillo de una de las placas para dar una concentración final de 53,2 ng/ml, y no se añadió RANKL humana a la otra placa, y las células se incubaron durante 3 días en un incubador con CO₂. Después, se extrajo el ARN total de las células usando un reactivo de extracción de ARN total (ISOGEN, fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al reactivo. El ARN total recogido se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 28. Adquisición de secuencia de marco abierto de lectura (ORF) para Siglec-15 de ser humano

a) Síntesis de la primera hebra de ADNc

Usando el ARN total producido en a) del Ejemplo 26 como molde, se llevó a cabo la síntesis de ADNc usando cebador oligo(dT) (fabricado por Invitrogen, Inc.) y transcriptasa inversa Superscript III (fabricada por Invitrogen, Inc.). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo adjunto a la enzima.

b) Reacción de PCR

Se sintetizaron los oligonucleótidos que tienen las secuencias: 5'-attaagcttc accATGGAAA AGTCCATCTG GCTGC-3' (hSiglec-15-Hind III kozak-F: SEQ ID NO: 29 en el Listado de secuencias); y 5'-agtggatccT CACGGTGAGC ACATGGTGGC-3' (hSiglec-15-BamHI-R: SEQ ID NO: 30 en el Listado de secuencias) como cebadores para amplificar el ADNc de ORF para Siglec-15 de ser humano mediante PCR de acuerdo con un procedimiento común. La PCR se llevó a cabo usando esta combinación de cebadores y el ADNc producido en a) de acuerdo con un procedimiento común. La solución de reacción de la PCR resultante se purificó usando kit de purificación de PCR PureLink (fabricado por Invitrogen, Inc.).

c) Clonación en vector pcDNA3.1(+)

La solución de reacción de la PCR purificada obtenida en b) y el vector pcDNA3.1(+) (fabricado por Invitrogen, Inc.) se trataron con enzimas de restricción (BamHI, HindIII), seguido de corte de gel y purificación, y, después, se llevó a cabo una reacción de ligasa de acuerdo con un procedimiento común. Se transformaron *Escherichia coli* TOP10, y se efectuó una PCR de colonia para los clones resistentes a fármacos resultantes. Se analizó la secuencia nucleotídica completa del ADNc del ORF insertada en un plásmido, usando un secuenciador de ADN para un clon en el que se obtuvo un producto amplificado con un tamaño predicho, y como resultado, se descubrió que era la secuencia representada por SEQ ID NO: 1 en el Listado de secuencias. Esta secuencia nucleotídica fue la misma que la región codificante del ORF en la secuencia registrada en la base de datos GeneBank del NCBI como "Siglec-15 humana (número de registro: NM_213602), y además, la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias) codificada por la secuencia nucleotídica fue un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de Siglec-15 humana.

Ejemplo 29. Expresión de ARNm para diferenciación de osteoclastos humanos acompañados de Siglec-15 humana (análisis de PCR en tiempo real)

A 1 µg del ARN total producido en b) del Ejemplo 27, se añadieron 1 µl de DNasa I 1 U/µl y 1 µl de tampón de DNasa 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), y, después, se enrasó el volumen hasta 10 µl con H₂O. Después de dejar proceder la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió a esta 1 µl de EDTA 25 mM y la mezcla

resultante se calentó a 65 °C durante 10 minutos. A partir de esta solución, se tomó una alícuota de 8 µl, y se añadieron a esta 1 µl de cebador oligo(dT)₂₀ 50 µM y 1 µl de dNTP 10 mM, y la mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo. A esta solución, se le añadieron 2 µl de tampón RT 10 x (fabricado por Invitrogen, Inc.), 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de ditiotreitól 0,1 M, 1 µl de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.), y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript III (200 U/µl, fabricado por Invitrogen, Inc.) y el volumen total se enrasó a 20 µl. Después de dejar proceder la reacción a 50 °C durante 50 minutos, la mezcla se calentó a 85 °C durante 5 minutos y después se incubó en hielo.

Mediante el uso del ADNc monocatenario producido de este modo, se llevó a cabo la PCR en tiempo real usando una combinación de los siguientes cebadores y sondas marcadas fluorescentemente (sonda TaqMan, fabricada por Applied Biosystems, Inc.).

Condiciones para la PCR en tiempo real:

Cebadores para amplificar catepsina K de ser humano:

5'-ccgcagtaat gacacccttt-3' (TqM-hcatK-F: SEQ ID NO: 31 en el Listado de secuencias) y
5'-aaggcattgg tcatgtagcc-3' (TqM-hcatK-R: SEQ ID NO: 32 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar catepsina K de ser humano:

5'-Fam-tcagggtcag tgtgttct gttggct-TAMRA-3' (sonda TqM-hcatK: SEQ ID NO: 33 en el Listado de secuencias)

Cebadores para amplificar TRAP de ser humano:

5'-ctgtcctggc tcaagaaca-3' (TqM-hTRAP-F: SEQ ID NO: 34 en el Listado de secuencias) y
5'-ccatagtga agcgagata-3' (TqM-hTRAP-R: SEQ ID NO: 35 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar TRAP de ser humano:

5'-Fam-tgagaatggc gtgggctacg tgctgagt-TAMRA-3' (sonda TqM-hTRAP: SEQ ID NO: 36 en el Listado de secuencias)

Cebadores para amplificar Siglec-15 de ser humano:

5'-cagccaccaa catccatttc-3' (TqM-hSiglec-15-F: SEQ ID NO: 37 en el Listado de secuencias) y
5'-cgctcaagct aatgcgtga-3' (TqM-hSiglec-15-R: SEQ ID NO: 38 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar Siglec-15 de ser humano:

5'-Fam-aagaacaaag gccagtgcga ggctggc-TAMRA-3' (sonda TqM-hSiglec-15: SEQ ID NO: 39 en el Listado de secuencias)

Cebadores para amplificar proteína ribosomal L32 de ser humano:

5'-gagatcgctc acaatgttc ct-3' (TqM-hL32-F: SEQ ID NO: 40 en el Listado de secuencias) y
5'-gatgccagat ggcagtttt ac-3' (TqM-hL32-R: SEQ ID NO: 41 en el Listado de secuencias)

Sonda TaqMan para detectar proteína ribosomal L32 de ser humano:

5'-Fam-accgcaaagc .catcgtggaa agagctg-TAMRA-3' (sonda TqM-hL32: SEQ ID NO: 42 en el Listado de secuencias)

Se llevó a cabo un análisis de PCR en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real (Detector de Secuencia ABI Prism 7700, fabricado por Perkin Elmer Japan, Applied Biosystems Division) en las siguientes condiciones. En la reacción, se usó Mezcla Maestra de PCR universal TaqMan (fabricado por Applied Biosystems, Inc.). En primer lugar, se añadió agua destilada a 25 pmol de cada cebador, 8 ng de ADNc monocatenario y 10 pmol de sonda TaqMan para enrasar el volumen a 25 µl, y, después, se añadió a esto 25 µl de Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan, preparando de este modo 50 µl de una solución de reacción. Esta solución de reacción se calentó a 50 °C durante 2 minutos y después se calentó a 95 °C durante 10 minutos, y posteriormente se sometió a 40 ciclos de temperatura de "95 °C durante 0,25 minutos y 60 °C durante 1 minuto", efectuando de este modo el análisis de PCR en tiempo real. Incidentalmente, el nivel de expresión de ARNm de cada gen se corrigió por el nivel de expresión de ARNm para proteína ribosomal L32.

Como resultado, se reveló que el nivel de expresión del gen de Siglec-15 aumentó significativamente en el caso donde se indujo la diferenciación de osteoclastos humanos añadiendo RANKL del mismo modo ya que se sabe que los genes de catepsina K y TRAP son moléculas marcadoras para osteoclastos (Fig. 27).

Ejemplo 30. Producción de construcción de expresión de proteína Siglec-15 de ser humano soluble

Se representa una secuencia parcial de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de proteína Siglec-15 de ser humano por la SEQ ID NO: 43 en el Listado de secuencias y la secuencia de aminoácidos de la misma está representada por la SEQ ID NO: 44 en el Listado de secuencias. Al utilizar dicha secuencia parcial, puede producirse proteína Siglec-15 de ser humano soluble en un sobrenadante de cultivo de una célula animal o similares.

a) Amplificación de gen de Siglec-15 de ser humano soluble mediante PCR

Se sintetizaron los oligonucleótidos que tienen las secuencias: 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccATGGAA AAGTCCATCT GGCTGC-3' (hSiglec-15-ECD-F: SEQ ID NO: 45 en el Listado de secuencias); y 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc CCCGCTGGCG CCATGGAAGC GG-3' (hSiglec-15-ECD-R: SEQ ID NO: 46 en el listado de secuencias) como cebadores para amplificar el ADNc del dominio extracelular de Siglec-15 de ser humano mediante la PCR de acuerdo con un procedimiento común. Incidentalmente, Estos cebadores se diseñaron como cebadores de amplificación para producir una puerta de entrada al clon, tal como añadiendo una secuencia attB1 a hSiglec-15-ECD-F y una secuencia attB2 a hSiglec-15-ECD-R. La PCR llevó a cabo usando esta combinación de cebadores y el plásmido Siglec-15/pcDNA3.1(+) de ser humano producido en el Ejemplo 28 como molde de acuerdo con un procedimiento conocido. La solución de reacción de la PCR resultante se purificó usando kit de purificación de PCR PureLink (fabricado por Invitrogen, Inc.).

b) Producción de clon de entrada mediante reacción Gateway BP

Se produjo un clon de entrada en el que se integró el ADNc del dominio extracelular de Siglec-15 de ser humano mediante la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) empleando un sistema de recombinación específico de sitio de fago lambda en el siguiente procedimiento. En primer lugar, se efectuó una reacción BP usando BP clonasa entre el producto de la PCR que tenía una secuencia attB en ambos extremos producida en a) y pDNOR221 (fabricado por Invitrogen, Inc.) que es un vector donante que tiene una secuencia attP. Usando esta solución de reacción, se transformaron *Escherichia coli* TOP10, y se efectuó una PCR de colonia para los clones resistentes a fármacos, y se confirmó el tamaño de las inserciones. Después, para un clon que se confirmó que tenía una inserción con el tamaño correcto, se efectuó un análisis de la secuencia de ADN total de la inserción. Como resultado, se obtuvo un clon de entrada que es completamente idéntico a la secuencia de ácido nucleico diana (SEQ ID NO: 43 en el Listado de secuencias) que codifica el dominio extracelular de la proteína Siglec-15 de ser humano.

c) Producción de clon de expresión mediante reacción Gateway LR

Se produjo un clon de expresión en el que se integró el ADNc del dominio extracelular de Siglec-15 de ser humano mediante la tecnología Gateway (Invitrogen, Inc.) empleando un sistema de recombinación específico de sitio de fago lambda mediante el siguiente procedimiento. El clon de entrada producido en b) contiene una inserción que tiene una secuencia attL en ambos extremos. Se llevó a cabo una reacción LR usando clonasa LR entre este clon de entrada y dos tipos de vectores de destino que tenían una secuencia attR. Incidentalmente, como vectores de destino, se añaden dos tipos de vectores de destino: pDONM diseñado de tal forma que el marcador del epítipo V5 y un marcador 6 x His se añaden al extremo C-terminal de la inserción; y pHLgFc diseñado de tal forma que un marcador Fc humano se añade al extremo C-terminal de la inserción. Usando la solución de reacción obtenida por la reacción LR, se transformaron *Escherichia coli* TOP10, y se llevó a cabo análisis de secuencia para los clones resistentes a fármacos resultantes para confirmar si sucedía una recombinación correcta.

Como resultado del análisis de secuencias, se obtuvieron clones de expresión (Siglec-15 soluble de ser humano/pDONM y Siglec-15 soluble de ser humano/pHLgFc) en la que sucedió la recombinación correcta para pDONM y pHLgFc, respectivamente. Transfectando el Siglec-15 soluble de ser humano/pDONM en una célula animal o similares, el ARNm que tenía la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 47 en el Listado de secuencias se transcribió y tradujo en una proteína (Siglec-15- His de ser humano) que tenía la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 48 en el Listado de secuencias. Además, transfectando el Siglec-15 soluble de ser humano/pHLgFc en una célula animal o similares, el ARNm que tenía la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 49 en el Listado de secuencias se transcribió y tradujo en una proteína (Siglec-15-Fc de ser humano) que tenía la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 50 en el Listado de secuencias.

Ejemplo 31. Preparación a gran escala de solución de cultivo que contiene proteína Siglec-15 humana usando células 293-F

a) Preparación de solución de cultivo que contiene Siglec-15-His

La Siglec-15/pDONM humana soluble obtenida en el Ejemplo 30 se preparó a una cantidad de aproximadamente 25 mg. Incidentalmente, en la purificación de un plásmido de la *Escherichia coli* cultivada a gran escala, se usó el kit Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep (fabricado por Invitrogen, Inc.). El plásmido preparado de este modo se mezcló con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, Inc.), y 50 ml de un reactivo de transfección 293fectina (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió a esta, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta mezcla se añadió a células FreeStyle 293-F (producidas por Invitrogen, Inc.) cultivadas en medio de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Invitrogen, Inc.) que contenía penicilina-estreptomicina al 1 % de tal forma que la densidad celular alcanzó de 1,0 a 3,4 x 10⁶ células/ml usando un aparato de cultivo de bioproceso de 25 l (biorreactor WAVE). Después de someter a las células a cultivo rotatorio (30 rotaciones/min) a una concentración de CO₂ de desde el 6 hasta el 12 % durante 96 horas (4 días) a 37 °C, se recogió la solución de cultivo y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se considera que en el sobrenadante de cultivo preparado de este modo, se expresa una proteína en la que se ha añadido un marcador de epítipo V5 y un marcador 6 x His al extremo C-terminal del dominio extracelular de Siglec-15 humano (Siglec-15-His de ser humano).

b) Preparación de solución de cultivo que contiene Siglec-15-Fc humano

La Siglec-15/pHlgFc humana soluble obtenida en el Ejemplo 30 se preparó a una cantidad de aproximadamente 5 mg. Incidentalmente, en la purificación del plásmido de la *Escherichia coli* cultivada a gran escala, se usó el kit Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep (fabricado por Invitrogen, Inc.). El plásmido preparado de este modo se mezcló con Opti-MEM (fabricado por Invitrogen, Inc.), seguido de esterilización por filtración. Después, 10 ml de un reactivo de transfección 293fectina (fabricado por Invitrogen, Inc.) se añadió a esta, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta mezcla se añadió a células FreeStyle 293-F (producidas por Invitrogen, Inc.) cultivadas en matraces Erlenmeyer hasta que la densidad celular alcanzó de 1,0 a 3,0 x 10⁶ células/ml x 5 l (1 l/matraz por 5 matraces) en medio de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Invitrogen, Inc.). Después de someter a las células a cultivo rotatorio (125 rotaciones/min) a una concentración de CO₂ del 8,0 % durante 96 horas (4 días) a 37 °C, se recogió la solución de cultivo y se centrifugó para preparar un sobrenadante de cultivo. Se considera que en el sobrenadante de cultivo preparado de este modo, se expresa una proteína a la que se le ha añadido un marcador Fc al extremo C-terminal del dominio extracelular de Siglec-15 humana (Siglec-15-Fc de ser humano).

15 **Ejemplo 32. Purificación de proteína Siglec-15 humana soluble**

a) Purificación de Siglec-15-His humana soluble

a-i) Columna de cromatografía HisTrap HP

A 12 l de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-His humana preparadas en a) del ejemplo 31, se le añadieron 1350 ml de tampón 10 x (Tris 500 mM, NaCl 1,5 M, imidazol 200 mM, pH 8,0), y la mezcla resultante se agitó bien y se filtró a través de un filtro MilliPak-60 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Esta solución de cultivo se aplicó a una columna de Ni-Sepharose HP (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) de 100 ml que se había lavado previamente con agua destilada (agua Milli-Q) a un caudal de 10 ml/min. Después de lavar la columna con 400 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 300 mM a un caudal de 8 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en columna con 200 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 300 mM e imidazol 500 mM a un caudal de 2,5 ml/min, y el eluido se fraccionó en tubos mini-sorp (fabricados por Nunc, Inc.). Para prevenir la precipitación de la proteína, se añadieron 8 ml de solución de NaCl 5 M a aproximadamente 40 ml de una fracción que contenía la proteína eluida, seguido de agitación, y, después, la mezcla resultante se concentró a aproximadamente 20 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). La materia insoluble generada durante la concentración se eliminó por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, y se aplicaron 2,5 ml del sobrenadante resultante a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que había sido equilibrada previamente con suero salino tamponado con fosfato que contenía NaCl 1 M (N-PBS), seguido de elución con N-PBS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por N-PBS. Este procedimiento se llevó a cabo 7 veces más repitiéndolo, y se obtuvieron aproximadamente 28 ml de una solución de Siglec-15-His humana parcialmente purificada.

a-ii) Cromatografía en columna Resource Q

se dializaron 12 ml de la muestra que se había purificado mediante cromatografía en columna Ni-Sepharose HP y cuyo disolvente había sido reemplazado por N-PBS durante toda la noche a 4 °C frente a tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1 % (1 l, tres veces) y el dializado resultante se centrifugó a 3.000 durante 30 a 4 °C, y se retiró el precipitado. Después de filtrar el sobrenadante resultante a través de un filtro Miller-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el filtrado se aplicó a una columna de 6 ml Resource Q (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1 % a un caudal de 1 ml/min. A continuación, se lavó la columna con este tampón a un caudal de 1 ml/min y se recogió una fracción de proteína que no había sido adsorbida en la columna. Se eluyó una proteína adsorbida en la columna con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía CHAPS al 0,1 % y NaCl 1 M a un caudal de 1 ml/min. Después de concentrar 26,5 ml de la fracción que no estaba adsorbida en la columna a 3,0 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el concentrado se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se retiró el precipitado. Se aplicaron 2,5 ml del sobrenadante resultante a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino tamponado con fosfato que contenía clorhidrato de arginina 50 mM (pH 7,0, A-PBS), seguido de elución con A-PBS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por A-PBS. El clorhidrato de arginina en el disolvente de la muestra preparada se añadió para evitar que la Siglec-15-His humana soluble se precipitase. Se crioconservó el sobrenadante después de la centrifugación a -80 °C hasta su uso. El procedimiento de purificación anteriormente mencionado (cromatografía en columna Resource Q) se realizó dos veces repitiéndolo.

a-iii) Ensayo de detección y pureza de Siglec-15-His de ser humano purificada

Usando una muestra preparada por el procedimiento de purificación anteriormente mencionado (cromatografía en columna Ni-Sepharose HP y cromatografía en columna Resource Q), se efectuó electroforesis en SDS-

poliacrilamida en condiciones reductoras y tinción de plata. Es decir, a 5 µl de cada una de las muestras purificadas mediante las respectivas etapas de purificación, se le añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS, y la mezcla resultante se trató térmicamente a 95 °C durante 10 minutos. 0,3 µl de cada una de las muestras tratadas termalmente se usaron para la electroforesis en SDS-poliacrilamida. El procedimiento de electroforesis se llevó a cabo del mismo modo que en el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, excepto en que se usaron marcadores de peso molecular Rainbow (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) como marcadores de peso molecular. Tras finalizar la electroforesis, se llevó a cabo la tinción de plata usando el kit PhastGel Silver (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y PhastSystem. Los resultados se muestran en la Fig. 28. Se demostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 35 kDa (Siglec-15-His de ser humano) se purificaba eficazmente y se concentraba en la fracción de proteína que no se adsorbía en la columna Resource Q.

a-iv) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-His de ser humano purificada

Para la Siglec-15-His purificada de ser humano (la fracción de proteína que no se adsorbió en la columna Resource Q), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando albúmina de suero bovino como patrón de muestra. Al efectuar dos veces el procedimiento de purificación, se obtuvo un total de 1,66 mg de Siglec-15-His humana purificada.

b) Purificación de Siglec-15-Fc humana soluble

b-i) Cromatografía en columna de proteína A HiTrap

1,5 l de la solución de cultivo de células 293F que expresan Siglec-15-Fc humana preparada en b) del Ejemplo 31 se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), y, después, el filtrado se aplicó a una columna de 5 ml de proteína A HiTrap (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) a un caudal de 5 ml/min. Después de lavar la columna con 70 ml de D-PBS a un caudal de 5 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 24 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) a un caudal de 1,2 ml/min. El eluato se fraccionó a 1,2 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 0,31 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Una alícuota de 2,5 ml de una solución (aproximadamente 7,5 ml) obtenida combinando las fracciones de proteína eluidas (fracciones 5 a 9) se aplicaron a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino tamponado con fosfato que contenía clorhidrato de arginina 50 mM (pH 7,0, A-PBS), seguido de elución con A-PBS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por A-PBS. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces más repitiéndolo. El clorhidrato de arginina en el disolvente se añadió para evitar que precipitase la Siglec-15-Fc humana soluble. Se aplicaron 2,5 ml de la solución restante de las fracciones de proteína eluida (fracciones 5 a 9) a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino tamponado con fosfato que contenía NaCl 1 M (pH 6,7, N-PBS), seguido de elución con N-PBS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por N-PBS. Se añadió NaCl al disolvente de la muestra preparada para evitar que precipitase la Siglec-15-Fc humana sin añadir un compuesto contenedor de grupo amino, tal como arginina. La muestra de Siglec-15-Fc humana cuyo disolvente se había reemplazado con N-PBS se usó solo cuando se preparó una columna inmovilizada en el apartado siguiente c) del Ejemplo 34, y en todos los demás ejemplos, se usó Siglec-15-Fc humana cuyo disolvente se había reemplazado con A-PBS. Las muestras preparadas mediante el procedimiento anteriormente mencionado se criopreservaron a -80 °C hasta su uso.

b-ii) Ensayo de detección y pureza de Siglec-15-Fc de ser humano purificada

Usando las muestras preparadas por el procedimiento de purificación anteriormente mencionado, se efectuó electroforesis en SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras y tinción de plata. Es decir, a 5 µl de cada una de las muestras purificadas mediante las respectivas etapas de purificación, se le añadió una cantidad equivalente de una solución de tratamiento de SDS, y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 10 minutos. Se usaron 0,3 µl de una muestra obtenida diluyendo cada una de las muestras tratadas termalmente a 1/100 o 1/300 con una concentración media de la solución de tratamiento de SDS para la electroforesis en gel de poliacrilamida. La electroforesis y la tinción de plata se llevaron a cabo del mismo modo que en el ensayo de pureza de Siglec-15-His de ser humano descrito en a-iii). Los resultados se muestran en la Fig. 29. Se demostró que una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 55 kDa (Siglec-15-Fc de ser humano) se purificaba eficazmente y se concentraba en la fracción de proteína eluida de la columna de proteína A HiTrap.

b-iii) Medición de concentración de proteína de Siglec-15-Fc de ser humano purificada

Para Siglec-15-Fc de ser humano purificada (la fracción de proteína eluida de la columna de desalado PD-10), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando albúmina de suero bovino como patrón de muestra. Tal como se muestra en la Tabla 8, se obtuvo un total de 25,2 mg de Siglec-15-Fc de ser humano llevando a cabo dos veces el procedimiento de purificación.

Tabla 8

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
Disolvente que contiene Arg	2,3	7,0	16,1
Disolvente que contiene NaCl	2,6	3,5	9,1
Total			25,2

Ejemplo 33. Producción de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ser humano (inmunización de conejo)

a) Preparación del antígeno

5 La proteína Siglec-15-Fc de ser humano producida en el Ejemplo 32 se preparó a 100 µg/0,5 ml, y se añadió a esta una cantidad equivalente de un adyuvante y se produjo una emulsión usando una jeringa de vidrio. Como adyuvante, se usó adyuvante incompleto de Freund (FCA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) solo para la primera inmunización, y adyuvante incompleto de Freund (FICA, fabricado por Difco Laboratories, Inc.) para la segunda inmunización y las posteriores.

10 b) Inmunización de conejo

Tres conejos (conejos japoneses hembra de color blanco con un peso corporal de 3 kg) se usaron como animales inmunizados. Incidentalmente, se recogió sangre antes de la inmunización, y se obtuvo 10 ml de suero preinmune por cada conejo. La emulsión obtenida en a) se inyectó por vía subcutánea e intradérmica usando una aguja de inyección del calibre 27 de tal forma que la cantidad del antígeno era de 50 µg por conejo. La inmunización se llevó a cabo un total de 8 veces cada 14 días después de la primera inmunización. La sangre completa se recogió después de 7 días desde la fecha de la 8ª inmunización, y se obtuvieron de 74,4 a 74,9 ml de antisuero por conejo. Los títulos de anticuerpo en el suero preinmune y el antisuero se confirmaron mediante un procedimiento ELISA usando un antígeno inmovilizado. Como resultado, se confirmó un aumento en el título de anticuerpo en los tres conejos. El antisuero se almacenó a -20°C hasta su uso.

20 **Ejemplo 34. Purificación de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ser humano**

a) Cromatografía en columna de proteína A HiTrap

A 40 ml de cada uno de los tres lotes de antisuero de conejo preparados en b) del Ejemplo 33, se le añadió 40 ml de PBS de Dulbecco (D-PBS, fabricado por Invitrogen, Inc.) y se mezcló, y la mezcla resultante se filtró a través de un filtro Sterivex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Después, el filtrado se aplicó a una columna que comprendía dos columnas de 5 ml HiTrap de Proteína A (las dos columnas estaban conectadas en serie, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y se había equilibrado previamente con D-PBS a un caudal de 2 ml/min. Después de lavar la columna con 35 ml de D-PBS a un caudal de 1 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 50 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) a un caudal de 1 ml/min. El eluato se fraccionó a 2,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 0,6 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Después de concentrar aproximadamente 15,5 ml de una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 3 a 7) que contenían las proteínas a 5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), se aplicó una alícuota de 2,5 ml del concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había equilibrado previamente con suero salino Otsuka para inyección (TO-SS) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces más repitiéndolo. Las muestras preparadas de este modo se criopreservaron a -80 °C hasta su uso.

b) Purificación de IgG de conejo preinmune

Se había recogido sangre previamente de tres conejos usados en el Ejemplo 33, antes de iniciar la inmunización con Siglec-15-Fc de ser humano, y se preparó suero preinmune. Después de mezclar entre sí alícuotas de 5 ml de cada una de estas muestras de suero, se añadieron a esto 15 ml de D-PBS, y la mezcla resultante se filtró a través de un filtro Millex GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Después, la muestra resultante se aplicó a una columna que comprendía dos columnas de 5 ml de proteína A HiTrap (fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) y se había equilibrado previamente con D-PBS a un caudal de 1 ml/min. Después de lavar la columna con 35 ml de D-PBS a un caudal de 1 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 50 ml de tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) a un caudal de 1 ml/min. El eluato se fraccionó a 2,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 0,6 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Después de concentrar una solución obtenida combinando las fracciones (fracciones 4 a 6) que contenían las proteínas a 2,5 ml con un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-15 (fabricado por Millipore Co., Ltd.), se aplicó el concentrado a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que se había

equilibrado previamente con suero salino Otsuka para inyección (TO-SS) que contenía Tween 20 al 0,01 %, seguido de elución con TO-SS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por TO-SS. La muestra de IgG preinmune de conejo purificada de este modo se sometió a electroforesis de poliacrilamida y tinción de plata mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 8 para confirmar que la proteína de IgG estaba suficientemente purificada, y, después, se midió la concentración de proteína. La muestra de IgG de conejo preinmune purificada de este modo se criopreservó a -80 °C hasta su uso.

c) Preparación de columna de afinidad que tiene Siglec-15-Fc de ser humano inmovilizado sobre este

Se concentraron 3 ml de la Siglec-15-Fc humana purificada cuyo disolvente se reemplazó con N-PBS producido en b) del Ejemplo 32 (un total de 7,8 mg de proteína) a 2 ml usando un concentrador de membrana de centrifugación Amicon Ultra-4 (fabricado por Millipore Co., Ltd.). Al concentrado, se le añadió un tampón de acoplamiento (NaHCO₃, NaCl 0,5 M, pH 8,3) para enrasar el volumen final a 2,5 ml, y se reemplazó el disolvente con 3,5 ml del tampón de acoplamiento usando una columna de desalado PD-10. Después se reemplaza el isopropanol en una columna HiTrap activada con NHS (1 ml, fabricado por Amersham Biosciences, Inc.) con ácido clorhídrico 1 mM, se inyectaron 3 ml de la Siglec-15-Fc preparada en la columna usando una jeringa, y el líquido se inyectó de manera alterna a este usando otra jeringa conectada a la salida de la columna para efectuar una reacción de acoplamiento. Después de dejar proceder la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, para inactivar los grupos excesivamente activos, se inyectaron 6 ml de un tampón de bloqueo (tampón de etanolamina que contiene NaCl 0,5 M, pH 8,3), 6 ml de un tampón de lavado (tampón de acetato de sodio que contiene NaCl 0,5 M, pH 4,0), y 6 ml del tampón de bloqueo secuencialmente de acuerdo con el protocolo de Amersham Biosciences, Inc., y, después, la columna se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, 6 ml del tampón de lavado, 6 ml del tampón de bloqueo, y 6 ml del tampón de lavado se inyectaron en la columna secuencialmente de nuevo, y finalmente, se reemplazó el tampón en la columna con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) que contenía NaCl 0,15 M. Esta muestra se almacenó a 4 °C hasta su uso.

d) Purificación de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ser humano con columna de afinidad

d-i) Cromatografía de afinidad en columna

Después de filtrar 7 ml de cada uno de los anticuerpos anti-Siglec-15 humanos (Nº: 1, 2 y 3 preparados en A) a través de un filtro Millex-GV (fabricado por Millipore Co., Ltd.), el filtrado resultante se aplicó a la columna producida de c) que tenía la Siglec-15 humana inmovilizada sobre esta y que se había equilibrado previamente con el tampón Apply a un caudal de 0,25 ml/min. Después de lavar la columna con 5 ml del tampón de aplicación a un caudal de 0,25 ml/min, se eluyó una proteína adsorbida en la columna con 5 ml de tampón de clorhidrato de glicina 0,1 M (pH 2,7) que contenía NaCl 0,5 M a un caudal de 0,25 ml/min. Los cromatogramas de los anticuerpos policlonales anti-Siglec-15 humana (Nº 1, 2 y 3) purificados con la columna de afinidad tal como se muestra en la Figura 30. El eluato se fraccionó a 0,5 ml por fracción en tubos mini-sorp (fabricado por Nunc, Inc.), e inmediatamente después, se añadieron 16 ml de Tris 1 M para neutralizar el eluido. Aproximadamente 2,5 ml de una solución obtenida al combinar las fracciones de proteína de IgG (fracciones 3 a 7) eluidas con el tampón de clorhidrato de glicina para cada anticuerpo se aplicaron a una columna de desalado PD-10 (fabricada por Amersham Biosciences, Inc.) que había sido equilibrada previamente con suero salino equilibrado tamponado con fosfato de Dulbecco que contenía Tween 20 al 0,01 % (T-PBS), seguido de elución con T-PBS, mediante lo cual se obtuvieron 3,5 ml de una muestra cuyo disolvente estaba reemplazado por T-PBS. Las muestras preparadas de este modo se criopreservaron a -80 °C hasta su uso.

dii) Medición de la concentración de proteína de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ser humano purificado por afinidad

Para las muestras de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ser humano (las fracciones eluidas de la columna de desalado PD-10), se midió la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteína DC (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc) usando IgG bovina como patrón de muestra. Tal como se muestra en la Tabla 9, aproximadamente de 9,1 a 11,9 mg del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ser humano purificado por afinidad pueden prepararse en cada uno de los lotes Nº 1 a 3.

Tabla 9

	Conc. Prot. (mg/ml)	Vol. de muestra (ml)	Proteína total (mg)
Nº 1	3,0	3,5	10,5
Nº 2	2,6	3,5	9,1
Nº 3	3,4	3,5	11,9

Ejemplo 35. Efecto de la adición de anticuerpo policlonal de conejo anti-Siglec-15 de ser humano en la fusión celular de células precursoras de osteoclastos normales (tinción de TRAP)

Las células precursoras de osteoclastos humanos normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, compradas a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. 2T-110) se sembraron en una placa de 96 pocillos a 1 x 10⁴ células/pocillo de acuerdo con el protocolo adjunto a las células. Como medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, compradas a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat PT-8201) suplementadas con un kit de suplemento de OPGM (kit Osteoclast SingleQuot™, compradas a través de Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-9501) que contenía suero fetal bovino (concentración final: 10 %), RANKL humana (concentración final: 69 ng/ml), M-CSF humana (concentración final: 33 ng/ml) y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, se le añadió el anticuerpo N° 2 anti-Siglec-15 de ser humano purificado por afinidad producido d) del Ejemplo 34 a una concentración final de 3 o 30 µg/ml, o la IgG de conejo preinmune producida en b) del Ejemplo 34 a una concentración final de 30 µg/ml, y las células se incubaron durante 5 días en un incubador con CO₂. Después del cultivo, se retiró el sobrenadante, y se añadió formalina neutra al 10 % para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y se añadió una solución de tinción de TRAP (fosfato AS-MX de naftol 0,27 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), violeta rojo rápido en sal LB 1,6 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), dimetilformamida al 1 %, tartrato de sodio 50 mM, tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) a 100 µl/pocillo, y se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y, después, se observó mediante microscopía (Fig. 31). Como resultado, se inhibió de manera significativa la formación de osteoclastos gigantes como resultado de un alto grado de fusión celular mediante la adición del anticuerpo policlonal anti-Siglec-15 de ser humano. Por otra parte, en el caso donde se añadió la IgG preinmune, no se observó dicha inhibición de fusión celular de osteoclastos. El número de células multinucleadas positivas a TRAP en las que el número de núcleos es 5 o más se contó con un microscopio invertido (Fig. 32). Como resultado, se observó una inhibición significativa de la formación de osteoclastos multinucleados en el pocillo al que se le había añadido el anticuerpo N° 3 anti-Siglec-15 humano purificado por afinidad a una concentración final de 30 µg/ml. También en el caso donde se añadió la IgG preinmune a 30 µg/ml, se observó una tendencia a la inhibición de formación de osteoclastos multinucleados. Sin embargo, cuando se hizo una comparación con dichos pocillos, se demostró que la formación de osteoclastos multinucleados se inhibía de manera significativa añadiendo el anticuerpo N° 2 anti-Siglec-15 de ser humano. De este modo, se reveló que la multinucleación y la fusión celular de osteoclastos positivos a TRAP a partir de células precursoras de osteoclastos humanos normales se inhibe por la unión específica del anticuerpo a Siglec-15.

Ejemplo 36. Evaluación de la propiedad de unión de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón a la proteína Siglec-15 humana

La propiedad de unión del anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón a la proteína Siglec-15 humana se evaluó por un procedimiento ELISA. La proteína Siglec-15-Fc humana producida en la etapa b) del Ejemplo 32 se diluyó a 5 µg/ml con tampón carbonato sódico 0,1 M (pH 9,5), y la solución resultante se añadió a una placa de 96 pocillos (fabricada por Nalge Nunc International, Inc., N° de Cat. 430341) a 100 µl/pocillo. Después de dejar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se retiró la solución y se añadió tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 %) a 300 µl/pocillo y se retiró. Después de realizar este procedimiento de lavado otra vez, se añadió solución salina tamponada con fosfato que contenía BlockAce al 25 % (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a 200 µl/pocillo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, con lo que se efectuó el bloqueo. Se retiró el líquido y la placa se lavó dos veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado. Después, los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón preparados en el Ejemplo 24 o IgG de rata de control (fabricada por R&D systems, Inc.) se diluyeron, cada uno, hasta una concentración final de 1,28 a 20.000 ng/ml (series de dilución quintuples) con un tampón ELISA (solución salina tamponada con fosfato que contenía BlockAce al 12,5 % y Tween 20 al 0,05 %), y la solución de anticuerpo diluida resultante se añadió a la placa a 100 µl/pocillo. Después de dejar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se retiró el líquido y la placa se lavó tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado. Posteriormente, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de rata marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (fabricado por Beckman Coulter, Inc.) diluido 1.000 veces con el tampón de ELISA a 100 µl/pocillo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró el líquido y la placa se lavó tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado, y, después, usando un kit de revelado de color para peroxidasa (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), se reveló el color según el protocolo proporcionado junto con el kit. Después del revelado de color, se midió la absorbancia a 492 nm usando un lector de microplacas (fabricado por Nihon Molecular Devices Corporation). Como resultado, se confirmó que las 10 sustancias de ensayo de los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón examinadas se unían a la proteína Siglec-15 humana de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo (Fig. 33). En particular, la actividad de unión de las 5 sustancias de ensayo: N° 1A1, N° 3A1, N° 24A1, N° 32A1 y #61A1, era alta, y la actividad de unión de 3 sustancias de ensayo: N° 8A1, N° 34A1 y #39A1, era baja. Por otra parte, en el caso de la IgG de rata de control, no se observó unión a la proteína Siglec-15 humana. Por los resultados anteriores, se demostró que los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón preparados en el Ejemplo 24 no sólo se unían a Siglec-15 de ratón, sino también a Siglec-15 humano, y además, se descubrió que algunos anticuerpos se unen fuertemente a Siglec-15 humana.

Ejemplo 37. Efecto de la adición del anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 humano sobre la fusión celular y la actividad de resorción ósea de células precursoras de osteoclastos humanas normales

(evaluación de la actividad biológica *in vitro*)

Como se confirmó que los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón también se unen a la proteína Siglec-15 humana en el Ejemplo 36, se examinaron los efectos de estos anticuerpos sobre la formación de osteoclastos humanos y la actividad de resorción ósea.

- 5 a) Efecto de la adición de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón sobre la fusión celular de osteoclastos procedentes de células precursoras de osteoclastos humanas normales (Tinción TRAP)

Se sembraron células precursoras de osteoclastos humanas normales (Células Precursoras de Osteoclastos Naturales Humanas Normales, adquiridas en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat 2T-110) en una placa de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo según el protocolo proporcionado junto con las células. Como medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-8201) suplementado con un kit de suplemento OPGM (Kit Osteoclast SingleQuot™, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-9501) que contenía suero bovino fetal (concentración final: 10 %), RANKL humano (concentración final: 66 ng/ml), M-CSF humano (concentración final: 33 ng/ml) y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante se le añadió cada uno de los anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón preparados en el Ejemplo 24 o IgG de rata de control (fabricada por R&D systems) para dar una concentración final de 30 µg/ml, y las células se incubaron durante 4 días en un incubador con CO₂. Después del cultivo, se retiró el sobrenadante y se añadió formalina neutra al 10 % para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se añadió una solución de tinción TRAP (naftol AS-MX fosfato 0,27 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), violeta rojo rápido en sal LB 1,6 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), dimetilformamida al 1 %, tartrato sódico 50 mM, tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5,0)) a 100 µl/pocillo, y se dejó que continuara la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con agua destilada y, posteriormente, se observaron con un microscopio (Fig. 34). Como resultado, se inhibió casi completamente la formación de osteoclastos gigantes resultantes de un alto grado de fusión celular mediante la adición del anticuerpo #32A1. Además, también en el caso del anticuerpo #41B1, se inhibía significativamente la formación de osteoclastos gigantes resultantes de un alto grado de fusión celular. Por otra parte, en el caso de otros anticuerpos monoclonales de rata anti-Siglec-15 de ratón (tales como el anticuerpo #1A1) y la IgG de rata de control, no se observó una inhibición tan significativa de fusión celular de osteoclastos. De este modo, se reveló que la multinucleación y la fusión celular de osteoclastos positivos para TRAP procedentes de células precursoras de osteoclastos humanas se inhiben por el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína Siglec-15.

- 30 b) Efecto de la adición de anticuerpo de rata anti-Siglec-15 de ratón (#32A1) sobre la fusión celular de osteoclastos procedentes de células precursoras de osteoclastos humanas normales (Tinción TRAP)

Se sembraron células precursoras de osteoclastos humanas normales (Células Precursoras de Osteoclastos Naturales Humanas Normales, adquiridas en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. 2T-110) en una placa de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo según el protocolo proporcionado junto con las células. Como medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-8201) suplementado con un kit de suplemento OPGM (Kit Osteoclast SingleQuot™, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-9501) que contenía suero bovino fetal (concentración final: 10 %), RANKL humano (concentración final: 68,4 ng/ml), M-CSF humano (concentración final: 33 ng/ml) y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, se le añadió el anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón (#32A1), preparado en el Ejemplo 24 para dar una concentración final de 0,1, 0,3, 1, o 3 µg/ml, y las células se incubaron durante 3 días en un incubador con CO₂. Después del cultivo, se retiró el sobrenadante y se añadió formalina neutra al 10 % para fijar las células. Después de fijar las células, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se añadió una solución de tinción TRAP (naftol AS-MX fosfato 0,27 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), violeta rojo rápido en sal LB 1,6 mM (fabricado por Sigma Co., Ltd.), dimetilformamida al 1 %, tartrato sódico 50 mM, tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5,0)) a 100 µl/pocillo, y se dejó que continuara la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, las células se lavaron dos veces con agua destilada y, posteriormente, se observaron con un microscopio (Fig. 35). Como resultado, se inhibió la formación de osteoclastos multinucleados positivos para TRAP de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo #32A1 dentro del intervalo de 0,3 µg/ml a 3 µg/ml.

- 50 c) Efecto de la adición de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón (#32A1) sobre la actividad de resorción ósea de células precursoras de osteoclastos humanas normales (Evaluación usando placa revestida de colágeno)

Se sabe que los osteoclastos liberan una proteasa tal como la catepsina K y degradan el colágeno de tipo I que es un componente constitucional del tejido óseo. El kit de ensayo OsteoLyse (fabricado por Lonza, Inc., Cat. No. PA-1500) proporciona una placa de 96 pocillos revestida con colágeno humano conjugado con europio (placa de cultivo celular OsteoLyse de 96 pocillos), y es posible evaluar la actividad de resorción ósea de los osteoclastos *in vitro* midiendo la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescentes liberados en el sobrenadante cuando se cultivan los osteoclastos en la placa.

Se sembraron células precursoras de osteoclastos humanas normales (Normal Human Natural Osteoclast Precursor Cells, adquiridas en Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) en una placa de cultivo celular OsteoLyse de 96

pocillos a 1×10^4 células/pocillo según el protocolo proporcionado con las células. Como medio, se usó un medio esencial mínimo para células precursoras de osteoclastos (OPBM, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-8201) suplementado con un kit de suplemento OPGM (Kit Osteoclast SingleQuot™, adquirido en Sanko Junyaku Co., Ltd., N° de Cat. PT-9501) que contenía suero bovino fetal (concentración final: 10 %), RANKL humano (concentración final: 68,4 ng/ml), M-CSF humano (concentración final: 33 ng/ml) y similares. Al sobrenadante de cultivo resultante, se le añadió el anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 de ratón (anticuerpo #32A1), preparado en el Ejemplo 24 para dar una concentración final de 0,1, 0,3, 1, o 3 µg/ml, y las células se incubaron durante 3 días en un incubador con CO₂. Se recogió una alícuota de 10 µl del sobrenadante de cultivo y se le añadieron 200 µl de Reactivo de Liberación de Fluoróforo incluido en el kit de ensayo OsteoLyse, y se midió la intensidad de fluorescencia (Excitación: 340 nm, Emisión: 615 nm) usando un lector de placas de fluorescencia (ARVO MX, fabricado por Perkin Elmer Inc.), con lo que se determinó la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescentes liberados en el sobrenadante de cultivo (Fig. 36). Como resultado, la cantidad de fragmentos de colágeno fluorescentes aumentada por la adición de RANKL se redujo por el anticuerpo #32A1 de una manera dependiente de la concentración dentro del intervalo de 0,3 µg/ml a 3 µg/ml. Por este resultado, se reveló que la actividad de resorción ósea de los osteoclastos humanos se inhibe por el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína Siglec-15.

Ejemplo 38. Producción de anticuerpo monoclonal de ratón anti-Siglec-15 humano

Es posible producir un anticuerpo anti-Siglec-15 humano mediante las etapas descritas a continuación.

(1) Inmunización

La proteína Siglec-15 humana soluble obtenida en los Ejemplos 30 a 32 se administra por vía intraperitoneal a un ratón BALB/c hembra con una edad de 4 a 10 semanas. Después de 2 semanas, al ratón se le administra por vía intraperitoneal la misma solución de fracción de membrana para conseguir una inmunización de refuerzo.

(2) Fusión celular

Se resecciona el bazo del ratón tres días después de la inmunización de refuerzo, se pone en un medio sin suero y se tritura sobre una malla con una espátula. La suspensión de células que pasa a través de la malla se centrifuga para precipitar las células de bazo.

Por otra parte, se lavan células de mieloma NS1 (Colección Americana de Cultivos Tipo TIB-18) con un medio sin suero y se suspenden de la misma manera.

Usando las células que expresan Siglec-15 obtenidas de esta manera y células de mieloma, se realiza la fusión celular según un procedimiento común.

(3) Selección

Las células fusionadas que producen anticuerpo anti-Siglec-15 humano pueden seleccionarse por un procedimiento que usa ELISA de células y un procedimiento que usa un citómetro de flujo.

(4) Clonación

Para un grupo de células seleccionadas en el punto (3) anterior, se repite 5 veces una serie de etapas que comprenden el procedimiento que usa el ELISA celular y el procedimiento que usa un citómetro de flujo descrito en el punto (3), con lo que pueden obtenerse varios clones de hibridomas capaces de producir un solo anticuerpo que se une a células que expresan Siglec-15 humano, pero no se une a las células antes de la transfección.

(5) Purificación de anticuerpo

Se cultiva un hibridoma ratón-ratón producido mediante las etapas (1) a (4) y se recoge el sobrenadante resultante. Después de recoger y dializar el sobrenadante obtenido, se realiza la purificación parcial del anticuerpo usando un aparato de cromatografía líquida de alta resolución. Se analiza el título de anticuerpo anti-Siglec-15 humano en cada fracción de cromatografía por un procedimiento ELISA usando la proteína Siglec-15 humana. Se recogen las fracciones que tienen un alto título de anticuerpo y se aplican a una columna de purificación de anticuerpos por afinidad. Después de lavar el interior de la columna con un tampón de equilibrado de columna, el anticuerpo se eluye con un tampón de elución de columna. Inmediatamente después de terminar la elución, cada eluato se aplica en la parte superior de un ultrafiltro para centrifuga y se centrifuga. Después se retira el filtrado recogido en la parte inferior del filtro y se realiza un lavado 5 veces añadiendo PBS en la parte superior. El líquido que queda en la parte superior del filtro se usa como muestra de anticuerpo anti-Siglec-15 humano.

Ejemplo 39. Producción de anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 humano

Puede producirse un anticuerpo monoclonal de rata anti-Siglec-15 humano usando la proteína Siglec-15 humana soluble obtenida en los Ejemplos 30 a 32 por el procedimiento descrito en los Ejemplos 23 y 24.

Ejemplo 40. Efecto de anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 humano sobre la diferenciación de osteoclastos

Mediante el uso del anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 humano obtenido en el Ejemplo 38 o 39, puede ensayarse el efecto inhibitor del anticuerpo sobre la formación de osteoclastos. Para ensayar el efecto sobre la formación de osteoclastos en ratón, puede usarse el procedimiento del Ejemplo 17, 19, 20, 21, 22 o 26. Para ensayar el efecto inhibitor sobre la formación de osteoclastos humanos, puede usarse el procedimiento del Ejemplo 35 o 37.

Aplicabilidad Industrial

El anticuerpo anti-Siglec-15 descrito en la presente memoria tiene la capacidad de inhibir la diferenciación de osteoclastos o la actividad de resorción ósea, y una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-Siglec-15 puede ser un agente terapéutico o preventivo para una enfermedad de metabolismo óseo anormal.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Anticuerpo que se dirige a la proteína Siglec-15 relacionada con osteoclastos

<130> PN789398EPA

<150> JP2007-265420

<151> 11-10-2007

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 987

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(987)

<400> 1

atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc cgg	48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro	
1 5 10 15	
aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc	96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu	
20 25 30	
aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg	144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val	
35 40 45	
cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc	192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys	
50 55 60	
acc ttc acg cac cgg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc	240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct	288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala	
85 90 95	
gcg gcg ccg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc	336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly	
100 105 110	
cgc ttc ccg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc	384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg	
115 120 125	
gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc	432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val	
130 135 140	
gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc	480

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val	
145	150 155 160
cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg	528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu	
	165 170 175
ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag	576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu	
	180 185 190
cgg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc gcc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg	624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu	
	195 200 205
gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc	672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala	
	210 215 220
gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac gcc cgc tac acg tgt acg gcc gcc	720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala	
	225 230 235 240
aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat	768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His	
	245 250 255
ggc gcc agc ggg gcc tcg acg gtc gcc ctc ctg ctc ggc gct ctc gcc	816
Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly	
	260 265 270
ttc aag gcg ctg ctg ctg ctc ggg gtc ctg gcc gcc cgc gct gcc cgc	864
Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg	
	275 280 285
cgc cgc cca gag cat ctg gac acc ccg gac acc cca cca cgg tcc cag	912
Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln	
	290 295 300
gcc cag gag tcc aat tat gaa aat ttg agc cag atg aac ccc cgg agc	960
Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser	
	305 310 315 320
cca cca gcc acc atg tgc tca ccg tga	987
Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro	
	325

<210> 2
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
 1 5 10 15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
 20 25 30

10

ES 2 677 246 T3

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35 40 45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50 55 60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65 70 75 80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
 85 90 95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
 245 250 255

Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
 260 265 270

Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
 275 280 285

ES 2 677 246 T3

Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
 290 295 300

Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro
 325

<210> 3
 <211> 1026
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1026)

<400> 3

atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag	48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln	
1 5 10 15	
atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc	96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu	
20 25 30	
aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg	144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val	
35 40 45	
ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc	192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys	
50 55 60	
acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc	240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc	288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr	
85 90 95	
gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc	336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly	
100 105 110	
cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc	384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg	
115 120 125	
gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg	432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val	
130 135 140	
gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc	480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val	
145 150 155 160	

ES 2 677 246 T3

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg	528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu	
165 170 175	
ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag	576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu	
180 185 190	
ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc	624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser	
195 200 205	
gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg	672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu	
210 215 220	
ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc	720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser	
225 230 235 240	
ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc	768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala	
245 250 255	
ccc gga acc tcg acc cta gcg ctc ctg ctg ggc gcg ctg ggc ctc aag	816
Pro Gly Thr Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly Leu Lys	
260 265 270	
gcc ttg ctg ctg ctt ggc att ctg gga gcg cgt gcc acc cga cgc cga	864
Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Gly Ala Arg Ala Thr Arg Arg Arg	
275 280 285	
cta gat cac ctg gtc ccc cag gac acc cct cca cgg tct cag gct cag	912
Leu Asp His Leu Val Pro Gln Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln Ala Gln	
290 295 300	
gag tcc aat tat gaa aat ttg agc cag atg agt cct cca ggc cac cag	960
Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Ser Pro Pro Gly His Gln	
305 310 315 320	
ctg cca cgt gtt tgc tgt gag gaa ctc ctc agc cat cac cat cta gtc	1008
Leu Pro Arg Val Cys Cys Glu Glu Leu Leu Ser His His His Leu Val	
325 330 335	
att cac cat gag aaa taa	1026
Ile His His Glu Lys	
340	

<210> 4
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 4

Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
 1 5 10 15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
 20 25 30

10

ES 2 677 246 T3

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35 40 45
 Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50 55 60
 Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
 85 90 95
 Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110
 Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140
 Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190
 Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
 195 200 205
 Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
 245 250 255
 Pro Gly Thr Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly Leu Lys
 260 265 270
 Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Gly Ala Arg Ala Thr Arg Arg Arg

ES 2 677 246 T3

275

280

285

Leu Asp His Leu Val Pro Gln Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln Ala Gln
290 295 300

Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Ser Pro Pro Gly His Gln
305 310 315 320

Leu Pro Arg Val Cys Cys Glu Glu Leu Leu Ser His His His Leu Val
325 330 335

Ile His His Glu Lys
340

- 5 <210> 5
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Cebador de PCR de ADNc de Siglec-15 de ratón
- 10 <400> 5
agaattccac catggagggg tcctccaac tc 32
- 15 <210> 6
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Cebador de PCR de ADNc de Siglec-15 de ratón
- <400> 6
cgccgctcga gttatttc atgggtaatg ac 32
- 25 <210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Cebador de PCR de ADNc de Siglec-15 de ratón
- <400> 7
tcaggctcag gagtccaatt at 22
- 35 <210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Cebador de PCR de ADNc de Siglec-15 de ratón
- <400> 8
ggctctagcct ggtactgtcc ttt 23
- 45 <210> 9
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 677 246 T3

<220>
<223> Sonda de detección de ADNc de Siglec-15 de ratón

<400> 9
5 atttgagcca gatgagtcct ccaggcca 28

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de proteína ribosómica L32 de ratón

<400> 10
15 aagaagtca tcaggcacca gt 22

<210> 11
<211> 22
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de proteína ribosómica L32 de ratón

<400> 11
25 cttgacattg tggaccagga ac 22

<210> 12
<211> 28
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de detección de ADNc de proteína ribosómica L32 de ratón

<400> 12
35 aaaccagag gcattgacaa cagggtgc 28

<210> 13
<211> 22
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de catepsina K de ratón

<400> 13
45 ggcatcttc cagttttaca gc 22

<210> 14
<211> 22
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de catepsina K de ratón

<400> 14
60 gttgtctta ttccgagcca ag 22

<210> 15
<211> 28
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección de ADNc de catepsina K de ratón
 5
 <400> 15
 atgtgaacca tgcagtggtg gtggtggg 28
 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de TRAP de ratón
 15
 <400> 16
 gaactcccc agcccttact ac 22
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de TRAP de ratón
 25
 <400> 17
 aactgctttt tgagccagga c 21
 30
 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Sonda de detección de ADNc de TRAP de ratón
 <400> 18
 ttgccagtca gcagcccaaa atgcct 26
 40
 <210> 19
 <211> 774
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(774)
 45
 <400> 19
 50

ES 2 677 246 T3

atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag	48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln	
1 5 10 15	
atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc	96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu	
20 25 30	
aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg	144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val	
35 40 45	
ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc	192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Val Leu Pro Cys	
50 55 60	
acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc	240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc	288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr	
85 90 95	
gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc	336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly	
100 105 110	
cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc	384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg	
115 120 125	
gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg	432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val	
130 135 140	
gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc	480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val	
145 150 155 160	
cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg	528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu	
165 170 175	
ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag	576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu	
180 185 190	
ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc	624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser	
195 200 205	
gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg	672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu	

ES 2 677 246 T3

```

                210                215                220
ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                230                235                240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                250                255

ccc gga      774
Pro Gly

```

5
 <210> 20
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 20

```

Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1                5                10                15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
                20                25                30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
35                40                45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
50                55                60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                70                75                80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
85                90                95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
100                105                110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
115                120                125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130                135                140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                150                155                160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu

```


ES 2 677 246 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Cebador de secuenciación de ADNc de Siglec-15 soluble de ratón

<400> 24
 cctcgcctgg tcgggtc 17

10 <210> 25
 <211> 891
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> ADNc de Siglec-15 de ratón marcado con His

<220>
 <221> CDS
 20 <222> (1)..(891)

<400> 25

atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag	48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln	
1 5 10 15	
atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tgc ggg gat ctg ctc	96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu	
20 25 30	
aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg	144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val	
35 40 45	
ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct gcc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc	192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys	
50 55 60	
acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc	240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg cgc tgc ggc gag ccg tac gcg gcc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc	288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr	
85 90 95	
gcg gcg ccg gcc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac gcc	336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly	
100 105 110	
cgc ttc cgc ctg ctg gcc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc	384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg	
115 120 125	
gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc gcc cgc tac ttc tgc cgc gtg	432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val	
130 135 140	
gag ttc acc gcc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc	480

ES 2 677 246 T3

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val	
145	150 155 160
cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg	528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu	
	165 170 175
ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag	576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu	
	180 185 190
ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc	624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser	
	195 200 205
gct gcc ctg cag gcc cag ggt cac gcc tac cag gtg acc gcc gag ttg	672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu	
	210 215 220
ccc gcg ctg acc cgc gac gcc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc	720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser	
	225 230 235 240
ctg gcc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac gcc gcc	768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala	
	245 250 255
ccc gga gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc gaa ggt cgt	816
Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu Gly Arg	
	260 265 270
ggg ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc gat tct acg cgt	864
Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg	
	275 280 285
acc ggt cat cat cac cat cac cat tga	891
Thr Gly His His His His His His	
	290 295

- <210> 26
- <211> 296
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Péptido de Siglec-15 de ratón marcado con His
- <400> 26

Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1 5 10 15
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
20 25 30
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
35 40 45
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys

ES 2 677 246 T3

50						55						60			
Thr	Phe	Thr	His	Pro	His	Arg	His	Tyr	Asp	Gly	Pro	Leu	Thr	Ala	Ile
65					70					75					80
Trp	Arg	Ser	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ala	Gly	Pro	Gln	Val	Phe	Arg	Cys	Thr
			85						90					95	
Ala	Ala	Pro	Gly	Ser	Glu	Leu	Cys	Gln	Thr	Ala	Leu	Ser	Leu	His	Gly
			100					105					110		
Arg	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Arg	Arg	Asn	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg
		115					120					125			
Val	Glu	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Arg	Tyr	Phe	Cys	Arg	Val
	130					135					140				
Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Ala	His	Asp	Arg	Tyr	Glu	Ser	Arg	His	Gly	Val
145					150					155					160
Arg	Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Ala	Pro	Arg	Ile	Val	Asn	Ile	Ser	Val	Leu
				165					170					175	
Pro	Gly	Pro	Ala	His	Ala	Phe	Arg	Ala	Leu	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Glu
			180					185					190		
Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Ala	Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Gly	Asn	Ser	Ser
		195					200					205			
Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Gln	Gly	His	Gly	Tyr	Gln	Val	Thr	Ala	Glu	Leu
	210					215					220				
Pro	Ala	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Arg	Tyr	Thr	Cys	Thr	Ala	Ala	Asn	Ser
225					230					235					240
Leu	Gly	Arg	Ala	Glu	Ala	Ser	Val	Tyr	Leu	Phe	Arg	Phe	His	Gly	Ala
				245					250					255	
Pro	Gly	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val	Val	Asp	Ile	Glu	Gly	Arg
			260					265					270		
Gly	Gly	Lys	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ser	Thr	Arg
		275					280					285			
Thr	Gly	His	His	His	His	His	His								
290						295									

ES 2 677 246 T3

<211> 1512
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> ADNc de Siglec-15 de ratón fusionado a Fc

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1512)

<400> 27

```

atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag      48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1                               5                               10                               15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc      96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
                               20                               25                               30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
                               35                               40                               45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc     192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
                               50                               55                               60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                               70                               75                               80

tgg cgc tcg gcc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc     288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                               85                               90                               95

gcg gcg ccg gcc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac gcc     336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
                               100                              105                              110

cgc ttc cgc ctg ctg gcc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
                               115                              120                              125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc gcc cgc tac ttc tgc cgc gtg     432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
                               130                              135                              140

gag ttc acc gcc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc     480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                              150                              155                              160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg     528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                               165                              170                              175

ccg gcc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag     576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
                               180                              185                              190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca gcc aac agc tcc     624
    
```

ES 2 677 246 T3

Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Ala	Trp	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Gly	Asn	Ser	Ser		
			195				200					205					
gct	gcc	ctg	cag	ggc	cag	ggt	cac	ggc	tac	cag	gtg	acc	gcc	gag	ttg		672
Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Gln	Gly	His	Gly	Tyr	Gln	Val	Thr	Ala	Glu	Leu		
	210					215				220							
ccc	gcg	ctg	acc	cgc	gac	ggc	cgc	tac	acg	tgc	acg	gcg	gcc	aat	agc		720
Pro	Ala	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Arg	Tyr	Thr	Cys	Thr	Ala	Ala	Asn	Ser		
225				230						235				240			
ctg	ggc	cgc	gcc	gag	gcc	agc	gtc	tac	ctg	ttc	cgc	ttc	cac	ggc	gcc		768
Leu	Gly	Arg	Ala	Glu	Ala	Ser	Val	Tyr	Leu	Phe	Arg	Phe	His	Gly	Ala		
			245					250						255			
ccc	gga	gac	cca	gct	ttc	ttg	tac	aaa	gtg	gtt	gat	atc	cag	gca	gag		816
Pro	Gly	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val	Val	Asp	Ile	Gln	Ala	Glu		
			260					265					270				
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct		864
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
	275						280					285					
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag		912
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
	290					295					300						
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg		960
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
305				310						315					320		
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac		1008
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
			325					330						335			
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac		1056
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
			340				345							350			
aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac		1104
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
	355						360					365					
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc		1152
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
	370					375					380						
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga		1200
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
385				390						395					400		
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag		1248
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
			405						410					415			
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac		1296
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
			420					425					430				
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag		1344
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
		435					440					445					

ES 2 677 246 T3

```

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc      1392
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450                               455                               460

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca      1440
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 465                               470                               475                               480

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc      1488
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                               485                               490                               495

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa      1512
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                               500

```

<210> 28
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido de Siglec-15 de ratón fusionado a Fc

10

<400> 28

```

Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
 1                               5                               10                               15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
                               20                               25                               30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
                               35                               40                               45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50                               55                               60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65                               70                               75                               80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                               85                               90                               95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
                               100                               105                               110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
                               115                               120                               125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130                               135                               140

```

ES 2 677 246 T3

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190
 Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
 195 200 205
 Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
 245 250 255
 Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln Ala Glu
 260 265 270
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 275 280 285
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 305 310 315 320
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 325 330 335
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 340 345 350
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 355 360 365
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 370 375 380
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 385 390 395 400

ES 2 677 246 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

- 5 <210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de Siglec-15 humano
 <400> 29
 attaagcttc accatggaaa agtccatctg gctgc 35
- 15 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de Siglec-15 humano
 <400> 30
 agtggatcct cacggtgagc acatggtggc 30
- 25 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de catepsina K humana
 <400> 31
 ccgcagtaat gacaccctt 20
- 35 <210> 32

ES 2 677 246 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de catepsina K humana

<400> 32
aaggcattgg tcatgtagcc 20

10 <210> 33
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sonda de detección de ADNc de catepsina K humana

20 <400> 33
tcagggtcag tgtggttct gttggct 28

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de TRAP humana

30 <400> 34
ctgtcctggc tcaagaaaca 20

<210> 35
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de TRAP humana

40 <400> 35
ccatagtgga agcgagata 20

45 <210> 36
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sonda de detección de ADNc de TRAP humana

<400> 36
tgagaatggc gtgggtacg tgctgagt 28

55 <210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de Siglec-15 humano

<400> 37
cagccaccaa catccattc 20

ES 2 677 246 T3

5
<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de Siglec-15 humano

10
<400> 38
cgctcaagct aatgcgtgta 20

15
<210> 39
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de detección de ADNc de Siglec-15 humano

20
<400> 39
aagaacaaag gccagtgcca ggcttggc 28

25
<210> 40
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de proteína ribosómica L32 humana

30
<400> 40
gagatcgctc acaatgtttc ct 22

35
<210> 41
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Cebador para PCR de ADNc de proteína ribosómica L32 humana

<400> 41
gatgccagat gccagtttt ac 22

45
<210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Sonda de detección de ADNc de proteína ribosómica L32 humana

<400> 42
accgcaaagc catcgtggaa agagctg 27

55
<210> 43
<211> 780
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

60
<220>
<221> CDR
<222> (1)..(780)

ES 2 677 246 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(780)

5 <400> 43

atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro 1 5 10 15	48
aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu 20 25 30	96
aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val 35 40 45	144
cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys 50 55 60	192
acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile 65 70 75 80	240
tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala 85 90 95	288
gcg gcg ccg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac gcc Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly 100 105 110	336
cgc ttc ccg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg 115 120 125	384
gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val 130 135 140	432
gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac gcc gtc Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val 145 150 155 160	480
ccg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg ccg atc gtc aac atc tcg gtg ctg Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu 165 170 175	528
ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu 180 185 190	576
ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu 195 200 205	624
gca gcc gtg ccg agc ccg cgt gag ggt cac gcc cac cta gtg acc gcc Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala 210 215 220	672
gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac gcc cgc tac acg tgt acg gcc gcc Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala 225 230 235 240	720
aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His 245 250 255	768
ggc gcc agc ggg Gly Ala Ser Gly 260	780

ES 2 677 246 T3

<210> 44
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 44

```

Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
 1                               10                    15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
 20                               25                    30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35                               40                    45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50                               55                    60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65                               70                    75                    80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
 85                               90                    95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
100                               105                    110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
115                               120                    125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130                               135                    140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                               150                    155                    160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
165                               170                    175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180                               185                    190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
195                               200                    205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
210                               215                    220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                               230                    235                    240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
245                               250                    255

Gly Ala Ser Gly
260
    
```

10

ES 2 677 246 T3

<210> 45
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de Siglec-15 humano soluble
 <400> 45
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggaa aagtccatct ggctgc 56
 10
 <210> 46
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador para PCR de ADNc de Siglec-15 humano soluble
 <400> 46
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc cccgctggcg ccatggaagc gg 52
 20
 <210> 47
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> ADNc de Siglec-15 humano marcado con His
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(897)
 <400> 47
 atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg 48
 Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
 1 5 10 15
 aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc 96
 Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
 20 25 30
 aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg 144
 Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35 40 45
 cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc 192
 Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50 55 60
 acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc 240
 Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct 288
 Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
 85 90 95
 gcg gcg ccg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac gcc 336
 Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110
 cgc ttc ccg ctg ctg gcc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc 384
 Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc 432
 Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140
 gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac gcc gtc 480
 Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg 528
 Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag 576
 Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190

35

ES 2 677 246 T3

```

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
      195                200                205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
      210                215                220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
      225                230                235                240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
      245                250                255

ggc gcc agc ggg gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc gaa      816
Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu
      260                265                270

ggt cgt ggg ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc gat tct      864
Gly Arg Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
      275                280                285

acg cgt acc ggt cat cat cac cat cac cat tga      897
Thr Arg Thr Gly His His His His His His
      290                295

```

5
 <210> 48
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Péptido de Siglec-15 humano marcado con His

<400> 48

```

Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
 1                5                10                15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
      20                25                30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
      35                40                45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50                55                60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65                70                75                80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
      85                90                95

```

ES 2 677 246 T3

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220

Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
 245 250 255

Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu
 260 265 270

Gly Arg Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
 275 280 285

Thr Arg Thr Gly His His His His His His
 290 295

<210> 49
 <211> 1518
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADNc de Siglec-15 humano fusionado a Fc

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1518)

ES 2 677 246 T3

<400> 49

atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg	48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro	
1 5 10 15	
aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc	96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu	
20 25 30	
aac aca gag gtg cac agc tgc cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg	144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val	
35 40 45	
cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc	192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys	
50 55 60	
acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc	240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct	288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala	
85 90 95	
gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc	336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly	
100 105 110	
cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tgc ctg cgc	384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg	
115 120 125	
gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc	432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val	
130 135 140	
gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc	480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val	
145 150 155 160	
cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tgc gtg ctg	528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu	
165 170 175	
ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag	576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu	
180 185 190	
ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg	624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu	
195 200 205	
gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc	672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala	
210 215 220	
gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc	720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala	
225 230 235 240	

ES 2 677 246 T3

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat 768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
245 250 255
ggc gcc agc ggg gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc cag 816
Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln
260 265 270
gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca 864
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
275 280 285
gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa 912
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
290 295 300
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg 960
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305 310 315 320
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac 1008
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
325 330 335
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag 1056
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
340 345 350
cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac 1104
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
355 360 365
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa 1152
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
370 375 380
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag 1200
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385 390 395 400
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg 1248
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
405 410 415
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc 1296
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
420 425 430
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac 1344
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
435 440 445
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc 1392
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
450 455 460
tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc 1440
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465 470 475 480
ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag 1488
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

ES 2 677 246 T3

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205
 Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220
 Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
 245 250 255
 Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln
 260 265 270
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 275 280 285
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 290 295 300
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 305 310 315 320
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 325 330 335
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 340 345 350
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 355 360 365
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 370 375 380
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 385 390 395 400
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 405 410 415
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 420 425 430
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

ES 2 677 246 T3

435

440

445

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
450 455 460

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465 470 475 480

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
485 490 495

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ADNc que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que reconoce específicamente uno o más polipéptidos, que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en uno cualquiera de los siguientes puntos (a) a (i) e inhibe la formación de osteoclastos y/o la resorción ósea osteoclástica:
- (a) una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (b) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 328 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 10 (c) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 260 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (d) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 260 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias;
 (e) una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
 15 (f) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 341 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias;
 (g) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 258 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias; y
 (h) una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 258 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias; y
 20 (i) una secuencia de aminoácidos que incluye la sustitución, delección o adición de solo un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos descrita en (a) a (h).
2. El ADNc según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo inhibe el proceso de fusión celular de los osteoclastos.
3. El ADNc según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo inhibe la formación de osteoclastos inducida por TNF- α .
- 25 4. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo inhibe la formación de osteoclastos *in vitro* a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ o menor.
5. EL ADNc según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo inhibe la formación de osteoclastos *in vitro* a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ o menor.
- 30 6. El ADNc según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo inhibe la formación de osteoclastos *in vitro* a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ o menor, preferentemente, a una concentración de 63 ng/ml a 1 $\mu\text{g/ml}$.
7. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo inhibe la resorción ósea osteoclástica.
8. El ADNc según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo inhibe la resorción ósea osteoclástica a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ o menor, preferentemente, a una concentración de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ a 3 $\mu\text{g/ml}$.
- 35 9. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo tiene la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo producido por el hibridoma N° 32A1 (FERM BP-10999), o en el que el anticuerpo compite con un anticuerpo producido por el hibridoma N° 32A1 (FERM BP-10999), o en el que el anticuerpo tiene la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo producido por el hibridoma N° 41B1 (FERM BP-11000), o
- 40 en el que el anticuerpo compite con un anticuerpo producido por el hibridoma N° 41B1 (FERM BP-11000).
10. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
11. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo está humanizado.
12. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
13. El ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de IgG.
- 45 14. Un vector que comprende un ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Una célula eucariota transformada con un vector según la reivindicación 14.
16. Un procedimiento para producir un anticuerpo, comprendiendo el procedimiento las etapas de cultivar una célula eucariota según la reivindicación 15; y purificar el anticuerpo a partir de la misma.
17. Un anticuerpo obtenible mediante el cultivo de una célula eucariota según la reivindicación 15.

Figura 1

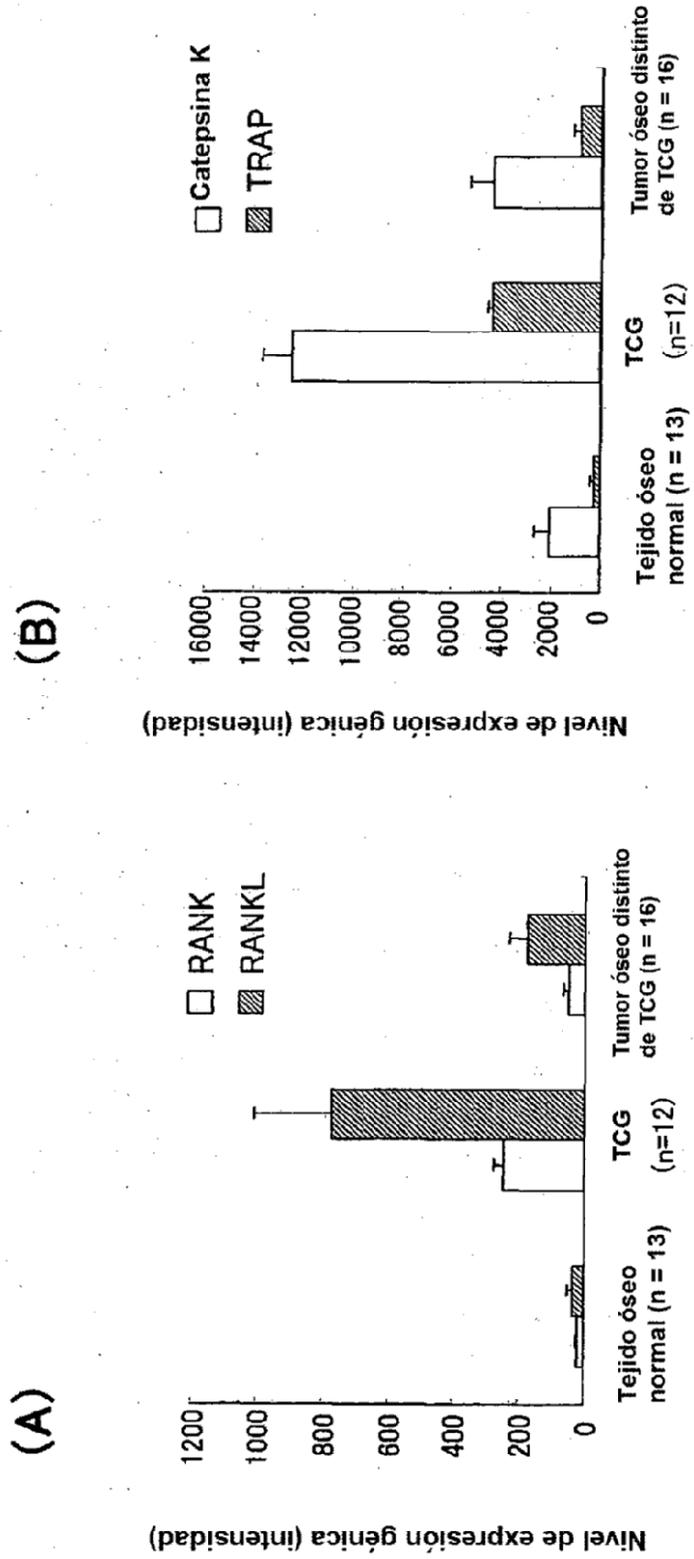


Figura 2

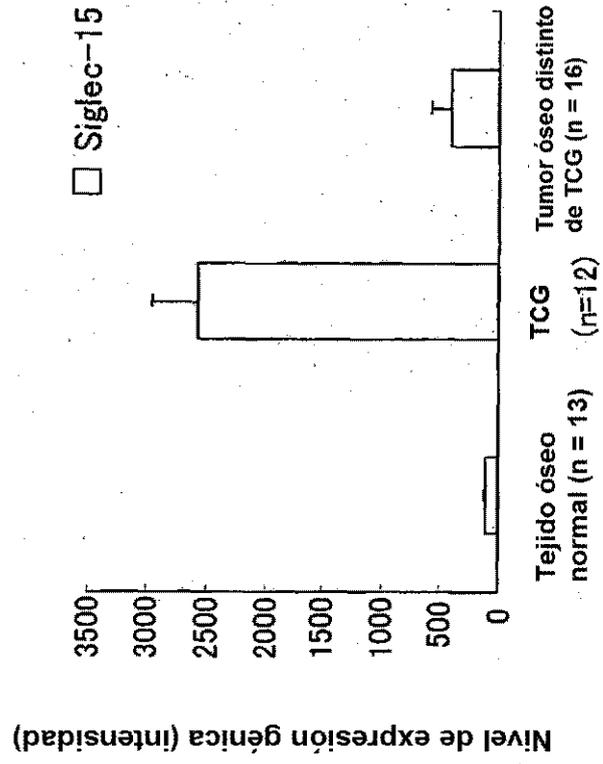


Figura 3

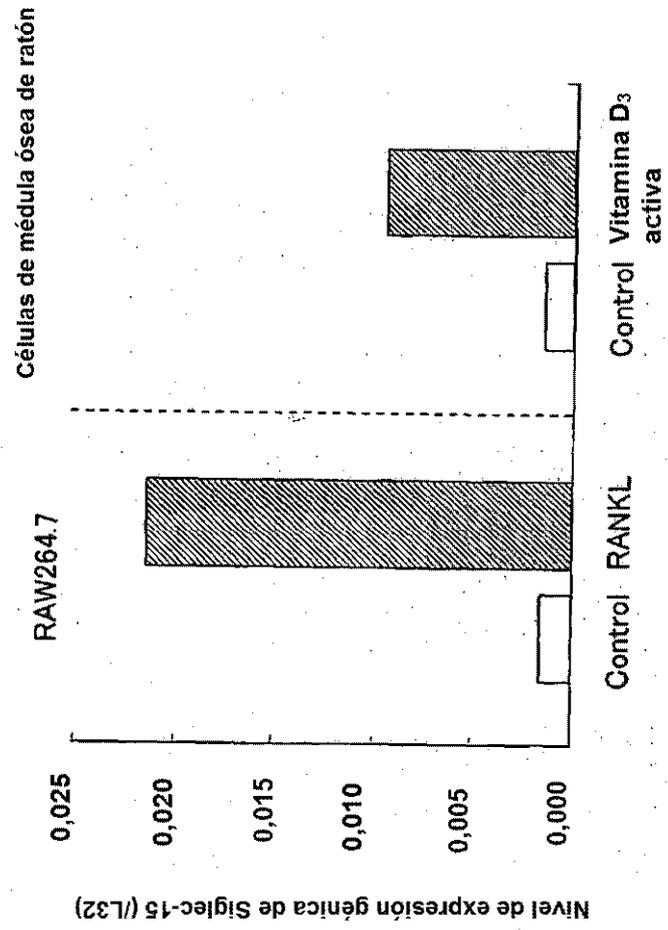


Figura 4

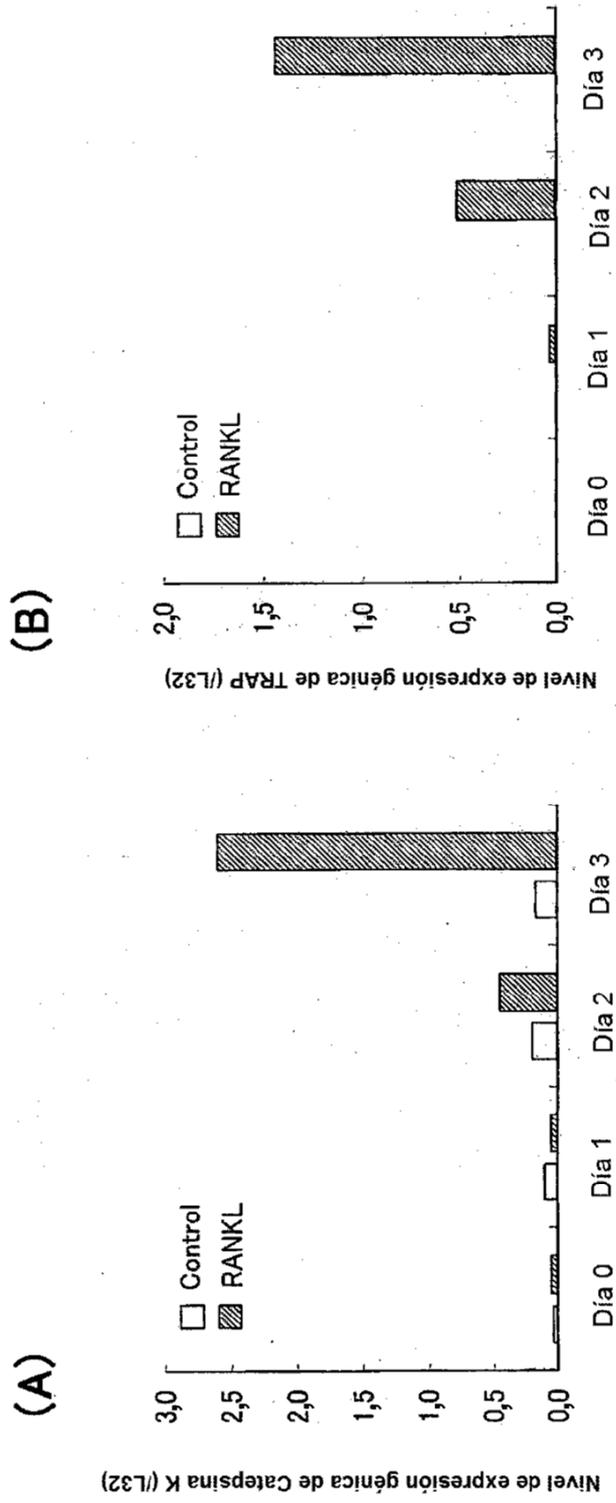


Figura 5

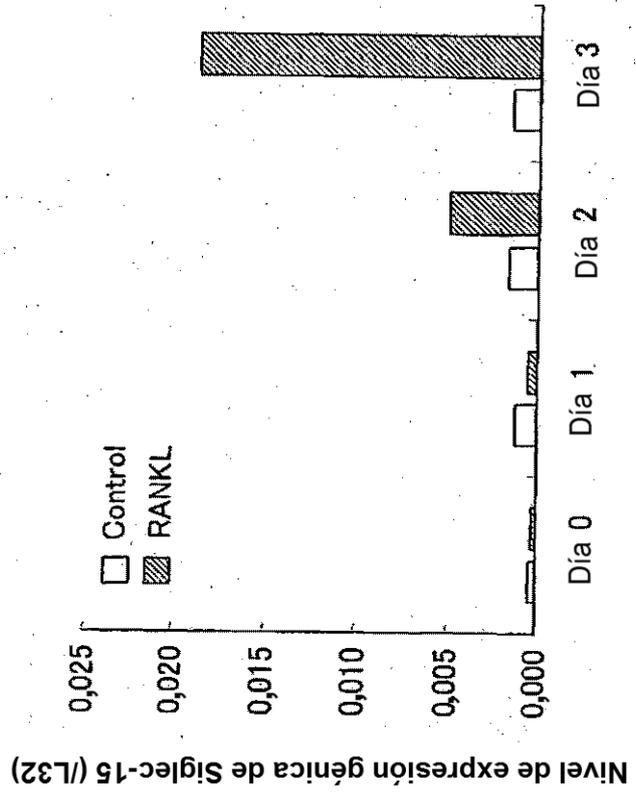


Figura 6

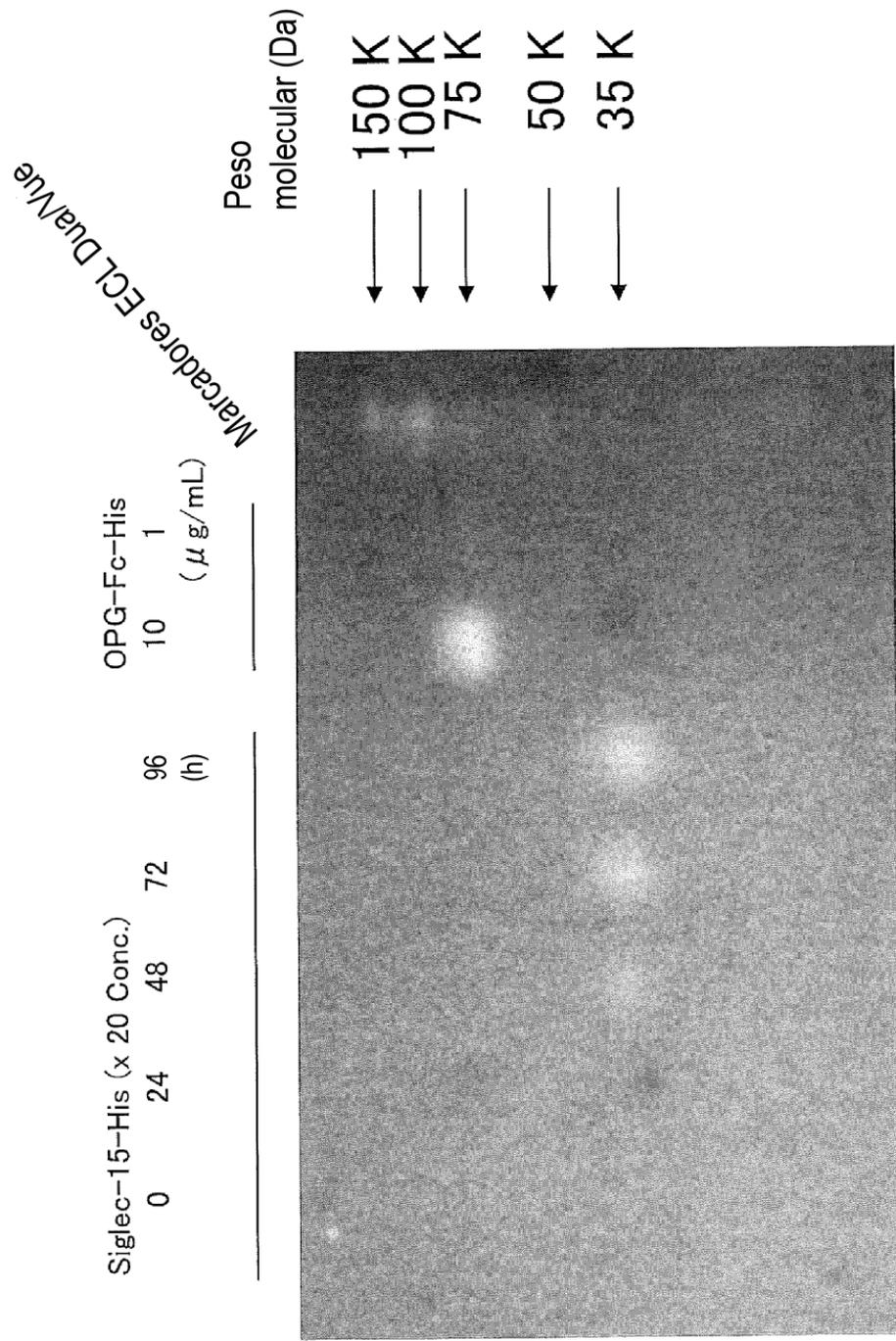


Figura 7

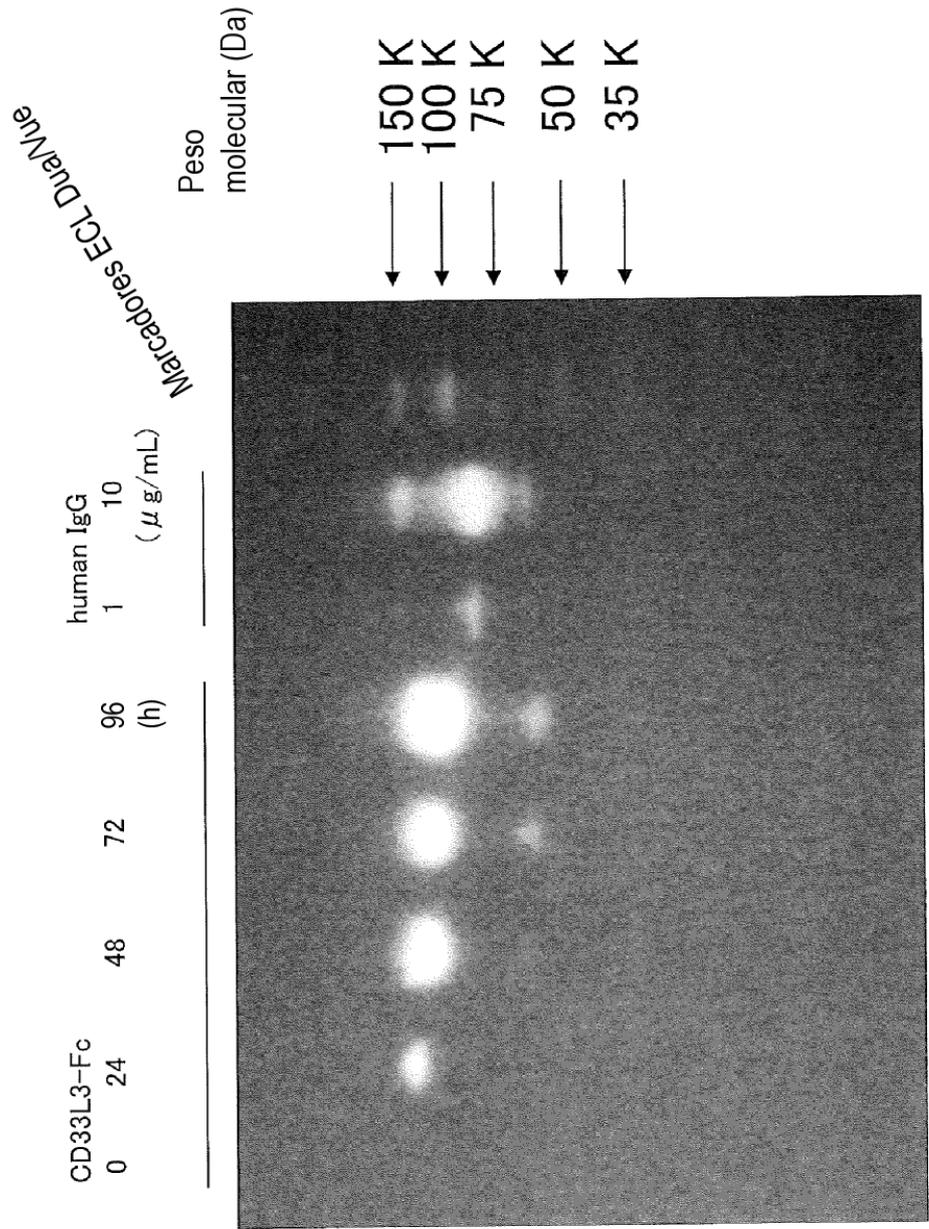


Figura 8

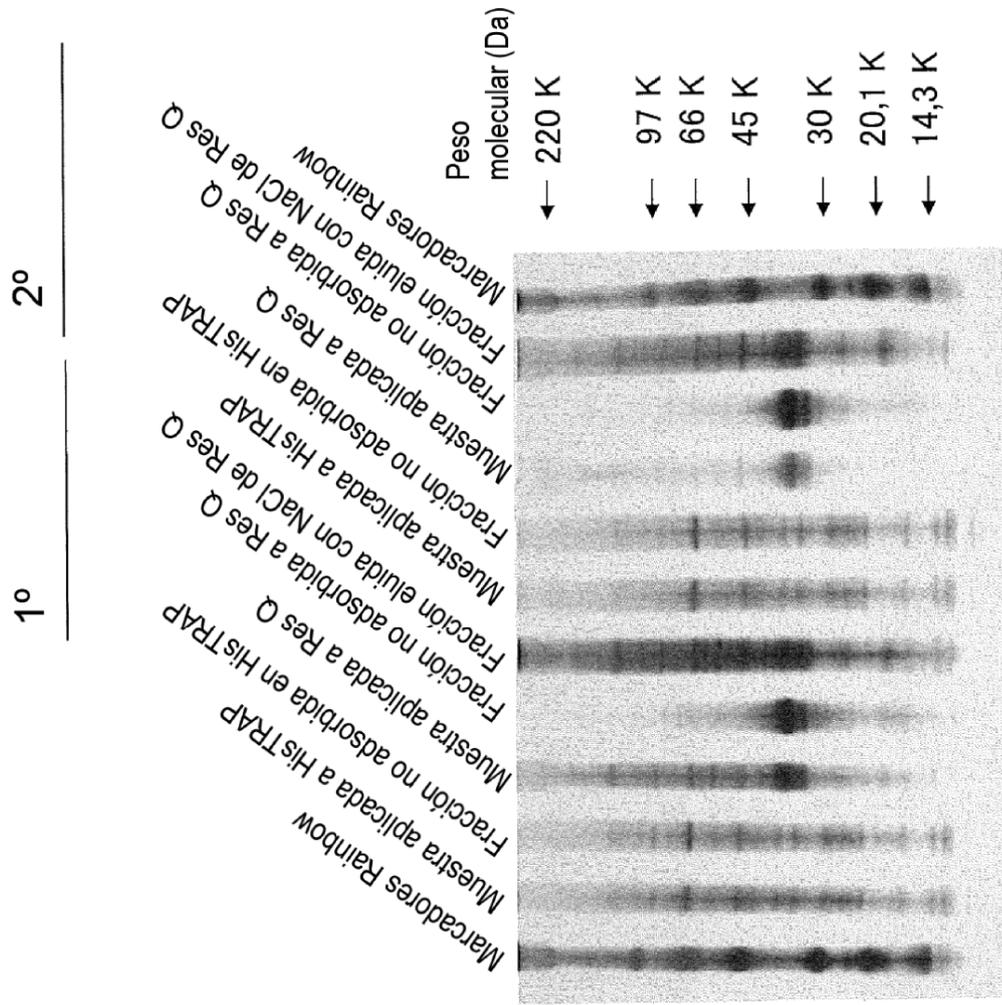


Figura 9

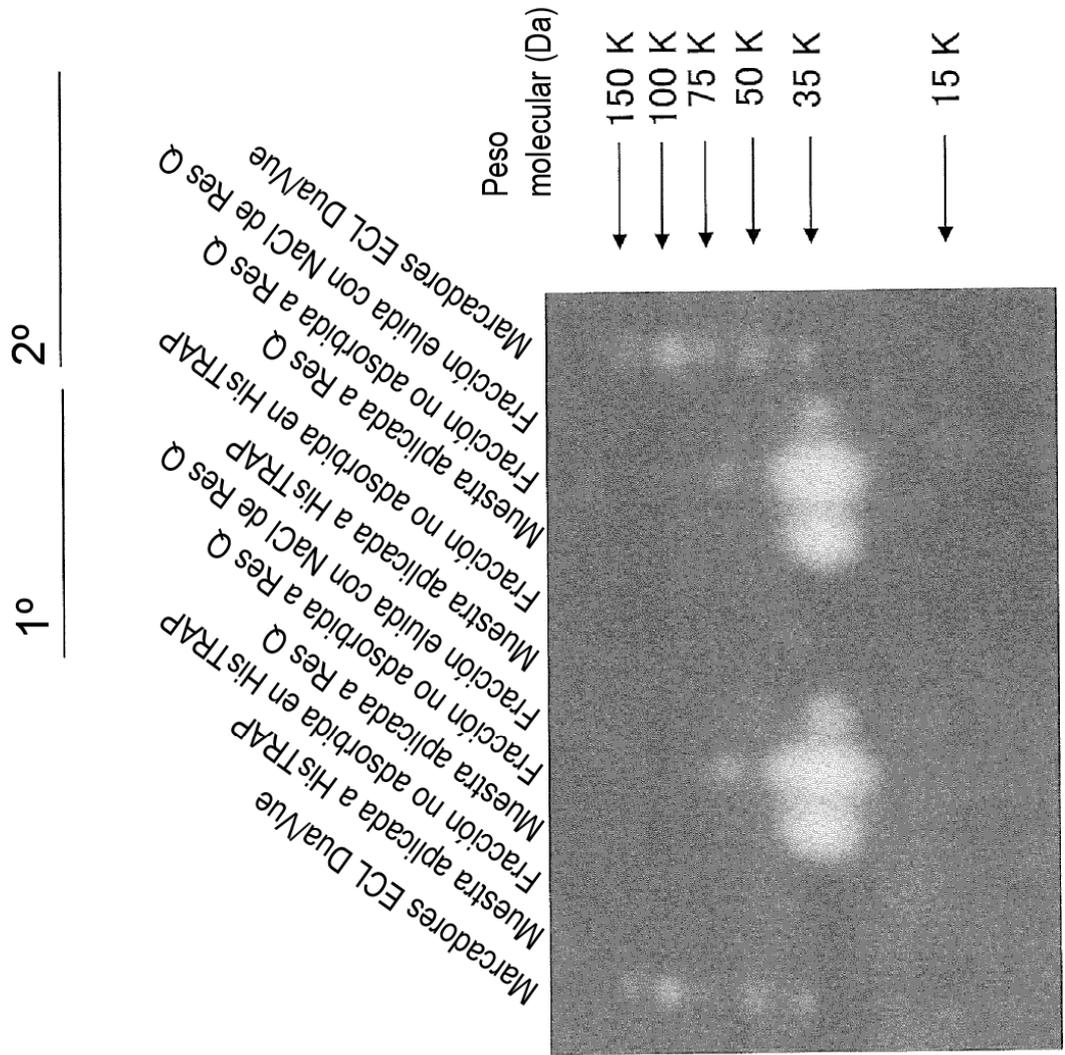


Figura 10

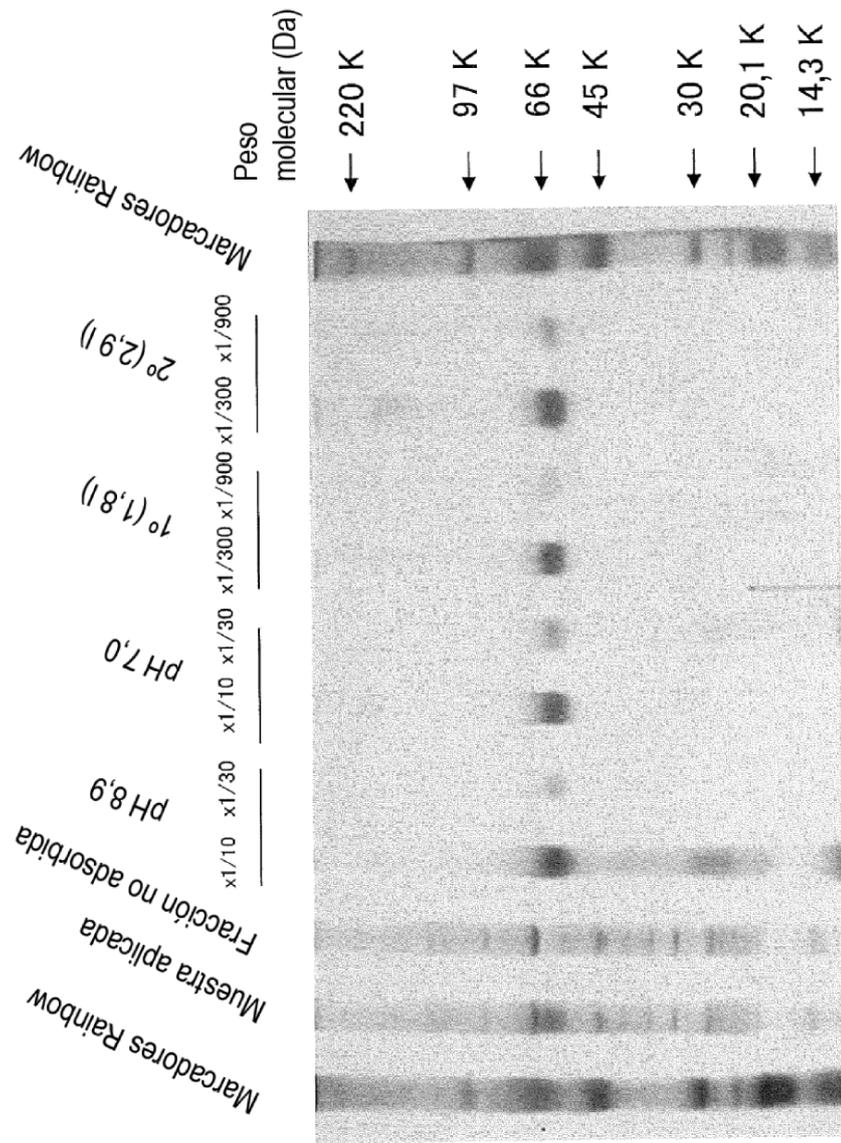


Figura 11

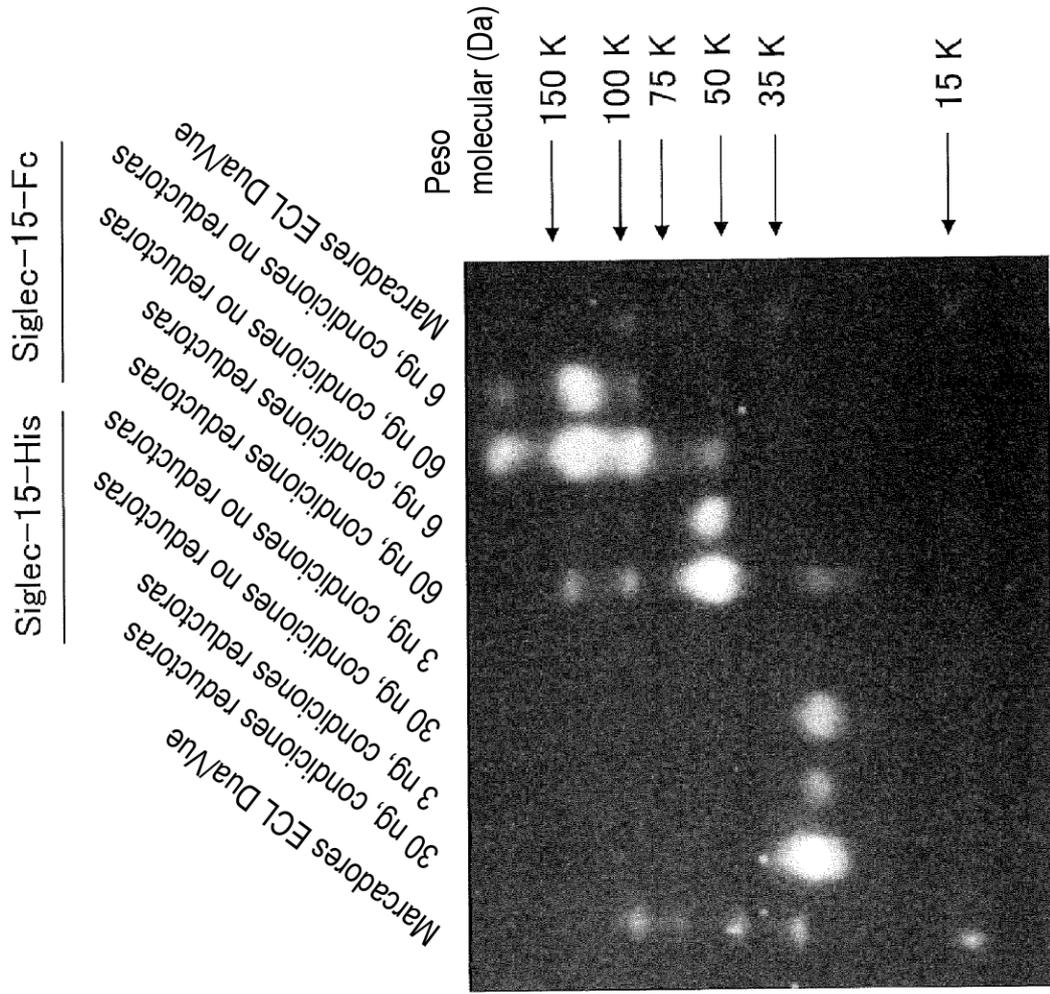


Figura 12

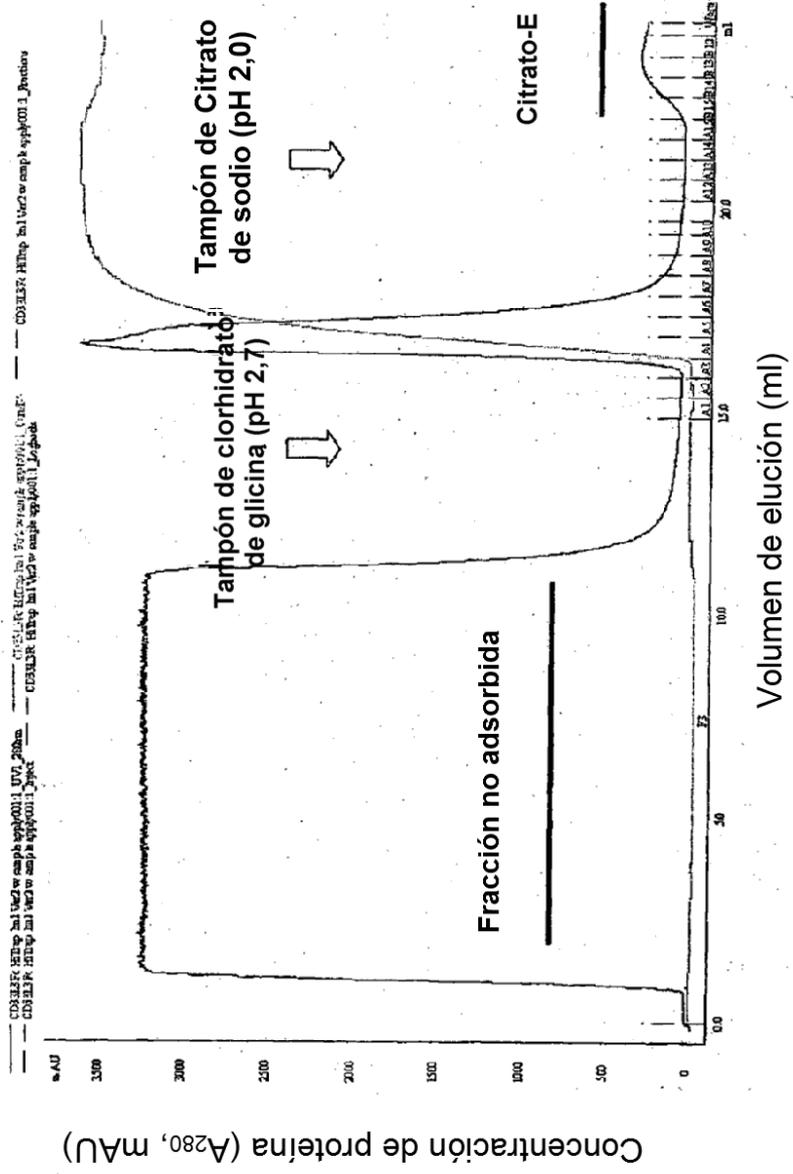


Figura 13

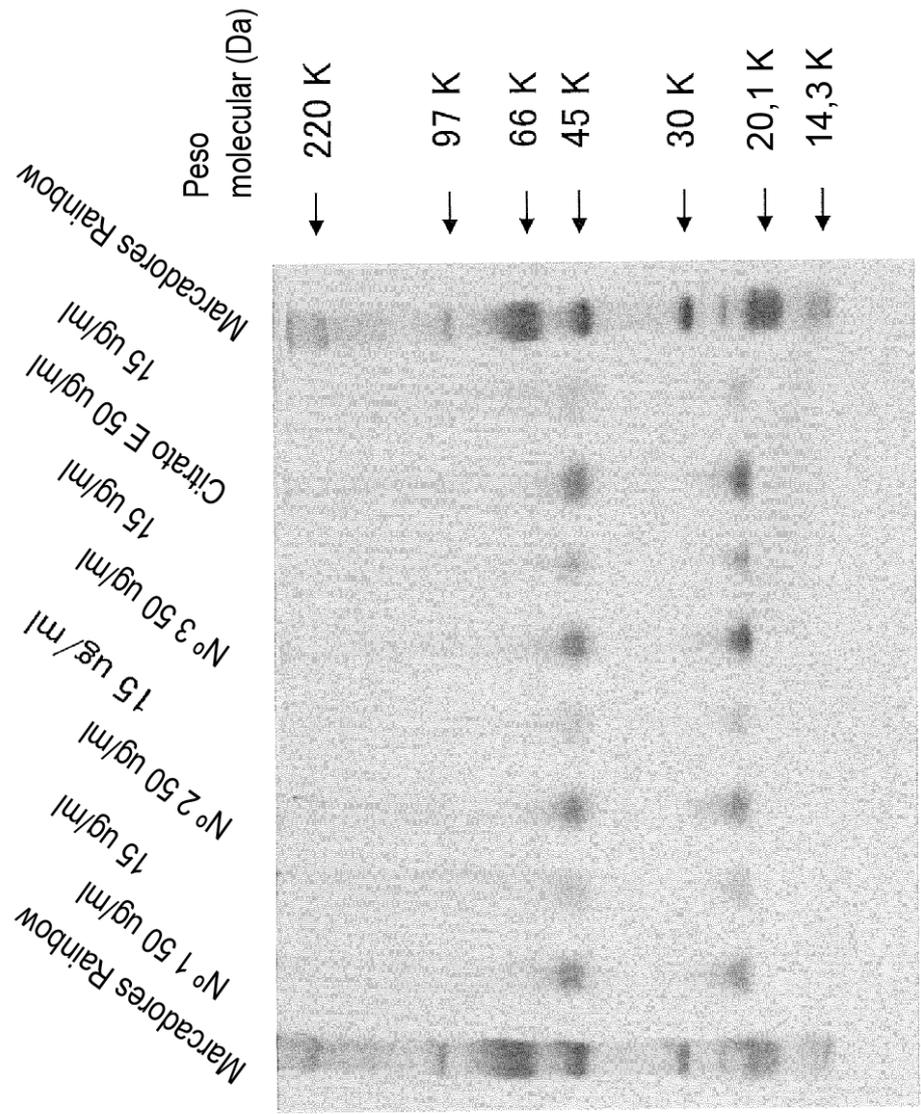


Figura 14

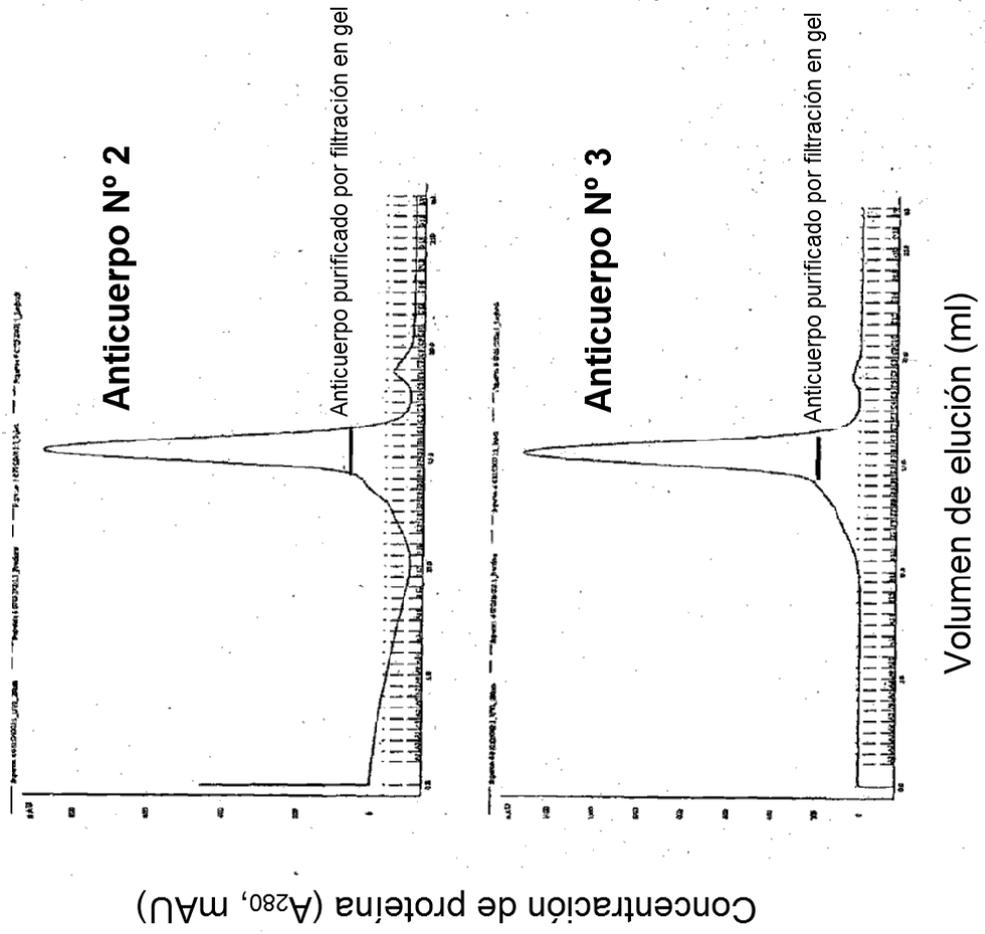


Figura 15

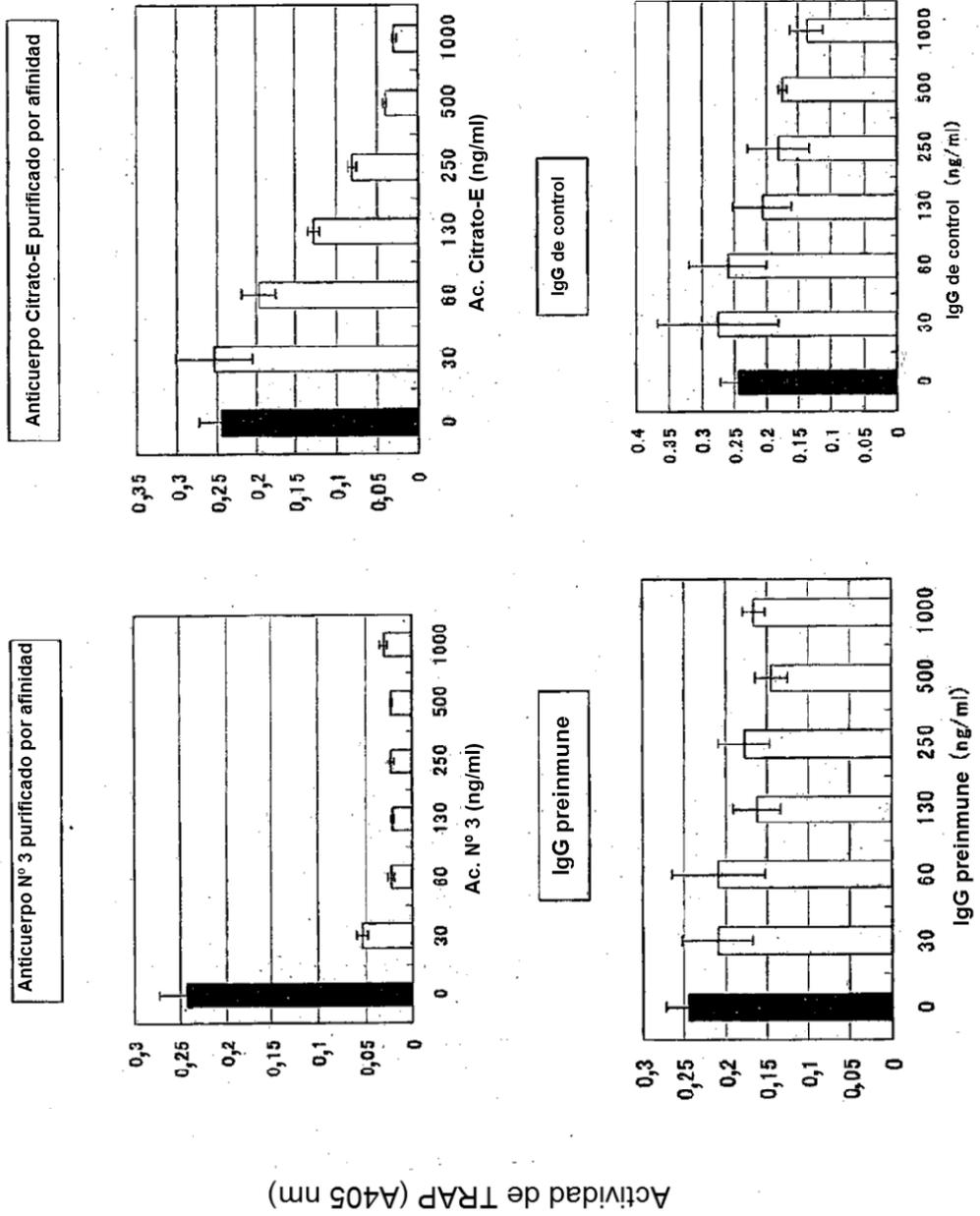


Figura 16

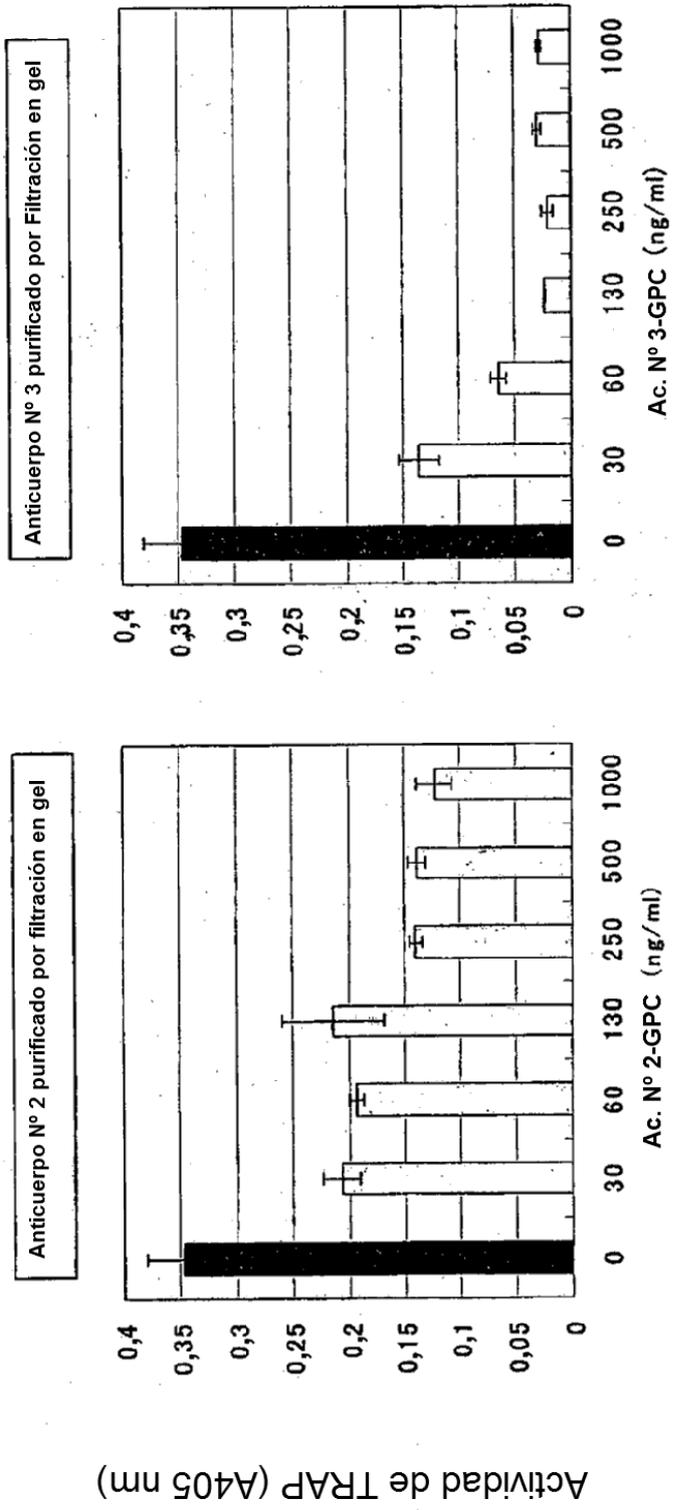


Figura 17

Actividad de TRAP (A405 nm)

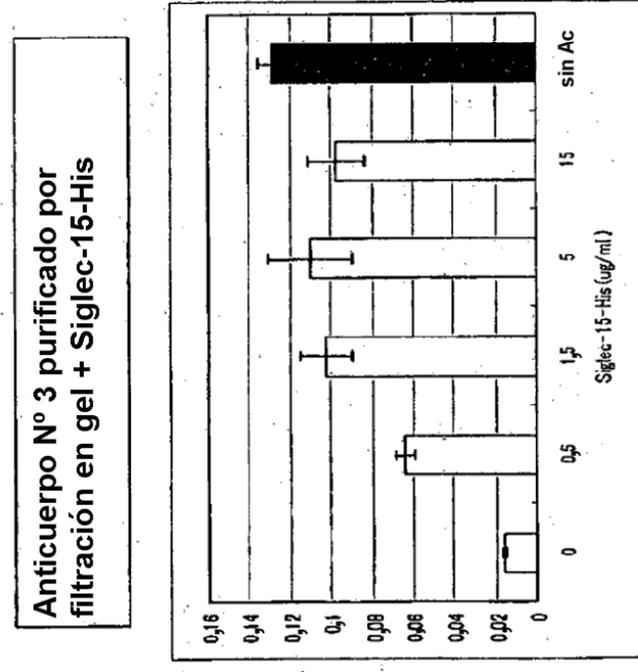
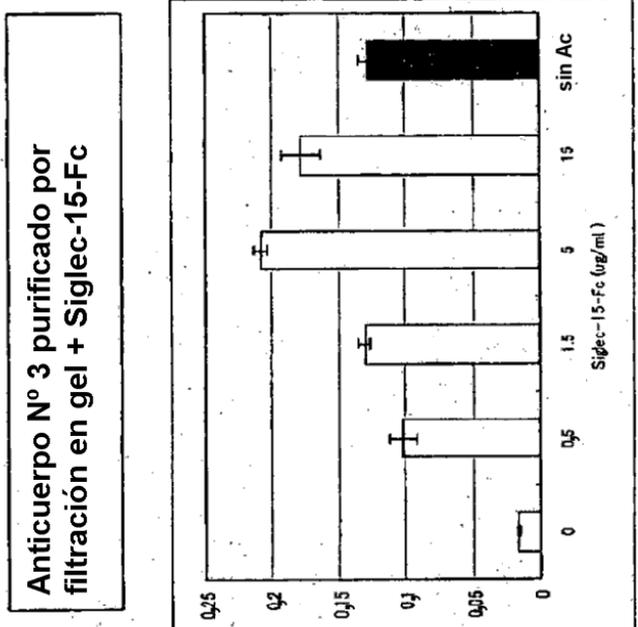


Figura 18

Actividad de TRAP (A405 nm)

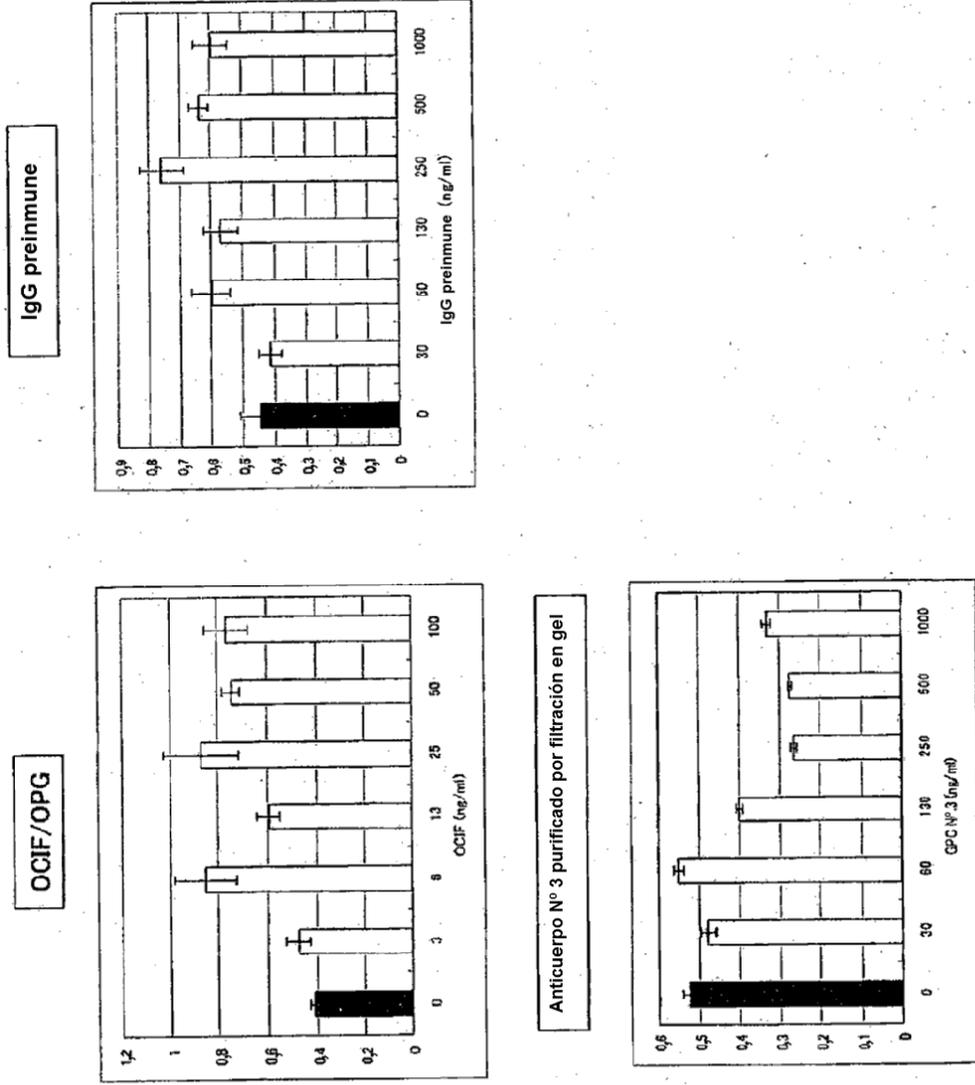
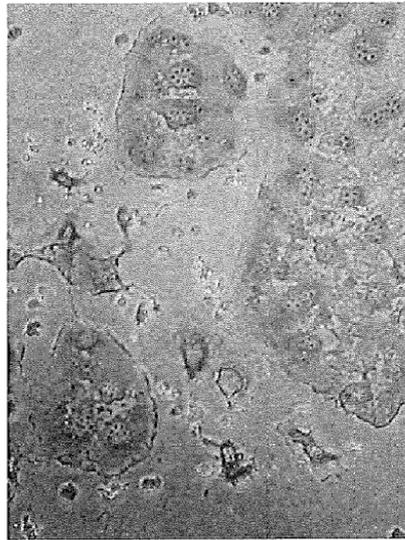
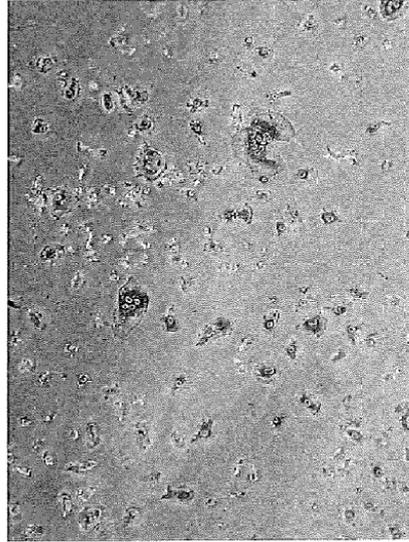


Figura 19

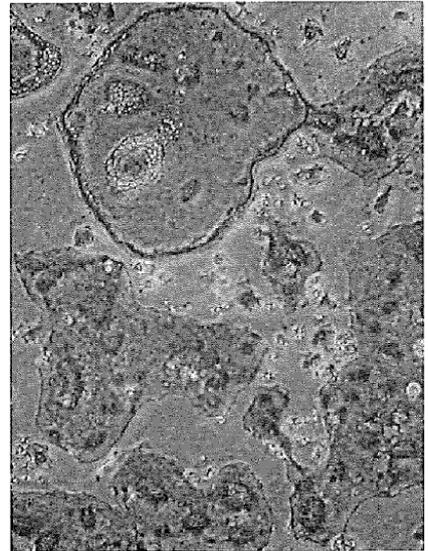
30 ng/ml de TNF α



30 ng/ml de TNF α + 1000 ng/ml de anticuerpo n.º 3 purificado por filtración en gel



30 ng/ml de TNF α + 100 ng/ml de OCIF/OPG



30 ng/ml de TNF α + 1000 ng/ml de IgG pre-inmune

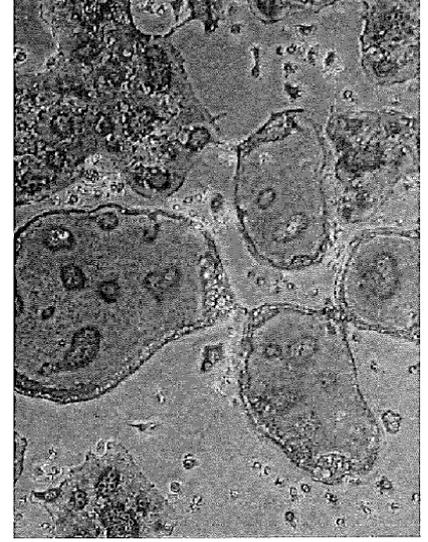
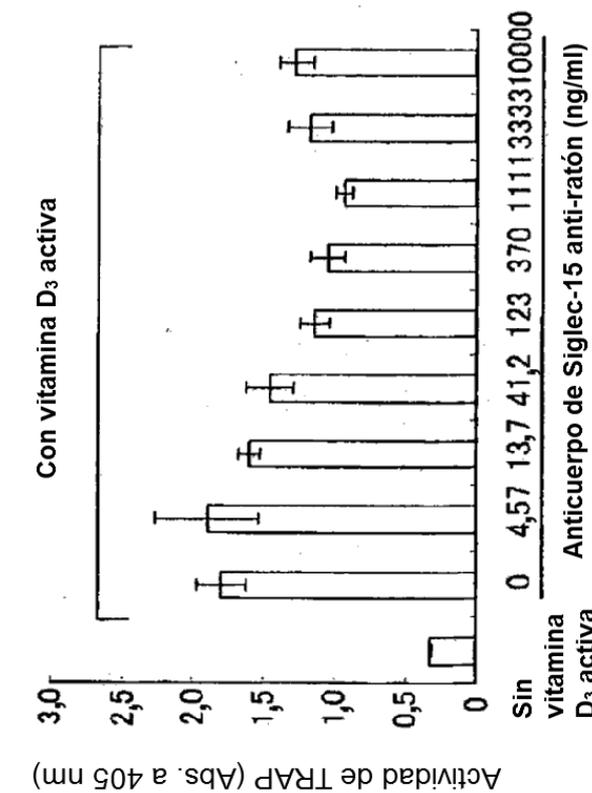


Figura 20

(A)



(B)

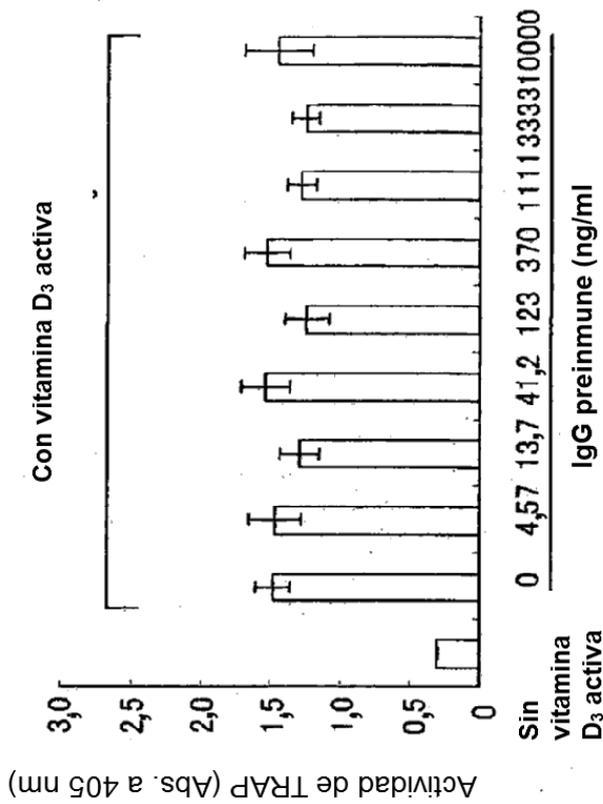
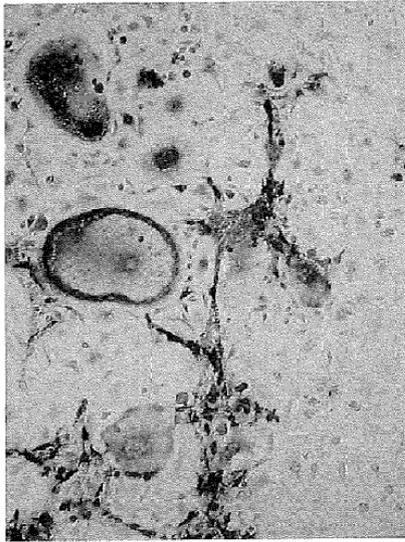
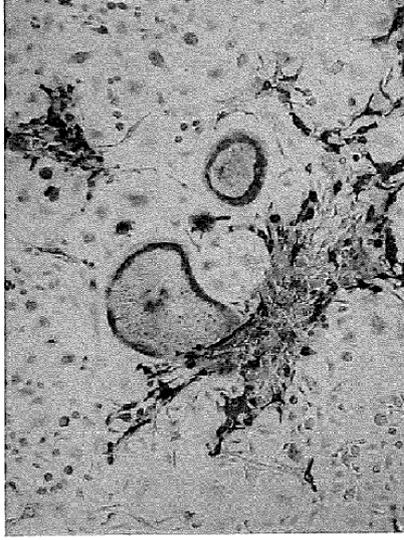


Figura 21

(A) Control



(B) IgG pre-inmune, 3.333 ng/ml



(C) Anticuerpo anti-Siglec-15, 370 ng/ml (D) Anticuerpo anti-Siglec-15, 3.333 ng/ml

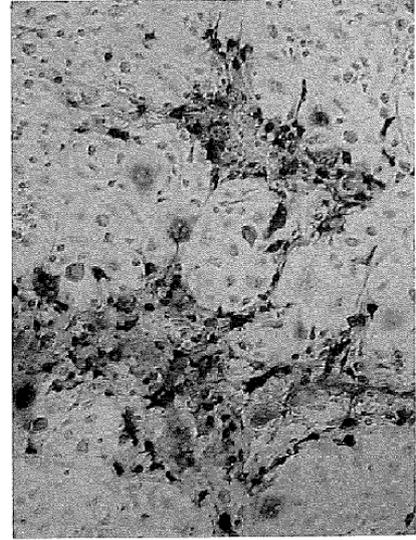
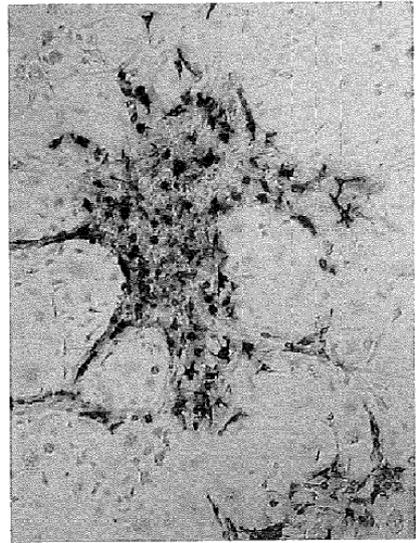
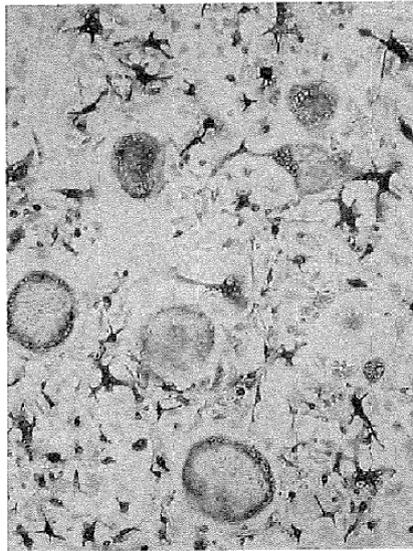
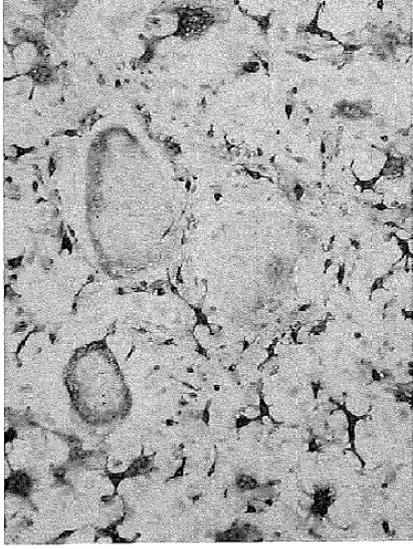


Figura 22

(A) Control



(B) IgG pre-inmune, 3.333 ng/ml



(C) Anticuerpo anti-Siglec-15, 370 ng/ml (D) Anticuerpo anti-Siglec-15, 3.333 ng/ml

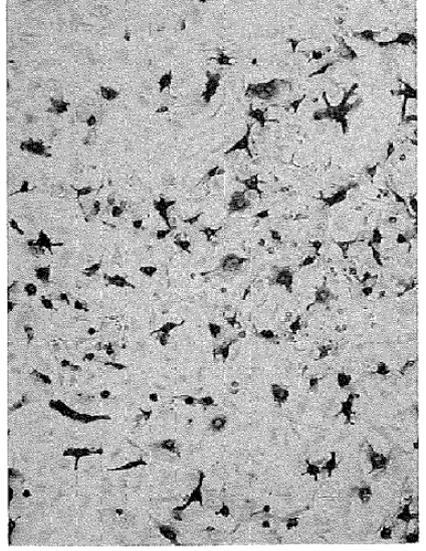
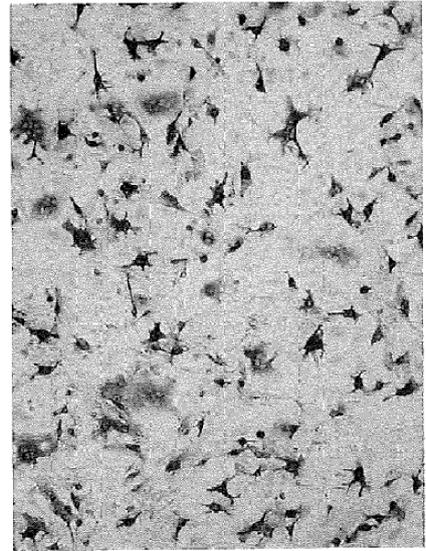
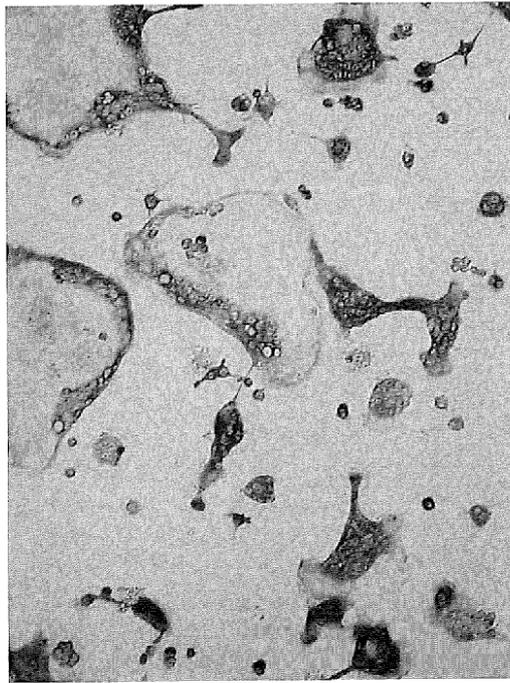


Figura 23

(0) Control



(A) Anticuerpo anti-Siglec-15, 1 µg/ml

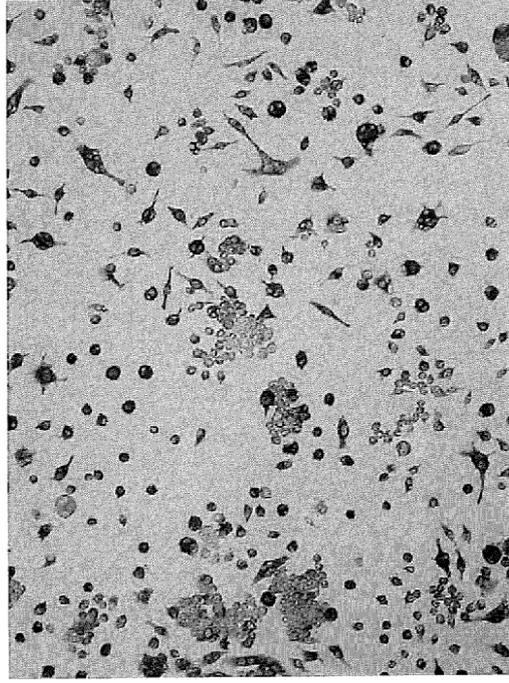
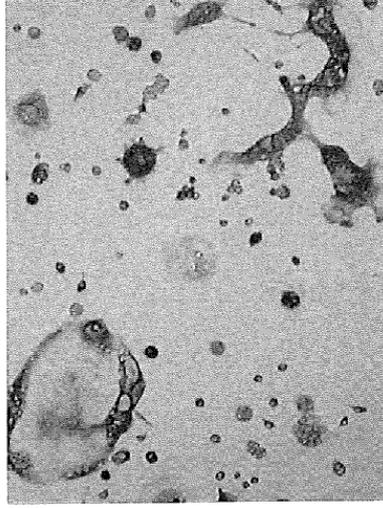


Figura 23

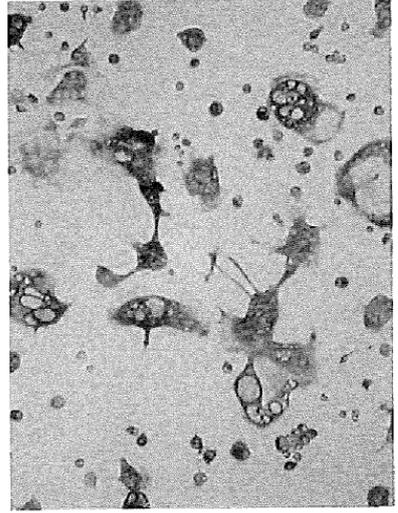
(B) Anticuerpo anti-Siglec-15, 1 $\mu\text{g/ml}$
+ Siglec-15-Fc, 1 $\mu\text{g/ml}$



(C) Anticuerpo anti-Siglec-15, 1 $\mu\text{g/ml}$
+ Siglec-15-Fc, 10 $\mu\text{g/ml}$



(D) Anticuerpo anti-Siglec-15, 1 $\mu\text{g/ml}$
+ Siglec-15-His, 1 $\mu\text{g/ml}$



(E) Anticuerpo anti-Siglec-15, 1 $\mu\text{g/ml}$
+ Siglec-15-His, 10 $\mu\text{g/ml}$

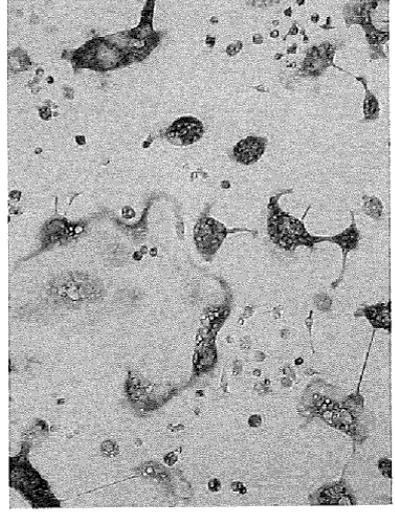


Figura 24

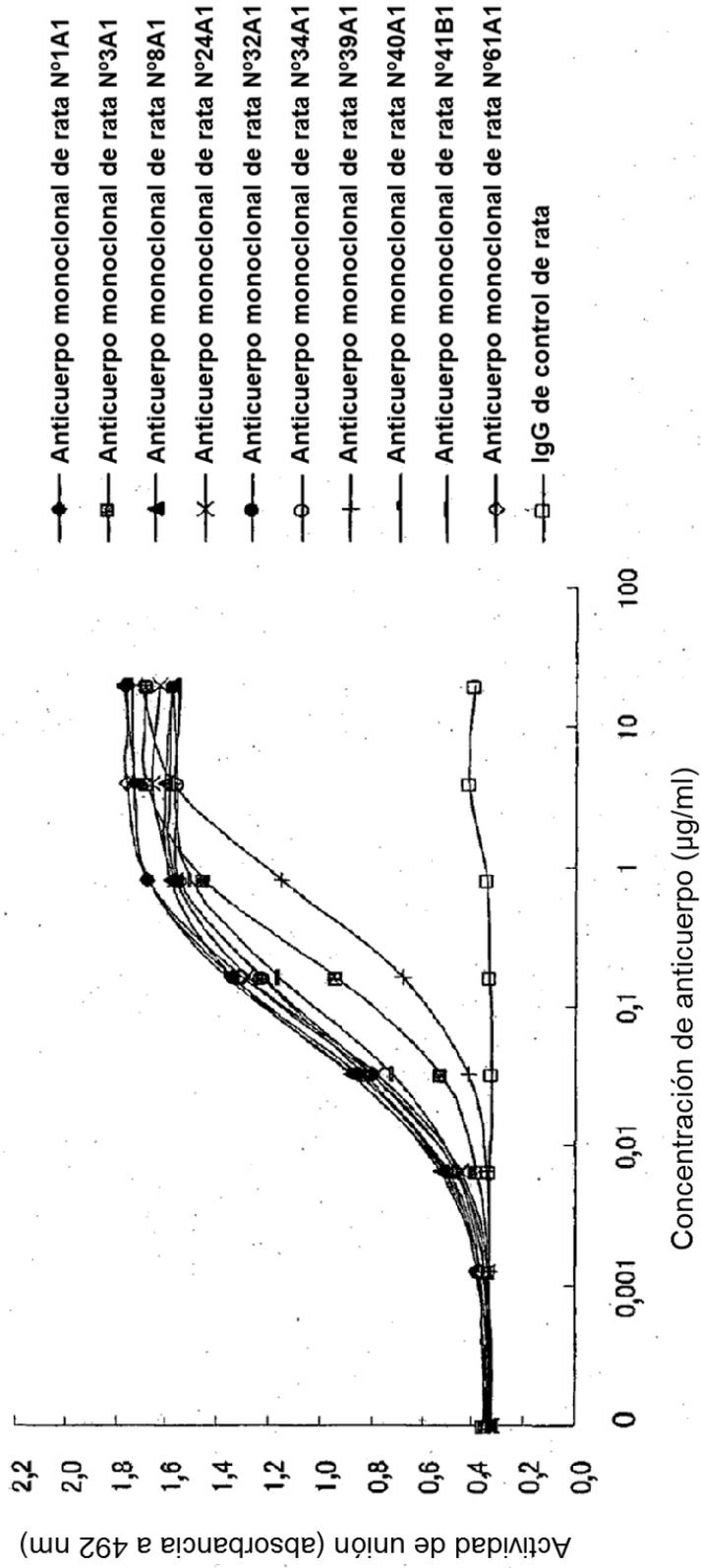


Figura 25

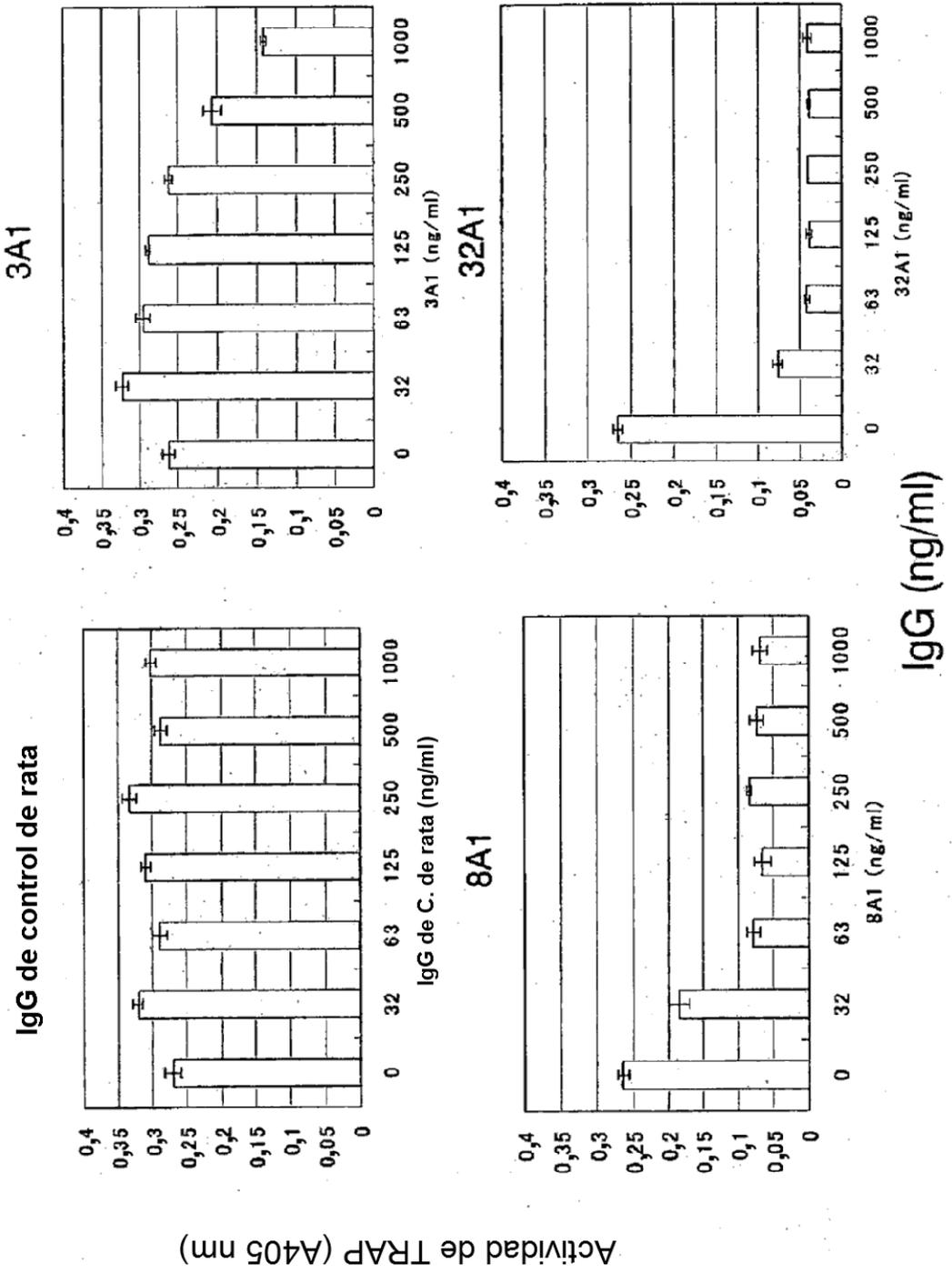


Figura 26

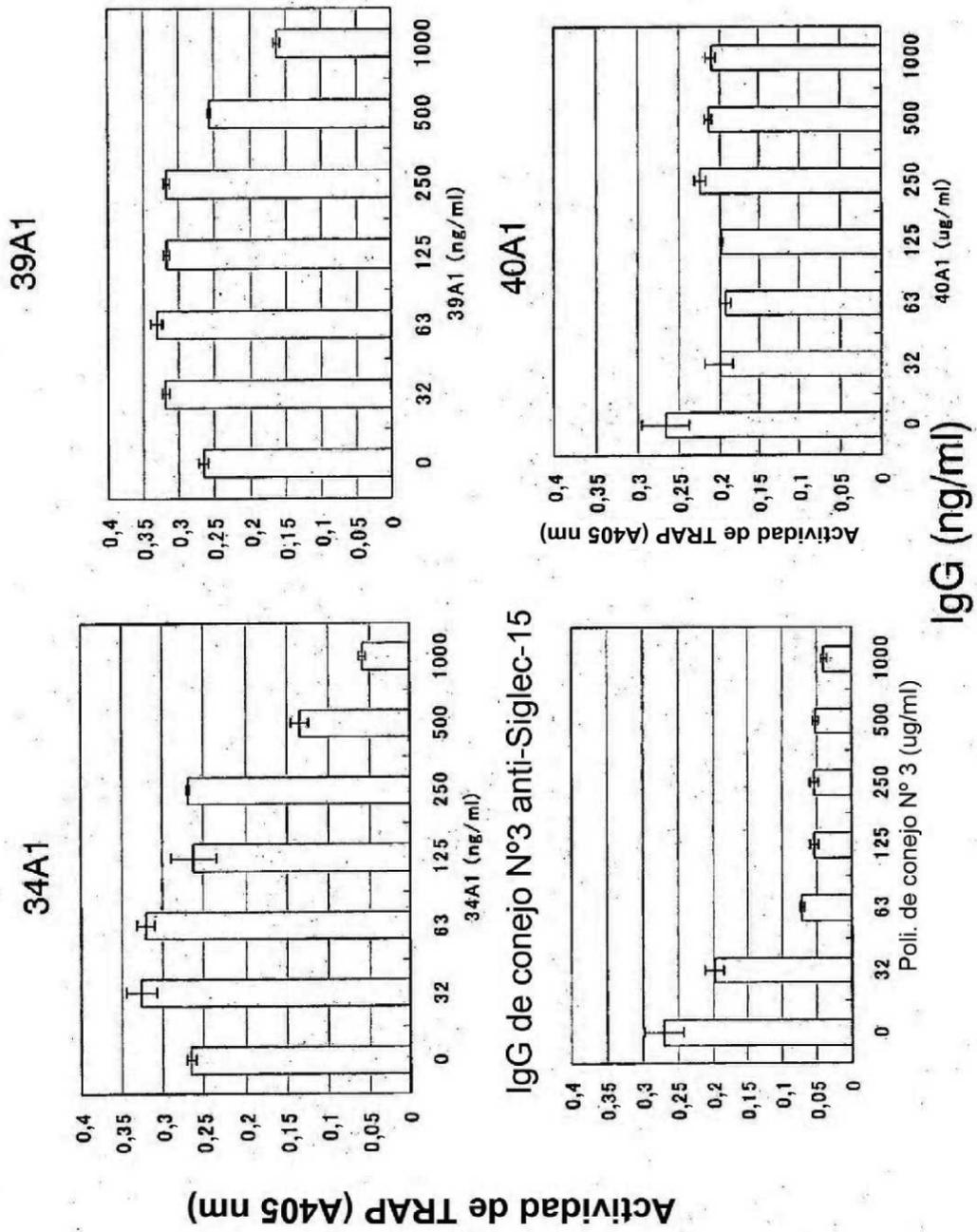


Figura 27

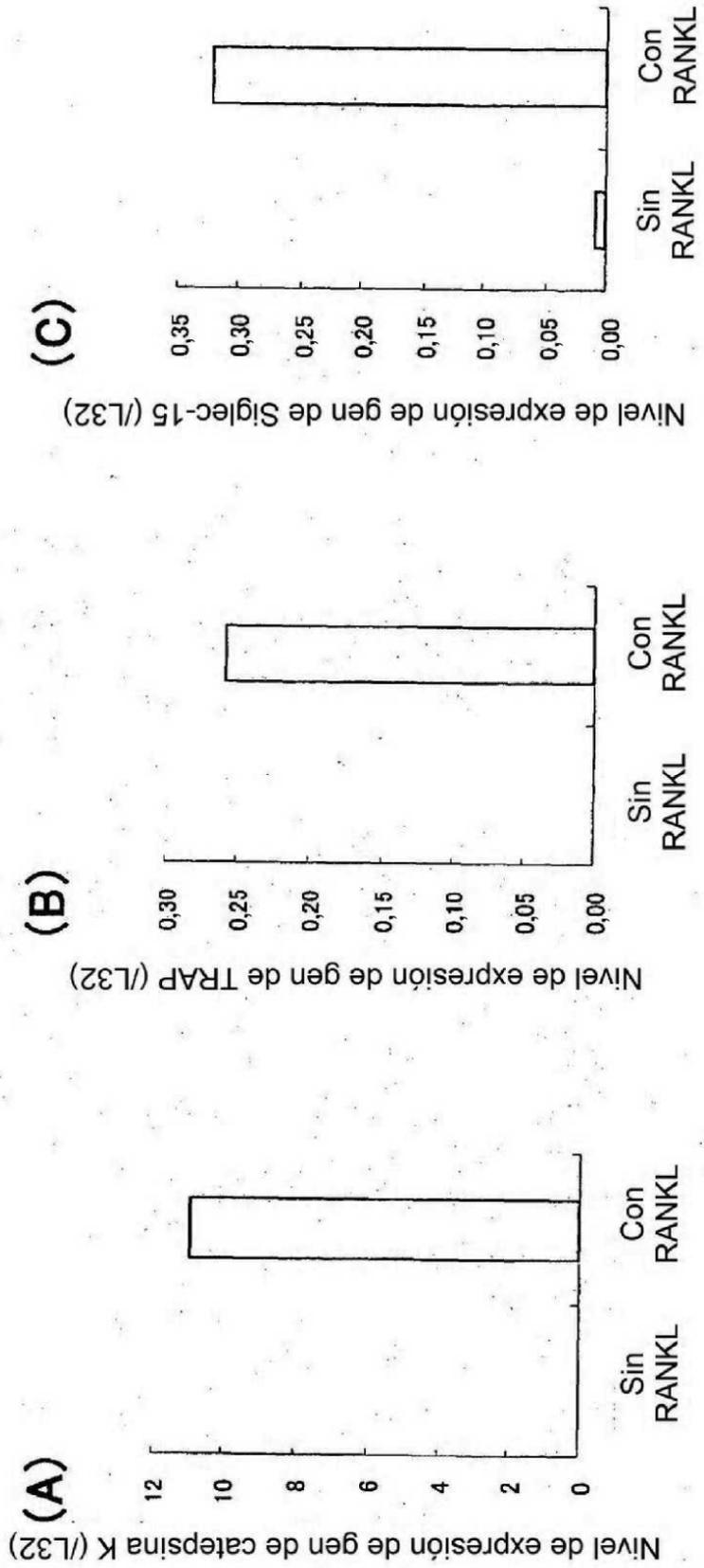


Figura 28

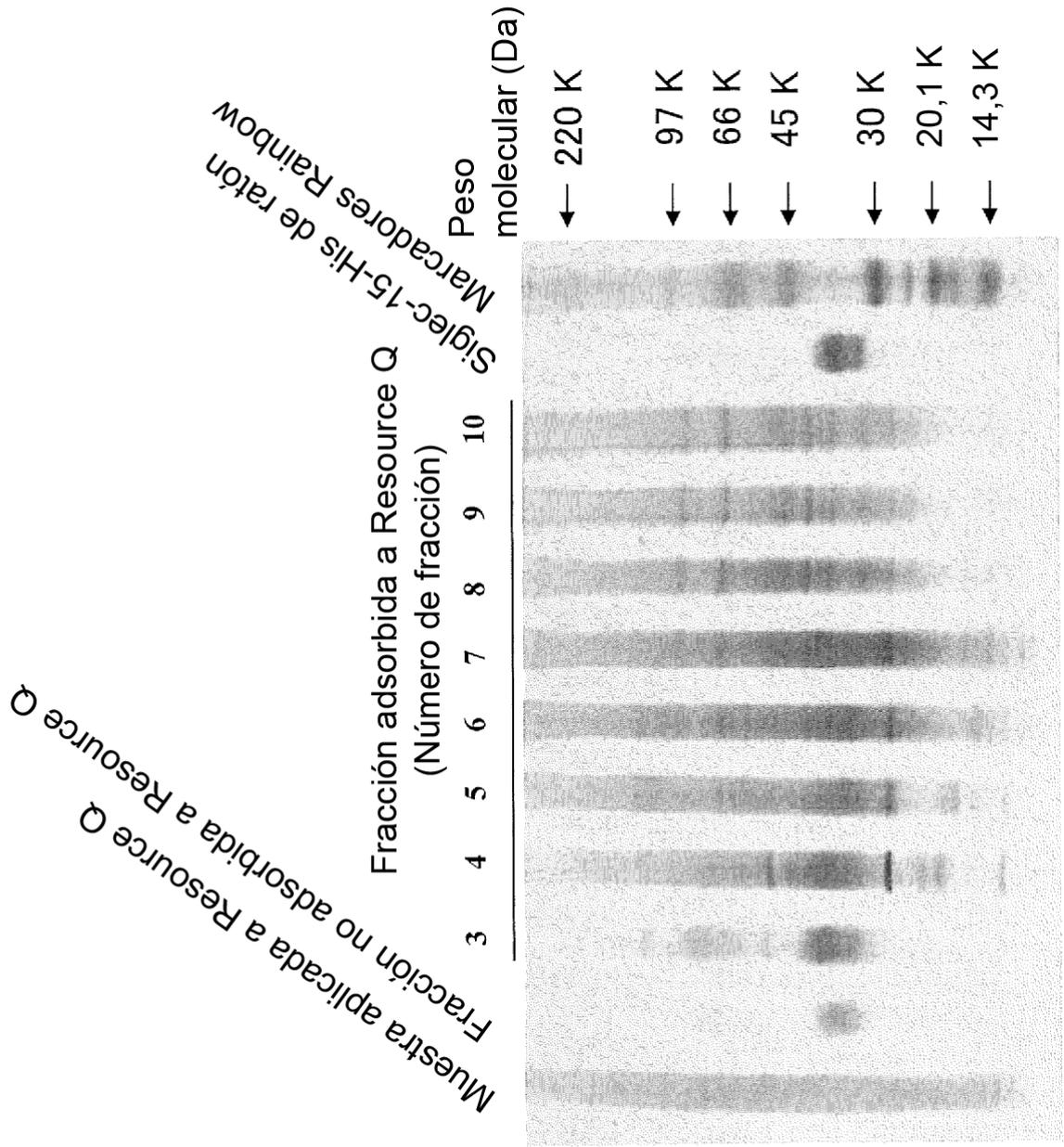


Figura 29

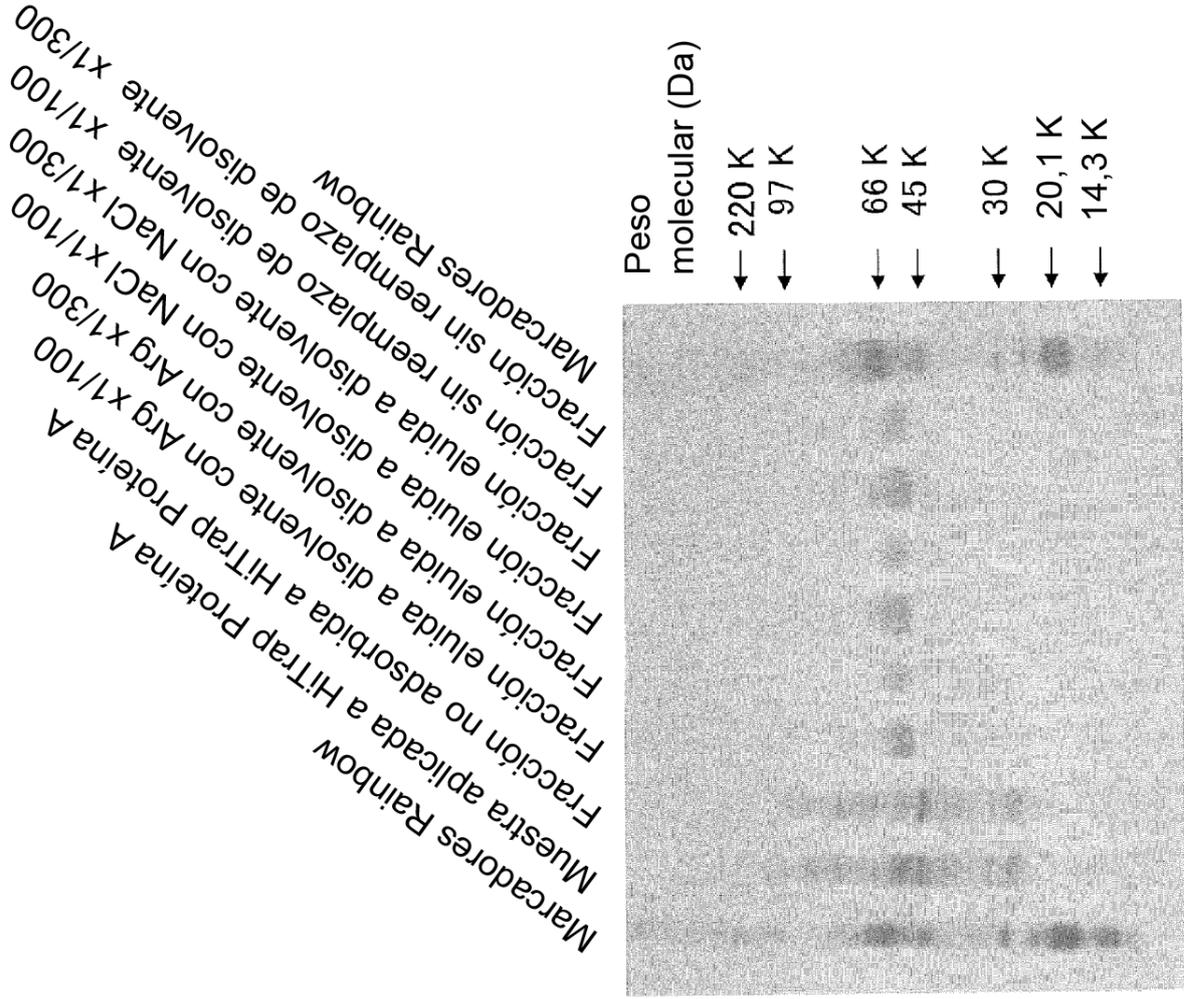


Figura 30

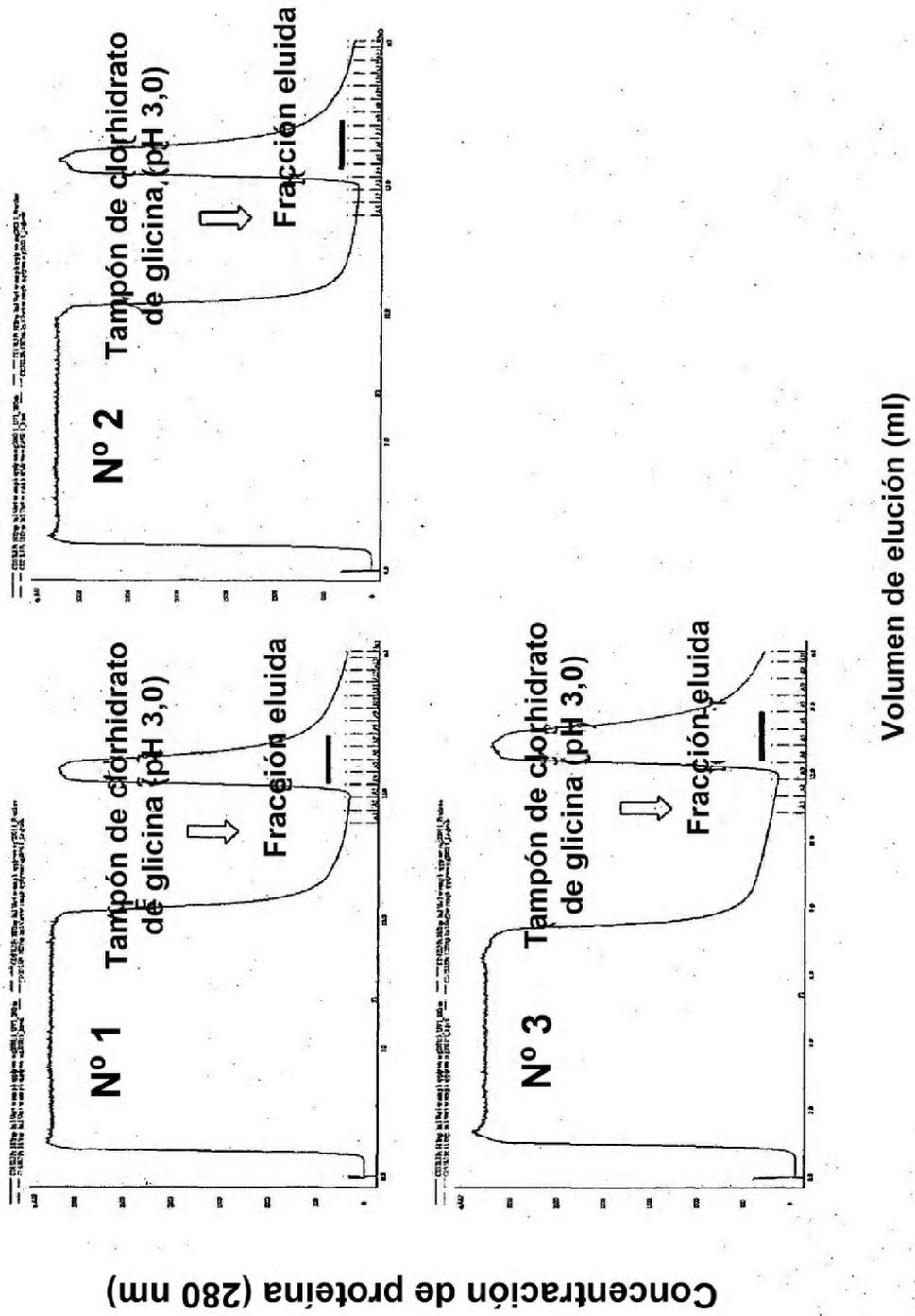
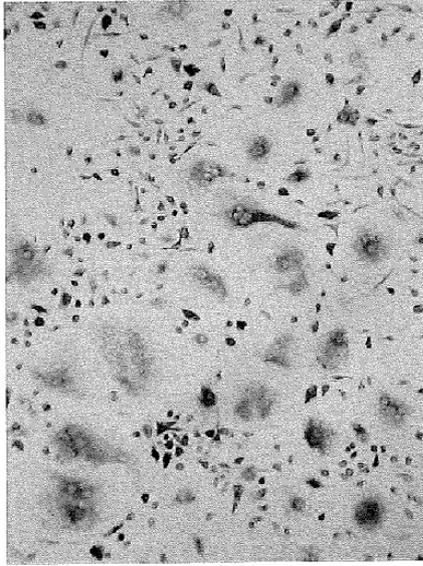
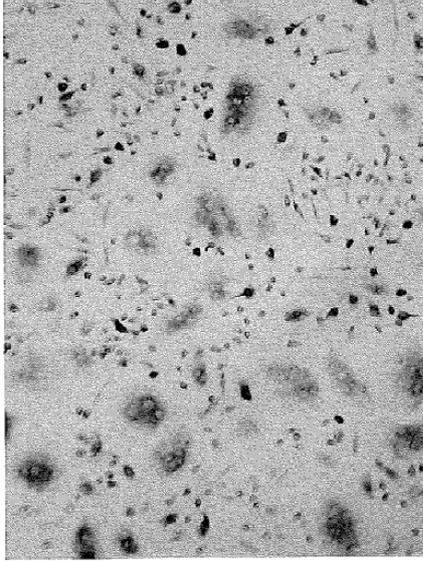


Figura 31

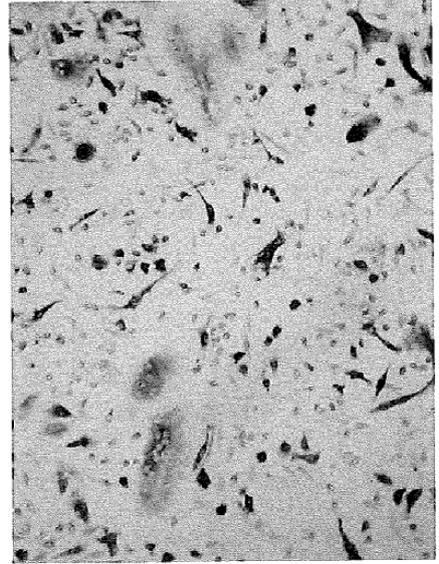
(A) Control



(B) IgG pre-inmune, 30 µg/ml



(C) Anticuerpo anti-Siglec-15, 3 µg/ml



(D) Anticuerpo anti-Siglec-15, 30 µg/ml

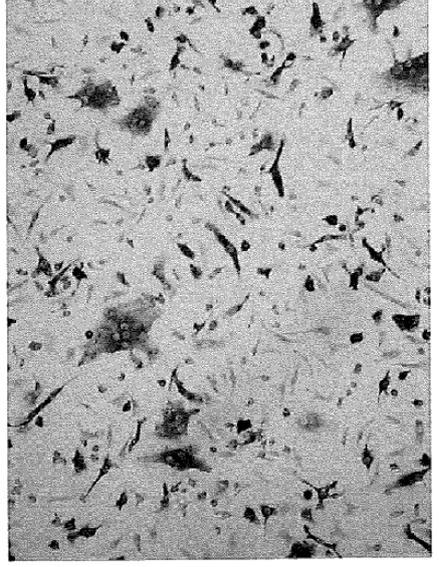


Figura 32

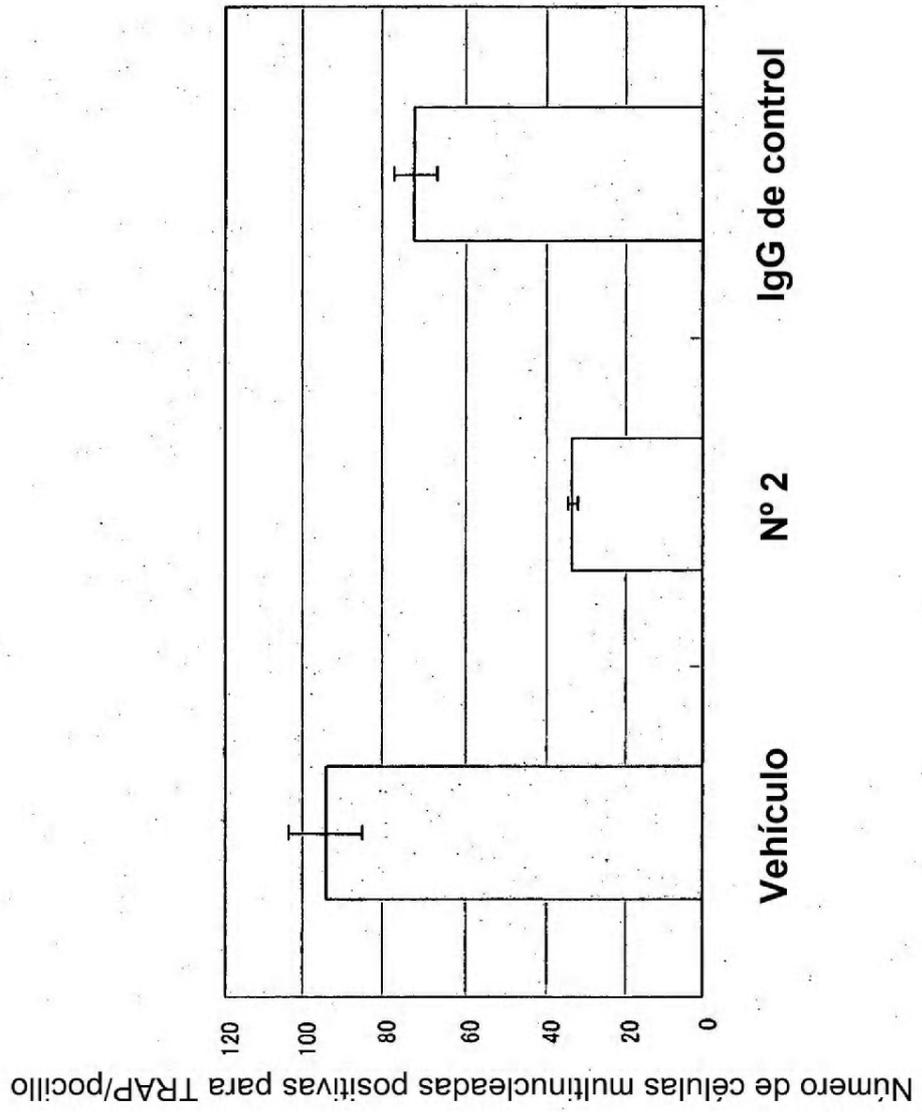


Figura 33

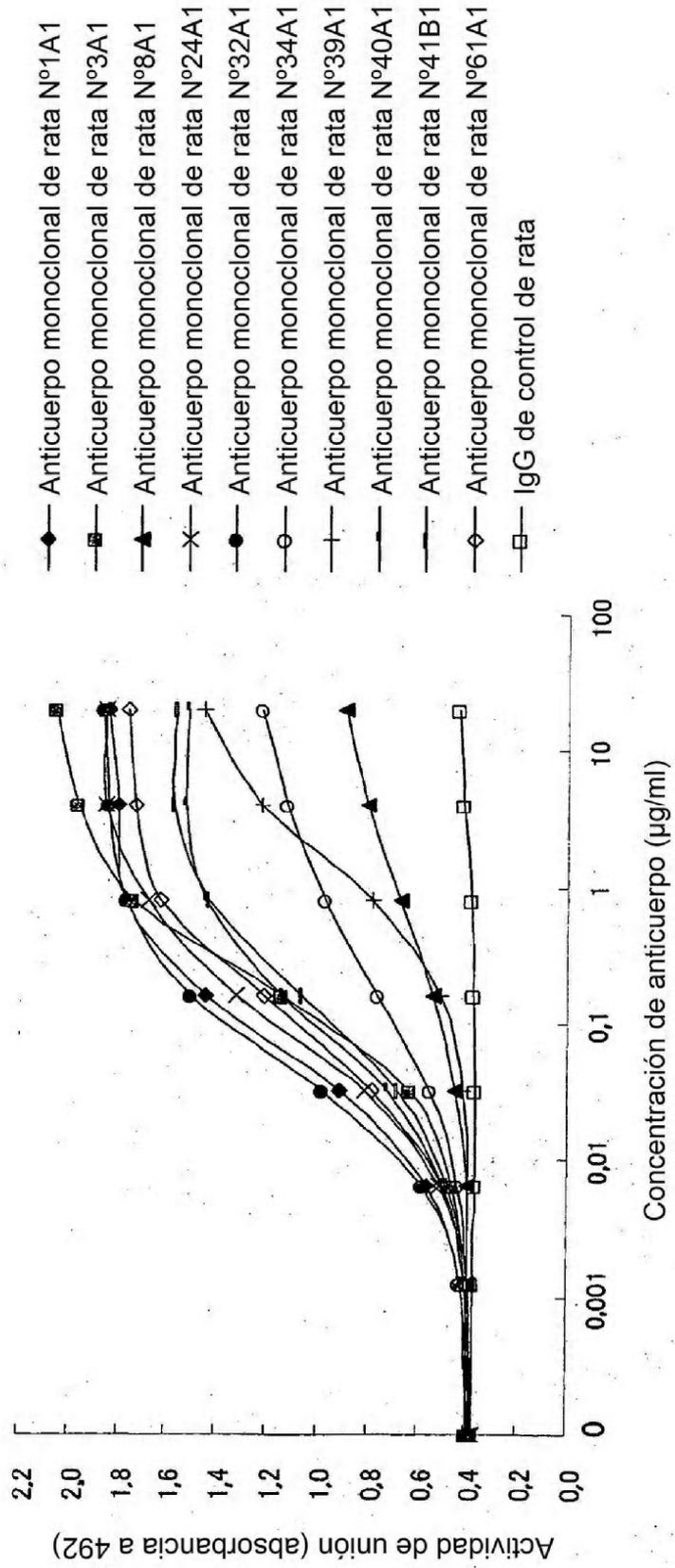


Figura 34

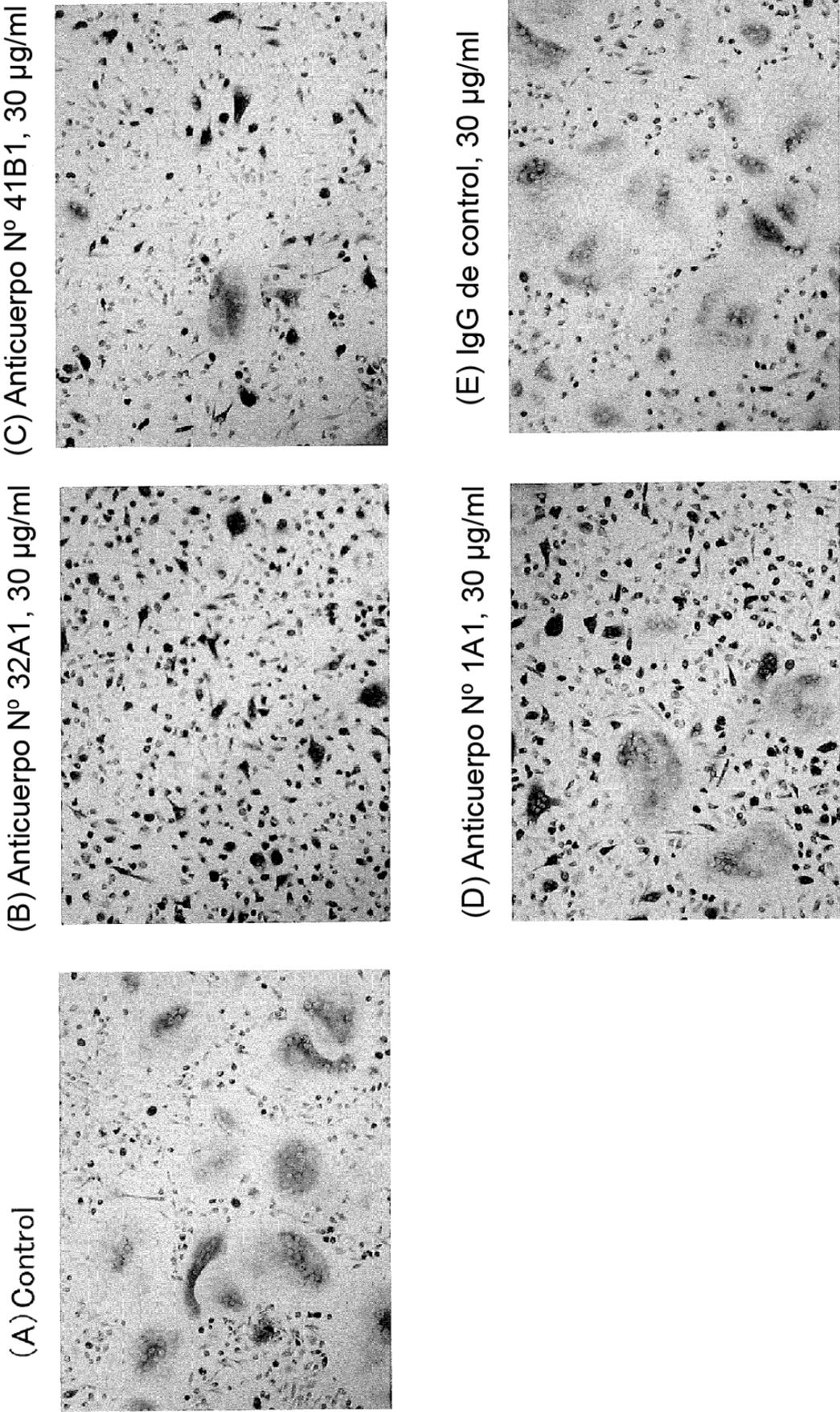


Figura 35

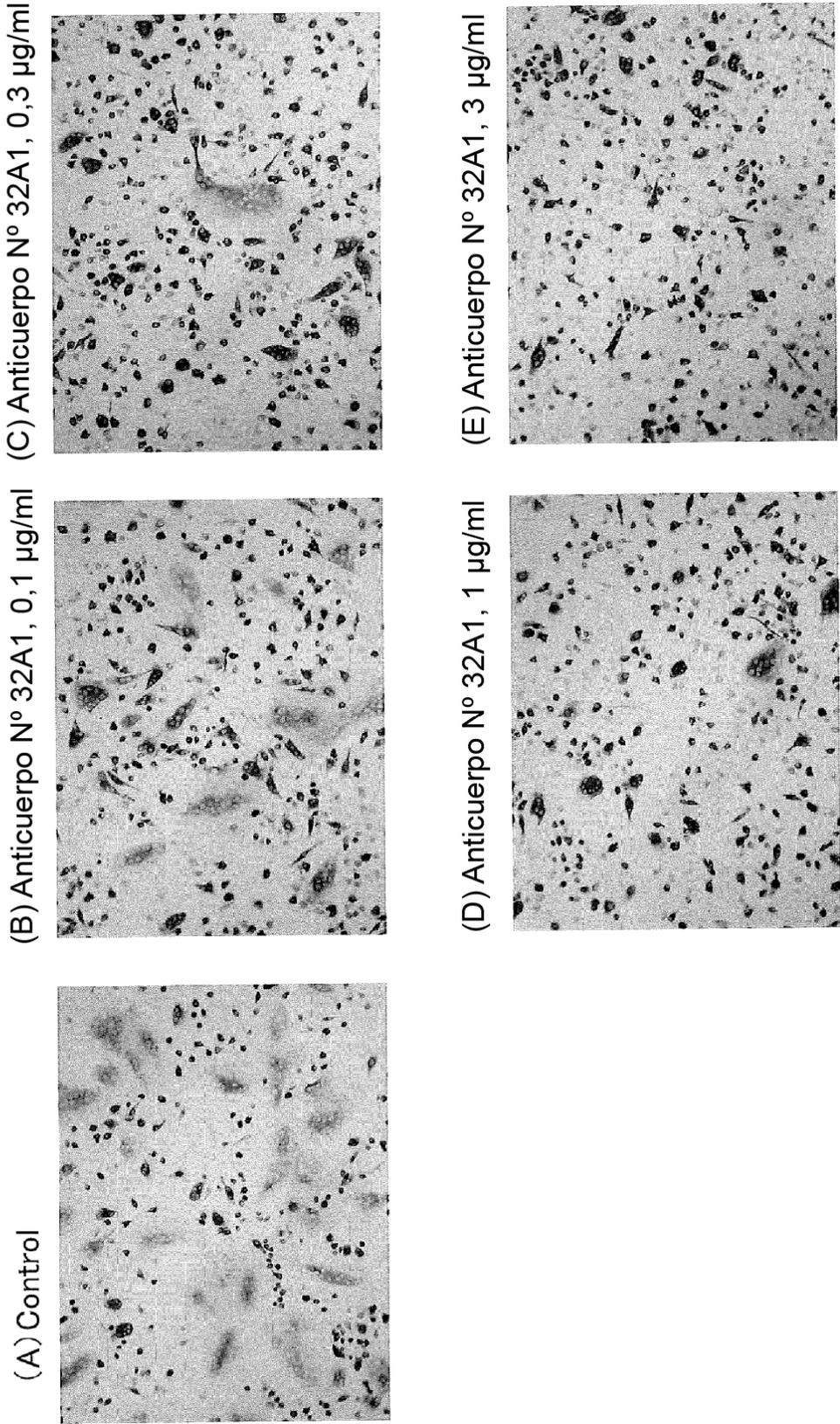


Figura 36

