



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103232539 B

(45) 授权公告日 2015.06.03

(21) 申请号 201310052370.5 *A61P 19/10*(2006.01)  
(22) 申请日 2002.06.25 *A61P 19/02*(2006.01)  
(30) 优先权数据 *A61P 29/00*(2006.01)  
60/301172 2001.06.26 US *A61P 37/02*(2006.01)  
*A61P 35/00*(2006.01)  
(62) 分案原申请数据 (56) 对比文件  
02816680.9 2002.06.25 US 5843678 A, 1998.12.01, 全文.  
(73) 专利权人 安姆根弗里蒙特公司 US 5866152 A, 1999.02.02, 全文.  
地址 美国加利福尼亚州 US 5891438 A, 1999.04.06, 全文.  
专利权人 安姆根有限公司 EP 1141028 B1, 1999.12.23, 全文.  
(72) 发明人 W. J. 博伊尔 F. H. 马丁 审查员 皇甫洁琼  
J. R. 科尔瓦兰 G. C. 达维斯  
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001  
代理人 李波 孟慧岚  
(51) Int. Cl.  
*C07K 16/24*(2006.01)  
*C12N 15/13*(2006.01)  
*C12N 15/63*(2006.01)  
*C12N 5/10*(2006.01)  
*C12P 21/02*(2006.01)  
*G01N 33/68*(2006.01)  
*A61K 39/395*(2006.01)  
*A61P 19/08*(2006.01)

权利要求书3页 说明书41页  
序列表11页 附图10页

(54) 发明名称  
抗 OPGL 抗体

(57) 摘要

本发明涉及抗 OPGL 抗体。具体地,本申请描述了与骨保护素配体(OPGL)相互作用的抗体。描述了通过施用药学有效量的抗 OPGL 抗体治疗骨质稀少疾病的方法。描述了使用抗 OPGL 抗体检测样品中 OPGL 量的方法。

1. 一种抗体,包括重链和轻链,其中:
  - a) 重链包括 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列所示的可变区;并且
  - b) 轻链包括 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列所示的可变区;并且其中所述抗体与骨保护素配体(OPGL)相互作用。
2. 权利要求1的抗体,其包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:2的从残基20到残基467的氨基酸序列。
3. 权利要求1的抗体,其包括重链,所述重链由SEQ ID NO:2的从残基20到残基467的氨基酸序列组成。
4. 权利要求1-3中任一项的抗体,其包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:4的从残基21到残基235的氨基酸序列。
5. 权利要求1-3中任一项的抗体,其包括轻链,所述轻链由SEQ ID NO:4的从残基21到残基235的氨基酸序列组成。
6. 权利要求1的抗体,其包括重链和轻链,其中所述重链包括SEQ ID NO:2的从残基20到残基467的氨基酸序列,并且其中所述轻链包括SEQ ID NO:4的从残基21到残基235的氨基酸序列。
7. 权利要求1的抗体,其包括重链和轻链,其中所述重链由SEQ ID NO:2的从残基20到残基467的氨基酸序列组成,并且其中所述轻链由SEQ ID NO:4的从残基21到残基235的氨基酸序列组成。
8. 一种分离的抗体,其通过培养包含第一多核苷酸和第二多核苷酸的哺乳动物宿主细胞产生,其中所述第一多核苷酸编码重链并且第二多核苷酸编码轻链,其中:
  - a) 所述重链包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的可变区;并且
  - b) 所述轻链包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的可变区;并且其中所述抗体结合骨保护素配体(OPGL)并且抑制OPGL与破骨细胞分化和激活受体(ODAR)的结合。
9. 权利要求8的抗体,其中第一多核苷酸编码包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链,第二多核苷酸编码包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链。
10. 权利要求8的抗体,其中第一多核苷酸编码由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的重链,第二多核苷酸编码由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的轻链。
11. 权利要求8的抗体,其中第一多核苷酸编码包括SEQ ID NO:2的从残基20到残基467的氨基酸序列的重链,并且其中第二多核苷酸编码包括SEQ ID NO:4的从残基21到残基235的氨基酸序列的轻链。
12. 权利要求11的抗体,其中第一多核苷酸编码由SEQ ID NO:2的从残基20到残基467的氨基酸序列组成的重链,并且其中第二多核苷酸编码由SEQ ID NO:4的从残基21到残基235的氨基酸序列组成的轻链。
13. 权利要求8-12中任一项的抗体,其中所述第一和第二多核苷酸是分开的核酸分子的部分。
14. 一种抗体,包括重链和轻链,  
其中所述重链包括SEQ ID NO:13的三个CDRs,并且其中所述轻链包括SEQ ID NO:14的三个CDRs,并且其中所述抗体结合人骨保护素配体(OPGL)并且抑制OPGL与破骨细胞分

化和激活受体 (ODAR) 的结合。

15. 一种抗体,包括重链和轻链,

其中所述重链包括具有一个羧基末端氨基酸缺失的 SEQ ID NO:2 的可变区和恒定区;其中所述轻链包括 SEQ ID NO:4 的可变区和恒定区;

并且其中所述抗体结合人骨保护素配体(OPGL)并且抑制 OPGL 与破骨细胞分化和激活受体 (ODAR) 的结合。

16. 权利要求 1、2、6、9-12 和 14-15 中任一项的抗体,其中所述重链和所述轻链形成单链抗体。

17. 权利要求 4 的抗体,其中所述重链和所述轻链形成单链抗体。

18. 权利要求 16 的抗体,其是单链 Fv 抗体。

19. 权利要求 1、2、6、9-12 和 14-15 中任一项的抗体,其中所述抗体是 Fab、Fab' 或 (Fab')<sub>2</sub>。

20. 权利要求 4 的抗体,其中所述抗体是 Fab、Fab' 或 (Fab')<sub>2</sub>。

21. 权利要求 1-3、8 和 14 中任一项的抗体,其中所述抗体是完全的人抗体。

22. 权利要求 13 的抗体,其中所述抗体是完全的人抗体。

23. 权利要求 1-3、6 和 7 中任一项的抗体,其中所述抗体抑制骨保护素配体(OPGL)与破骨细胞分化和激活受体(ODAR)的结合。

24. 权利要求 4 的抗体,其中所述抗体抑制骨保护素配体(OPGL)与破骨细胞分化和激活受体(ODAR)的结合。

25. 权利要求 5 的抗体,其中所述抗体抑制骨保护素配体(OPGL)与破骨细胞分化和激活受体(ODAR)的结合。

26. 含有权利要求 1-25 中任一项的抗体的药物组合物。

27. 权利要求 1-25 中任一项的抗体或权利要求 28 的药物组合物在制备用于治疗患者中的骨损失的药物中的用途。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述骨损失与选自下组的至少一种状况相关:骨质疏松症、佩吉特氏病、骨髓炎、高钙血症、骨质稀少、骨坏死、炎症状况、自身免疫状况、类风湿性关节炎和癌症。

29. 权利要求 28 的用途,其中所述癌症选自乳房癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌、肺癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、胃肠道癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤和何杰金氏病。

30. 权利要求 1-25 中任一项的抗体或权利要求 26 的药物组合物在制备用于与放疗和化疗中的至少一种一起施用从而用于治疗与癌症相关的骨损失的药物中的用途。

31. 权利要求 30 的用途,其中所述化疗涉及用至少一种选自蒽环霉素,紫杉醇,他莫西芬,阿霉素,5-氟尿嘧啶和黄体激素释放激素(LHRH)拮抗剂的药剂治疗。

32. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述癌症选自乳房癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾癌、肺癌、食道癌、直肠癌、膀胱癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、胃肠道癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤和何杰金氏病。

33. 一种分离的组合物,其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸,其中所述第一多核苷酸编码重链并且第二多核苷酸编码轻链,并且其中第一和第二多核苷酸编码权利要求 1-25

中任一项的抗体。

34. 权利要求 33 的组合物,其中第一多核苷酸编码包括 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列的重链,第二多核苷酸编码包括 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列的轻链。

35. 权利要求 33 的组合物,其中第一多核苷酸编码包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链,第二多核苷酸编码包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的轻链。

36. 权利要求 33 的组合物,其中第一多核苷酸编码由 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列组成的重链,第二多核苷酸编码由 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列组成的轻链。

37. 权利要求 33 的组合物,其中第一多核苷酸编码包括 SEQ ID NO :2 的从残基 20 到残基 467 的氨基酸序列的重链,第二多核苷酸编码包括 SEQ ID NO :4 的从残基 21 到残基 235 的氨基酸序列的轻链。

38. 权利要求 33 的组合物,其中第一多核苷酸编码由 SEQ ID NO :2 的从残基 20 到残基 467 的氨基酸序列组成的重链,第二多核苷酸编码由 SEQ ID NO :4 的从残基 21 到残基 235 的氨基酸序列组成的轻链。

39. 权利要求 33 的组合物,其中第一多核苷酸包括 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列,第二多核苷酸包括 SEQ ID NO :3 的核苷酸序列。

40. 权利要求 33-39 的任一项的组合物,其中所述第一和第二多核苷酸是相同核酸分子的部分。

41. 权利要求 33-39 的任一项的组合物,其中所述第一和第二多核苷酸是分开的核酸分子的部分。

42. 权利要求 40 的组合物,其中所述核酸分子是载体。

43. 权利要求 41 的组合物,其中所述第一多核苷酸是第一载体的部分,第二多核苷酸是第二载体的部分。

44. 权利要求 42 的组合物,其中所述载体是病毒载体。

45. 权利要求 43 的组合物,其中第一载体和第二载体中的至少一种是病毒载体。

46. 分离的宿主细胞,其包含权利要求 33-45 的任一项的组合物。

47. 权利要求 46 的宿主细胞,其是原核宿主细胞或真核宿主细胞。

48. 权利要求 47 的宿主细胞,其是哺乳动物宿主细胞。

49. 权利要求 48 的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自中国仓鼠卵巢细胞,HeLa 细胞,小鼠肾细胞,猴肾细胞和人肝细胞癌细胞。

50. 生产与骨保护素配体(OPGL)相互作用的抗体的方法,其包括培养权利要求 46-49 的任一项的宿主细胞。

51. 生产权利要求 1-25 的任一项的抗体的方法,包括培养宿主细胞并且分离所述抗体。

## 抗 OPGL 抗体

[0001] 本申请是申请日为 2002 年 6 月 25 日的中国专利申请 02816680.9“抗 OPGL 抗体”的分案申请。

[0002] 本申请要求 2001 年 6 月 26 日递交的美国临时申请登记号 No. 60/301,172 的优先权,对于任何目的,其在这里被引作参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及与骨保护素 (osteoprotegerin) 配体 (OPGL) 结合的抗体。也描述了治疗骨病例如骨质疏松,关节炎骨损失,佩吉特氏病,和骨质稀少的组合物和方法。

### 背景技术

[0004] 骨组织提供对身体的支持,并且包括矿物质(包括钙和磷),胶原蛋白和非胶原蛋白基质,和细胞。活组织在称为沉积的骨形成和称为再吸收的骨分解之间表现出动态平衡。在骨,骨细胞,成骨细胞和破骨细胞中发现的三种类型的细胞都涉及这种平衡。成骨细胞促进骨组织的形成,而破骨细胞与再吸收相关。与骨形成相比,骨基质和矿物质的再吸收或溶解是一个快速而有效的过程,并且能从骨释放大量矿物质。破骨细胞参与骨骼组织正常重塑的调节和激素诱导的再吸收。例如,反应于胞外液中钙离子降低的浓度的甲状旁腺激素的分泌刺激再吸收。相反,再吸收的抑制作用是降钙素的功能。另外,维生素 D 的代谢物改变骨对甲状旁腺激素和降钙素的反应。

[0005] 骨保护素配体 (OPGL) 是细胞因子 TNF 家族的一员,通过与 NF- $\kappa$  B (RANK, 也称作破骨细胞分化和激活受体,或 ODAR) 的受体激活剂结合而促进破骨细胞的形成。另一方面,骨保护素 (OPG),通过隔离 OPGL 并且阻止 OPGL 与 ODAR 缔合而抑制破骨细胞的形成。因此,与 ODAR 缔合的 OPGL 的量与骨沉积和再吸收之间的平衡相关。

[0006] 骨骼成熟之后,骨骼中骨的量反映骨形成和骨再吸收的平衡(或失衡)。在骨成熟之后第四个十年之前骨质达到高峰。在第四和第五个十年之间,平衡转移并且骨再吸收占优势。骨量随着年龄不可避免的减少在女性要比男性开始得早,并且某些女性在绝经期之后显著加快(主要是高加索人和亚洲人血统的那些)。

[0007] 骨质稀少是与一般骨质低于正常水平的任何降低相关的状况。这样的状况可以由骨合成速度减慢或者骨破坏速度加快或者这两者而发生的一种状况。骨质稀少的一个常见形式是原发性骨质疏松,也称作绝经后和老年骨质疏松。这种骨质疏松形式是随着年龄普遍损失的结果,并且经常是伴随骨形成正常速度的骨再吸收加速的结果。在美国,很多白人女性发生有症状的骨质疏松症。骨质疏松和 45 岁和更年老妇女髌部,股骨,颈和转子间骨折的发生率之间存在直接关系。老年男性在 50 和 70 岁之间可能发生有症状的骨质疏松。在某些情况下,骨质疏松可能由 OPGL 提高的水平或活性而产生。因此,能调节破骨细胞生成中 OPGL 的活性的分子是有用的。

[0008] 已经鉴定出几种因子,它们对绝经后和老年骨质疏松有作用。它们包括伴随老化和归于钙和其他矿物质降低的肠吸收的不适当钙消耗的激素水平的改变。一些治疗包括激

素疗法或为了延迟该过程的饮食补充。最近,抗吸收剂例如双磷酸盐和选择性雌激素受体修饰剂 (SERMs) 用于防止和治疗减少的骨量。因此,将那些治疗与能调节 OPGL 活性的分子结合在治疗某些骨质稀少疾病中是有用的。

## 发明内容

[0009] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗体,包括重链和轻链,其中重链包括 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列或者其片段,轻链包括 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列或者其片段。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗体,包括重链和轻链,其中重链含有包括 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列或者其片段的可变区,其中轻链含有包括 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列或者其片段的可变区。

[0011] 在一些实施方案中,本发明提供一种包括重链和轻链的抗体,其中重链包括 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列或者其片段。

[0012] 在一些实施方案中,本发明提供一种包括重链和轻链的抗体,其中重链含有包括 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列或者其片段的可变区。

[0013] 在一些实施方案中,本发明提供一种包括重链和轻链的抗体,其中轻链包括 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列或者其片段。

[0014] 在一些实施方案中,本发明提供一种包括重链和轻链的抗体,其中轻链含有包括 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列或者其片段的可变区。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供一种包括重链和轻链的抗体,(a) 其中重链包括第一可变区,其中第一可变区包括与 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的序列,和 (b) 其中轻链包括第二可变区,其中第二可变区包括与 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的序列,和 (c) 其中所述抗体与骨保护素配体 (OPGL) 相互作用。

[0016] 在一些实施方案中,第一可变区包括与 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的序列,并且第二可变区包括与 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的序列。

[0017] 在一些实施方案中,第一可变区包括与 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列具有至少 99% 同一性的序列,并且第二可变区包括与 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列具有至少 99% 同一性的序列。

[0018] 在一些实施方案中,本发明提供了重链,包括 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列或者其片段。在一些实施方案中,本发明提供含有可变区和恒定区的重链,其中可变区包括 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列或者其片段。

[0019] 在一些实施方案中,本发明提供了轻链,包括 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列或者其片段。在一些实施方案中,本发明提供含有 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列或者其片段的轻链。

[0020] 在本发明的一些实施方案中,提供了单链抗体。在本发明的一些实施方案中,提供了单链 Fv 抗体。在本发明的一些实施方案中,提供了 Fab 抗体。在本发明的一些实施方案中,提供了 Fab' 抗体。在本发明的一些实施方案中,提供了 (Fab')<sub>2</sub> 抗体。

[0021] 在一些实施方案中,提供了含有本发明的抗体的药物组合物。在一些实施方案中,

提供了含有治疗有效量的抗 OPGL 抗体的药物组合物。

[0022] 在一些实施方案中, 药物组合物含有一种抗 OPGL 抗体和至少一种选自下组的治疗剂: 骨形态发生因子, 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 白介素-1 (IL-1) 抑制剂, IL-1ra, Kineret<sup>™</sup>, anakinra, TNF  $\alpha$  抑制剂, 可溶 TNF  $\alpha$  受体, Enbrel<sup>™</sup>, etanercept, 抗-TNF  $\alpha$  抗体, Remicade<sup>™</sup>, 英夫单抗, D2E7 抗体, 甲状旁腺素, 甲状旁腺素类似物, 甲状旁腺素相关蛋白, 甲状旁腺素相关蛋白类似物, 前列腺素, 双磷酸盐, 阿仑特罗, 氟化物, 钙, 非甾族抗炎药 (NSAID), COX-2 抑制剂, Celebrex<sup>™</sup>, 塞来西布, Vioxx<sup>™</sup>, 罗非克西, 免疫抑制剂, 甲氨喋呤, 来氟米特, 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 分泌性白细胞蛋白酶抑制剂 (SLPI), IL-6 抑制剂, 抗 IL-6 抗体, IL-8 抑制剂, 抗 IL-8 抗体, IL-18 抑制剂, IL-18 结合蛋白, 抗 IL-18 抗体, 白介素-1 转化酶 (ICE) 调节剂, 成纤维细胞生长因子 (FGF), FGF 调节剂, PAF 拮抗剂, 角质细胞生长因子 (KGF), KGF- 相关分子, KGF 调节剂; 基质金属蛋白酶 (MMP) 调节剂, 一氧化氮合酶 (NOS) 调节剂, 糖皮质激素受体调节剂, 谷氨酸受体调节剂, 脂多糖 (LPS) 水平调节剂, 去甲肾上腺素, 去甲肾上腺素模拟物, 和去甲肾上腺素调节剂。

[0023] 在本发明的一些实施方案中, 提供了治疗骨质稀少疾病的方法, 包括施用药学有效量的抗体。在一些实施方案中, 提供了治疗骨质稀少疾病的方法, 包括施用药物组合物。

[0024] 在一些实施方案中, 提供了治疗患者中的伴随骨损失的炎症状况的方法, 包括施用药物组合物。

[0025] 在一些实施方案中, 提供了治疗患者中的伴随骨损失的自身免疫疾病的方法, 包括施用药物组合物。

[0026] 在一些实施方案中, 提供了治疗患者中的类风湿性关节炎的方法, 包括施用本发明的药物组合物。

[0027] 在本发明的实施方案中, 提供了检测生物样品中 OPGL 水平的方法, 包括使样品接触抗体。

## 附图说明

[0028] 图 1 表示编码  $\alpha$  OPGL-1 抗体重链的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :1)。具体描述了在 HindIII 位点起始到 SalI 位点的重链表达质粒的 DNA 序列, 起始密码子在 nt14 开始, 终止密码子在 nt1415 开始。

[0029] 图 2 表示  $\alpha$  OPGL-1 抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。其中, IgG2 信号肽是加下划线的, 可变区是大写字母但没有下划线, 恒定区是小写字母。

[0030] 图 3 表示编码  $\alpha$  OPGL-1 抗体轻链的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :3)。具体描述了从 Xba I 位点到 Sal I 位点的 K 链表达质粒序列的 DNA 序列。起始密码子在 nt12 开始; 终止密码子在 nt717 开始。

[0031] 图 4 表示  $\alpha$  OPGL-1 抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)。其中, K 信号肽是加下划线的, 可变区是大写字母但没有下划线的, 恒定区是小写字母。

[0032] 图 5 表示  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  轻链表达质粒  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSRa19 的示意图。

[0033] 图 6 表示  $\alpha$  OPGL-1 IgG2 重链表达质粒,  $\alpha$  OPGL-1-IgG2/pDSRa19 的示意图。

[0034] 图 7 表示  $\alpha$  OPGL-1 与 OPGL- 包被的 EIA 板的剂量-依赖性结合。

[0035]  $\alpha$  OPGL-1 以剂量依赖方式与包被在 EIA 板上的可溶性 OPG 配体结合。

[0036] 测量方法是：

[0037] 用重组可溶性 OPGL 包被 96-孔 EIA 板。向孔中加入不同浓度的  $\alpha$  OPGL-1 并且室温下温育大约 2 小时。用山羊抗-人 IgG(Fab')-辣根过氧化物酶检测结合的抗体。读取 450nm 和 650nm 处的吸光度。

[0038] 图 8 表示  $\alpha$  OPGL-1 与膜-结合的 OPGL 的特异性结合。

[0039]  $\alpha$  OPGL-1 以剂量依赖方式与转染的 CHO REN218-9 细胞的细胞表面上表达的 OPGL 结合。这种结合与外源加入的人 OPGL 竞争但不与 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL 或 CD40 配体竞争。用各种浓度的可溶性 OPGL 或其它配体预先温育  $\alpha$  OPGL-1 (100ng/ml), 然后用表面上表达 OPGL 的 CHO REN218-9 细胞温育。细胞然后在 2-8°C 下用 FITC-标记 F(ab')<sub>2</sub> 山羊抗-人 IgG, Fc $\gamma$  片段特异性温育 30 分钟。离心并洗涤细胞表面之后, 利用流式细胞术测定。

[0040] 图 9 表示可溶性 OPGL 对  $\alpha$  OPGL-1 结合 OPGL-包被的 EIA 板的抑制作用。外源加入的可溶性 OPGL 竞争性减少  $\alpha$  OPGL-1 与 EIA 板上的 OPGL 结合。

[0041] 图 10 表示  $\alpha$  OPGL-1 与 OPGL-包被的 EIA 板的特异性结合。

[0042]  $\alpha$  OPGL-1 不结合 TNF 家族成员 TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , TRAIL 或 CD40 配体。

[0043] 外源加入的 TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL 或 CD40 配体不减少  $\alpha$  OPGL-1 与 EIA 板上的 OPGL 结合。

[0044] 图 11 表示  $\alpha$  OPGL-1 对破骨细胞形成的剂量-依赖性抑制作用。具体显示  $\alpha$  OPGL-1 对未加工 264.7 细胞中 OPG 配体诱导的 TRAP 活性的剂量依赖性抑制作用。

[0045] 图 12 表示  $\alpha$  OPGL-1 对 OPGL 结合 ODAR 的剂量-依赖性抑制作用。具体显示  $\alpha$  OPGL-1 对锎-标记 OPG 配体结合 OPAR-FLAG/抗-FLAG-APC 的剂量依赖性抑制作用。

[0046] 图 13 表示对猕猴施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后的平均血清浓度时间曲线。具体显示：

[0047] 以 0.1, 1 和 10.0mg/kg IV (n = 2/剂) 和 1.0mg/kg SC (n = 6/剂) 的剂量对猕猴单剂量施用  $\alpha$  OPGL-1 之后平均 ( $\pm$ SD) 血清-浓度时间曲线。

[0048] 图 14 表示对猕猴施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后血清中 N-Tx 浓度的平均变化百分率。具体显示：

[0049] 以 0.1, 1 和 10.0mg/kg 剂量对猕猴单剂量 IV (n = 2/剂) 或

[0050] SC (n = 6) 施用  $\alpha$  OPGL-1 之后血清 N-TX 浓度中平均 ( $\pm$ SD) 变化百分比。

[0051] 图 15 表示对猕猴施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后尿液中 N-Tx 浓度的平均变化百分率。具体显示：

[0052] 以 0.1, 1 和 10.0mg/kg 剂量对猕猴单剂量 IV (n = 2/剂) 或

[0053] SC (n = 6) 施用  $\alpha$  OPGL-1 之后尿液中 N-TX 浓度平均 ( $\pm$ SD) 变化百分比。

[0054] 图 16 表示对猕猴施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后抗体阳性和阴性血清-浓度时间曲线。具体显示：

[0055] 以 0.1mg/kg 剂量对猕猴 IV 施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1

[0056] 之后抗体阳性 (空心符号) 和阴性 (实心符号) 动物血清-浓度时间曲线。

[0057] 图 17 表示  $\alpha$  OPGL-1 抗体重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)。

[0058] 图 18 表示  $\alpha$  OPGL-1 抗体轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)。



[0059] 图 19 表示生产  $\alpha$  OPGL-1 的细胞培养方法。

[0060] 图 20 表示对猕猴施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后从基线的平均血清钙变化百分率。

[0061] 图 21 表示对猕猴施用单剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后从基线的平均血清碱性磷酸酶变化百分率。

### 具体实施方式

[0062] 这里使用的标题是为了组织的目的而不应该理解为限制描述的主题。本申请中引述的所有的参考文献特别在此为了任何目的引作参考。

[0063] 定义

[0064] 标准技术可以用于重组 DNA,寡核苷酸合成,和组织培养和转化(例如电穿孔,脂转染)。根据厂商说明或者本领域常规技术或者根据这里的描述,可以实施酶促反应和纯化技术。根据本领域公知的常规方法和根据本说明书中引述和讨论的各个一般性和更具体的参考文献中的描述,一般可以实施上述技术和方法。参见,例如,Sambrook 等,分子克隆:实验手册(第二版,冷泉港实验出版社,冷泉港,纽约(1989)),其在这里为了任何目的引作参考。除了指出具体定义,使用的相关的术语,这里描述的分析化学,合成有机化学,和医学和药物化学实验方法和技术是本领域公知的和通用的。标准技术可以用于化学合成,化学分析,药物制备,配方和送递,和对患者的治疗。

[0065] 根据本发明公开中使用的,下面的术语,除非另有说明,应该理解为具有下面的定义:

[0066] 这里使用的术语“分离的多核苷酸”应该指基因组多核苷酸,cDNA,或合成来源的或者它们的组合,根据其来源,“分离的多核苷酸”(1)与“分离的多核苷酸”是在自然界发现的多核苷酸的全部或部分没有缔合,(2)与不与自然界中的相连的多核苷酸连接,或(3)作为较大序列的部分,自然界中不存在。

[0067] 术语“分离的蛋白质”在这里指 cDNA,重组 RNA,或合成来源的或者它们的组合编码的蛋白质,其(1)没有正常发现的至少一些蛋白质,(2)基本上没有相同来源例如来自相同物种的其他蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)自然界中不存在。

[0068] 这里使用的术语“多肽”作为遗传术语指天然蛋白质,或者具有天然序列的一个或多个氨基酸缺失,添加和/或取代的序列。术语“多肽”还包括  $\alpha$  OPGL-1(如下所述,SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4),或  $\alpha$  OPGL-1 的一个或多个氨基酸缺失,添加和/或取代的序列。根据一些实施方案,本发明包括图 2 表示的人重链免疫球蛋白分子(SEQ ID NO:2)和图 4 表示的人轻链免疫球蛋白分子(SEQ ID NO:4)或者其片段或类似物。

[0069] 这里使用的对于一种物质使用的术语“天然存在的”指物质能在自然界中发现的事实。例如,能从自然界来源中分离的并且人们在实验中或者其他情况下还没有意向改变的生物体(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0070] 这里使用的术语“可操作性连接”指允许它们以它们想要的方式发挥功能的关系中的成分。例如,与编码序列“可操作性连接”的调控序列以在与调控序列相容的条件下实现编码序列的表达的方式连接。

[0071] 这里使用的术语“调控序列”指可以使它们连接的编码序列表达和加工的多核苷酸序列。这样的调控序列的性质根据宿主生物而不同。根据一些实施方案,原核生物的调

控序列可以包括启动子,核糖体结合位点,和转录终止序列。根据一些实施方案,真核生物的调控序列可以包括启动子和转录终止序列。在一些实施方案中,“调控序列”可以包括前导序列和 / 或融合配偶体序列。

[0072] 这里提到的术语“多核苷酸”意思是长度至少 10 个碱基的核苷酸的多聚体形式。在一些实施方案中,碱基可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或这两种类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的 DNA。

[0073] 这里提到的术语“寡核苷酸”包括天然存在的,和由天然存在的和 / 或非天然存在的寡核苷酸键连接在一起的修饰的核苷酸。寡核苷酸是一般包括 200 个碱基或更短长度的多核苷酸子集。在一些实施方案中,寡核苷酸长度是 10-60 个碱基。在一些实施方案中,寡核苷酸长度是 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 或 20-40 个碱基。寡核苷酸可以是单链或双链的,例如用于构建基因突变体。本发明的寡核苷酸可以是有义或反义寡核苷酸。

[0074] 术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括带有被修饰或被取代糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包括如硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,硒代磷酸酯,二硒代磷酸酯, phosphoroanilothioate, phosphoroaniladate, 氨基磷酸酯等这样的寡核苷酸键。参见,例如 LaPlanche 等, Nucl. Acids Res. 14 : 9081(1986) ;Stec 等, J. Am. Chem. Soc. 106 :6077(1984) ;Stein 等, Nucl. Acids Res. 16 : 3209(1988) ;Zon 等, Anti-Cancer Drug Design 6 :539(1991) ;Zon 等, Oligonucleotides and Analogues :A Practical Approach, pp87-108(F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)) ;Stec 等, 美国专利 No. 5151510 ;Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90 :543(1990), 这些文献的公开内容为任何目的在此引作参考。寡核苷酸可以包括检测标记。

[0075] 通过公知的方法容易计算相关多肽的同一性和相似性。这样的方法包括但不限于下面文献中描述的那些 :

[0076] Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 编著, Oxford University Press, New York(1988) ;Biocomputing :Informatics 和 Genome Projects, Smith, D. W., 编著, Academic Press, New York(1993) ;Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编著, Humana Press, New Jersey(1994) ;Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press(1987) ;Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编著, M. Stockton Press, New York(1991) ;和 Carillo 等, SIAM J. Applied Math., 48 :1073(1988)。

[0077] 设计测定同一性的优选方法,所示分析的序列之间最大匹配性。在公众能得到的计算机程序中描述了测定同一性的方法。测定两个序列之间的同一性的优选的计算机程序方法包括但不限于 GCG 程序包,包括 GAP (Devereux 等, Nucl. Acids Res. 12 :387(1984) ;Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, 和 FASTA (Altschul 等, J. Mol. Biol., 215 :403-410(1990))。BLASTX 程序公众能从生物技术信息国家中心 (NCBI) 和其他来源获得 (BLAST Manual, Altschul 等, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD20894 ;Altschul 等, 上文 (1990))。公知的 SmithWaterman 算法也可以用来测定同一性。

[0078] 一些用于比对两个氨基酸序列的比对系统可能导致两个序列只有短的区域匹配,即使两个全长序列之间没有显著相关性,这个小的比对的区可能具有非常高的序列同一

性。因此,在一些实施方案中,选择的比对方法(GAP程序)会导致跨越靶多肽的至少50个连续氨基酸的比对。

[0079] 例如,使用计算机算法GAP(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI),对要测定序列同一性百分比的两个多肽进行它们各自氨基酸最佳匹配的比对(“匹配跨度”,根据算法测定)。在一些实施方案中,空位开放罚分(计算为3X平均对角线;“平均对角线”是比较使用的比较矩阵的对角线的平均值;“对角线”是通过特定比较矩阵对各完美氨基酸匹配赋予的分值或数)和空位延伸罚分(其通常是空位开放罚分的1/10倍),以及比较矩阵例如PAM250或BLOSUM62与算法结合使用。在一些实施方案中,算法也使用标准比较矩阵(有关PAM250比较矩阵,参见Dayhoff等,Atlas of Protein Sequence and Structure,5(3)(1978);有关BLOSUM62比较矩阵,参见Henikoff等,Proc. Natl. Acad. SciUSA,89:10915-10919(1992))。

[0080] 在一些实施方案中,多肽序列比较的参数包括如下:

[0081] 算法:Needleman等,J. Mol. Biol.,48:443-453(1970);

[0082] 比较矩阵:Henikoff等的BLOSUM62,上文(1992);

[0083] 空位罚分:12

[0084] 空位长度罚分:4

[0085] 相似性阈值:0

[0086] GAP程序采用上面的参数是有用的。在一些实施方案中,对于使用GAP算法的多肽比较是默认参数(对于末端空位没有罚分)。

[0087] 根据这里使用的,二十种常见氨基酸和它们的缩写常规用法如下。参见Immunology-A Synthesis(第二版,E. S. Golub和D. R. Gren,编著,Sinauer Associates, Sunderland, Mass(1991)),在这里为了任何目的引作参考。二十种常见氨基酸,非天然氨基酸例如 $\alpha$ -, $\alpha$ -二取代氨基酸,N-烷基氨基酸,乳酸,和其他不是常见的氨基酸的立体异构体(例如D-氨基酸)也可以是本发明多肽的合适的成分。不是常见的氨基酸的例子包括:4-羟基脯氨酸, $\gamma$ -羧基谷氨酸, $\epsilon$ -N,N,N-三甲基赖氨酸, $\epsilon$ -N-乙酰基赖氨酸,0-磷酸丝氨酸,N-乙酰基丝氨酸,N-甲酰基甲硫氨酸,3-甲基组氨酸,5-羟基赖氨酸, $\sigma$ -N-甲基精氨酸,和其他类似氨基酸和亚氨基酸(例如4-羟基脯氨酸)。根据标准用法和习惯,在这里使用的多肽符号中,左手方向是氨基末端方向,右手方向是羧基末端方向。

[0088] 类似地,除非另外具体说明,单链多核苷酸序列的左手末端是5'端;双链多核苷酸序列的左手方向称作5'方向。新生的RNA转录物5'至3'添加的方向称作转录方向;具有和RNA一样的序列并且是RNA转录物的5'至5'端的DNA链上的序列区称作“上游序列”;具有和RNA一样的序列并且是RNA转录物的3'至3'端的DNA链上的序列区称作“下游序列”。

[0089] 保守氨基酸取代可以包括非天然存在的氨基酸残基,其一般通过化学肽合成插入而不是通过生物系统合成插入。这些包括肽模拟物和氨基酸部分的其他反向或倒置形式。

[0090] 根据共同侧链性质可以将天然存在的残基分为几类:

[0091] 1) 疏水性:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0092] 2) 中性亲水性: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0093] 3) 酸性: Asp, Glu;

[0094] 4) 碱性 :His, Lys, Arg ;

[0095] 5) 影响链取向的残基 :Gly, Pro ;和

[0096] 6) 芳香的 :Trp, Tyr, Phe。

[0097] 例如,非保守性取代可以包括用这些类中的一个的成员交换另一类的成员。可以将这样的取代的残基导入与非人抗体同源的人抗体的区中,或者到该分子的非同源区中。

[0098] 根据一些实施方案,进行这样的变化,要考虑氨基酸的亲水指数。以疏水性和电荷特征为基础对每一个氨基酸标定亲水指数。它们是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0099] 氨基酸亲水指数在对蛋白质赋予相互作用生物学功能中的重要性在本领域是公知的。Kyte等,J.Mol.Biol.157:105-131(1982)。已知一些氨基酸可以取代具有相似亲水性指数或分数而且仍然保留相似的生物学活性的其他氨基酸。以亲水指数为基础进行改变,在一些实施方案中,包括其亲水指数在 $\pm 2$ 之内的氨基酸的取代。在一些实施方案中,包括其亲水指数在 $\pm 1$ 之内的那些,在一些实施方案中,包括其亲水指数在 $\pm 0.5$ 之内的那些。

[0100] 本领域还知道,以亲水性为基础可以有效进行相似氨基酸的取代,特别是在这样产生的生物功能蛋白质或肽是为了在免疫实施方案中使用,如本申请情况下。在一些实施方案中,蛋白质的最大局部平均亲水性,根据其相邻氨基酸的亲水性所支配的,与其免疫原性和抗原性相关,即与蛋白质的生物学性质相关。

[0101] 对这些氨基酸残基标定下面的亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 $\pm 1$ );谷氨酸(+3.0 $\pm 1$ );丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 $\pm 1$ );丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);和色氨酸(-3.4)。以相似亲水值为基础进行改变,在一些实施方案中,包括其亲水指数在 $\pm 2$ 之内的氨基酸的取代,在一些实施方案中,包括其亲水指数在 $\pm 1$ 之内的那些,在一些实施方案中,包括其亲水指数在 $\pm 0.5$ 之内的那些。人们根据亲水性还可以从一级氨基酸序列鉴定表位。这些区也称作“表位核心区”。

[0102] 表1所示例示的氨基酸取代作用。

[0103] 表1:氨基酸取代作用

	原残基	举例的取代	优选的取代
[0104]	Ala	Val, Leu, Ile	Val
	Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
	Asn	Gln	Gln
	Asp	Glu	Glu
	Cys	Ser, Ala	Ser
	Gln	Asn	Asn
	Glu	Asp	Asp
	Gly	Pro, Ala	Ala
	His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
	Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
	[0105]	Leu	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys		Arg, 1,4 二氨基 - 丁酸, Gln, Asn	Arg
Met		Leu, Phe, Ile	Leu
Phe		Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro		Ala	Gly
Ser		Thr, Ala, Cys	Thr
Thr		Ser	Ser
Trp		Tyr, Phe	Tyr
Tyr		Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val		Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0106] 本领域技术人员应用公知技术能确定这里提到的多肽的合适的变体。在一些实施方案中,本领域技术人员可以鉴定通过导向于不认为对活性是重要的区而可以改变但是不破坏活性的分子的合适的部位。在一些实施方案中,人们可以鉴定相似多肽之间保守的分子的残基和部分。在一些实施方案中,即使对于生物活性或者对结构重要的区也可以进行保守氨基酸取代而不破坏生物活性或者不会不利地影响多肽结构。

[0107] 另外,本领域技术人员能综述结构功能研究,鉴定对于活性或结构重要的相似多肽中的残基。考虑这样一种比较,人们能预知蛋白质中氨基酸残基的重要性,相当于对相似蛋白质中对活性或结构重要的氨基酸残基。本领域技术人员对于这样预测的重要的氨基酸残基可以选择化学相似氨基酸取代作用。

[0108] 本领域技术人员还能分析与相似多肽中的结构相关的三维结构和氨基酸序列。根据这样的信息,本领域技术人员可以预测抗体三维结构的氨基酸序列比对。在一些实施方案中,本领域技术人员可以选择对预计在蛋白质表面上的氨基酸残基不进行基团变化,因为这样的残基在与其他分子的重要的相互作用中涉及。此外,本领域技术人员可以制备在各个期望的氨基酸残基处包含单一氨基酸取代作用的试验变体。然后可以应用本领域技术人员公知的活性测定来对这些变体进行筛选。这样的变体也可以被用来收集关于合适的变体的信息。例如,如果有人发现特定氨基酸残基的变化导致破坏的不期望的降低的,或者不合适的活性,则可以避免这样的变化。换句话说,以从这样的常规实验获得的信息为基础,

本领域技术人员容易确定哪里应该避免进一步的取代作用,不管是单独的或者是与其他突变一起的。

[0109] 关于二级结构的预测已经出版了大量科学出版物。参见 Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4) :422-427 (1996), Chou 等, *Biochemistry*, 13(2) :222-245 (1974); Chou 等, *Biochemistry*, 113(2) :211-222 (1974); Chou 等, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47 :45-148 (1978); Chou 等, *Ann. Rev. Biochem.*, 47 :251-276 和 Chou 等, *Biophys. J.*, 26 :367-384 (1979)。此外,目前可获得计算机程序辅助预测二级结构。预测二级结构的一种方法以同源性模拟为基础。例如,序列同一性大于 30%,或相似性大于 40%的两种多肽或蛋白质经常具有相似结构拓扑学。蛋白质结构数据库 (PDB) 的最新增长提供对二级结构增强的可预测性,包括多肽或蛋白质结构中可能的折叠数目。参见 Holm 等, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1) :244-247 (1999)。有人提议 (Brenner 等, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3) :369-376 (1997)), 在给定多肽或蛋白质中存在有限数目的折叠,并且一旦确定临界数目的折叠,结构预测将合适地变得更精确。

[0110] 预测二级结构的另外的方法包括“穿线法”(Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3) :377-87 (1997); Sippl 等, *Structure*, 4(1) :15-19 (1996)), “图形分析”(Bowie 等, *Science*, 253 :164170 (1991); Gribskov 等, *Meth. Enzym.*, 183 :146-159 (1990); Gribskov 等, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13) :4355-4358 (1987)), 和“进化的键”(参见 Holm, 上文 (1999), 和 Brenner, 上文 (1997))。

[0111] 在一些实施方案中,抗体变体包括与母体多肽的氨基酸序列相比糖基化位点的数目和/或类型已经改变的抗体变体。在一些实施方案中,蛋白质变体包括比天然蛋白质更多或更少数目 N-连接糖基化位点。一个 N-连接糖基化位点特征在于序列 :Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, 其中指定为 X 的氨基酸残基可以是除了脯氨酸的任何氨基酸残基。产生这个序列的氨基酸残基的取代作用提供添加 N-连接糖链的可能的新的位点。或者,去除这个序列的取代作用会去除存在的 N-连接糖链。还提供了 N-连接糖链的重排,其中一个或多个 N-连接糖基化位点(一般是天然存在的那些)被去除并且产生一个或多个新的 N-连接位点。另外的优选的抗体变体包括半胱氨酸变体,与母体氨基酸序列相比,其中一个或多个半胱氨酸残基被缺失或者取代成另一个氨基酸(例如,丝氨酸)。在抗体必须重新折叠成生物活性构型,例如在分离不溶性包涵体之后,则半胱氨酸变体可以是有用的。半胱氨酸变体一般比天然蛋白质具有更少的半胱氨酸残基,并且一般具有偶数以使没有配对的半胱氨酸产生的相互作用最小化。

[0112] 根据一些实施方案,氨基酸取代是那些,其:(1)降低对蛋白水解的易感性,(2)降低对氧化作用的易感性,(3)改变形成蛋白质复合体的结合亲和性,(4)改变结合亲和性,和/或(4)对这样的多肽赋予或改变其他生理化学或功能性质。根据一些实施方案,天然存在的序列中(在一些实施方案中,在形成分子间相互作用的结构域之外的多肽部分)可以进行一个或多个氨基酸取代(在一些实施方案中,保守氨基酸取代)。在一些实施方案中,一个保守性氨基酸取代一般基本不改变母体序列的结构特征(例如,置换氨基酸应该不会倾向于破坏母体序列中存在的螺旋,或者破坏其他类型的表征母体序列的二级结构)。本领域公知的多肽二级和三级结构的例子描述在 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, 编著, W. H. Freeman and Company, 纽约 (1984)); *Introduction*

to Protein Structure (C. Branden 和 J. Tooze, 编著, Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); 和 Thornton 等, Nature 354 :105 (1991), 这些文献在这里引作参考。

[0113] 这里使用的术语“多肽片段”指具有氨基-末端和/或羧基-末端缺失的多肽。在一些实施方案中, 片段至少 5 至 467 个氨基酸长。可以理解, 在一些实施方案中, 片段至少 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 或 450 个氨基酸长。

[0114] 在制药工业中肽类似物通常被用作具有和模板肽类似性质的非肽药物。这些非肽化合物类型称作“肽模拟物”。Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15 :29 (1986); Veber 和 Freidinger TINS p. 392 (1985); 和 Evans 等 J. Med. Chem. 30 :1229 (1987), 这些文献为了任何目的在此引作参考。经常借助计算机化分子模型开发这样的化合物。与治疗有用的肽结构相似的肽模拟物可以被用来产生相似治疗或预防作用。一般情况下, 肽模拟物结构上与范例多肽(即, 具有生物化学性质或药学性质), 例如人抗体相似, 但是具有通过本领域公知的方法通过选自下组的键任选地置换的一个或多个肽键:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ , 和  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。带有相同类型的 D-氨基酸的共有序列的一个或多个氨基酸的体系取代作用(例如, D-赖氨酸置换 L-赖氨酸)在一些实施方案中可以用来制备更稳定的肽。另外, 包括共有序列或基本上相同的共有序列变体的受限制肽可以通过本领域公知的方法制备 (Rizo 和 Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61 :387 (1992), 在这里为了任何目的引作参考); 例如, 通过添加能形成使肽环化的分子内二硫桥的内半胱氨酸残基。

[0115] “抗体”或“抗体肽”指完整抗体, 或与完整抗体竞争特异性结合的其结合片段。在一些实施方案中, 通过重组 DNA 技术制备结合片段。在一些实施方案中, 通过完整抗体的酶促或化学裂解制备结合片段。结合片段包括但不限于 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 和单链抗体。

[0116] 术语“重链”包括具有赋予对于 OPGL 的特异性的足够可变区序列的任何多肽。术语“轻链”包括具有赋予对于 OPGL 的特异性的足够可变区序列的任何多肽。全长重链包括可变区结构域, V<sub>H</sub>, 和三个恒定区结构域, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, 和 C<sub>H</sub>3。V<sub>H</sub>结构域在多肽的氨基末端, C<sub>H</sub>3 结构域在羧基末端。这里使用的术语“重链”包括全长重链及其片段。全长轻链包括可变区结构域, V<sub>L</sub>, 和恒定区结构域, C<sub>L</sub>。和重链一样, 轻链的可变区结构域在多肽的氨基末端。术语“轻链”, 如这里使用的, 包括全长轻链及其片段。Fab 片段由一条轻链和 C<sub>H</sub>1 和一条重链的可变区构成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。Fab' 片段包含一条轻链和一条重链, 其在 C<sub>H</sub>1 和 C<sub>H</sub>2 结构域之间包含更多的恒定区, 这样在两条重链之间能形成链间二硫键, 形成 F(ab')<sub>2</sub> 分子。Fv 区包括来自重链和轻链的可变区, 但是没有恒定区。单链抗体是 Fv 分子, 其中重链和轻链可变区通过柔性接头连接, 形成单链多肽, 其形成抗原-结合区。W088/01649 和美国专利 Nos. 4, 946, 778 和 5, 260, 203 详细讨论单链抗体。

[0117] 在一些实施方案中, 二价抗体而不是“多特异性”或“多功能”抗体, 一般理解其每个结合位点是相同的。

[0118] 当过量抗体将与反受体结合的受体的量减少至少大约 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 或更多(根据体外竞争结合分析测定的)时, 抗体基本上抑制配体与受体的粘附。

[0119] 术语“表位”包括能与免疫球蛋白或 T-细胞受体特异性结合的任何多肽决定

簇。在一些实施方案中,表位决定簇包括象氨基酸这样的分子的化学活性表面基团,糖侧链,磷酸基,或磺酰基,并且,在一些实施方案中,可以具有特异的三维结构特征,和/或特异的电荷特征。表位是抗体结合的抗原的区。在一些实施方案中,当它优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原,就说抗体特异性结合抗原。在一些实施方案中,当离解常数 $\leq 1 \mu\text{M}$ 时,在一些实施方案中,当离解常数 $\leq 100\text{nM}$ 时,在一些实施方案中,当离解常数 $\leq 10\text{nM}$ 时,就说抗体特异性结合抗原。

[0120] 这里使用的术语“试剂”指化合物,化合物的混合物,生物大分子,或从生物材料制备的提取物。

[0121] 如这里使用的,术语“标记”或“标记的”指插入可检测标记物,例如通过插入放射标记的氨基酸或连接能被标记的抗生物素蛋白(例如能被光学方法或比色法检测的含有荧光标记物或酶活性的链霉抗生物素蛋白)检测的生物素部分多肽。在一些实施方案中,标记或标记物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域公知的并且可以使用。多肽的标记的例子包括但不限于下组:放射性同位素或放射性核素(例如 $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{35}\text{S}$ , $^{90}\text{Y}$ , $^{99}\text{Tc}$ , $^{111}\text{In}$ , $^{125}\text{I}$ , $^{131}\text{I}$ ),荧光标记物(例如FITC,诺丹明,镧系磷光剂),酶标记(例如辣根过氧化物酶, $\beta$ -半乳糖苷酶,荧光素酶,碱性磷酸酶),化学发光剂,生物素基,预先确定的第二报道分子识别的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列,二抗的结合位点,金属结合结构域,表位标记)。在一些实施方案中,标记通过各种长度的间隔臂连接以减小可能的空间位阻。

[0122] 这里使用的术语“生物样品”包括但不限于任何量的来自活物或以前是活物的物质。这样的活物包括但不限于人,小鼠,猴,大鼠,兔,和其他动物。这样的物质包括但不限于血液,血清,尿液,细胞,组织,器官,骨,骨髓,淋巴结和皮肤。

[0123] 术语“骨质疏松疾病”包括但不限于骨质疏松,骨质疏松,佩吉特氏病,溶骨性转移灶,牙周炎,类风湿性关节炎和由于固定导致的骨损失。除了这些骨疾病之外,已知一些癌症提高破骨细胞活性并且诱导骨再吸收,例如乳腺癌,前列腺癌和多发性骨髓瘤。现在已知这些癌症产生导致骨中OPGL过量表达的因子,并且导致增加的破骨细胞数目和活性。

[0124] 这里使用的术语“药剂或药物”指当适当地对患者施用能诱导期望的治疗效果的化合物或组合物。

[0125] 这里使用的术语“调节剂”是改变分子的活性或功能的化合物。例如,与不存在调节剂下发现的活性或功能值相比,调节剂可以引起分子的一些活性或功能值的提高或降低。在一些实施方案中,调节剂是抑制剂,降低分子的至少一种活性或功能值。一些例示的分子的活性和功能包括但不限于结合亲和性,酶活性,和信号转导。一些例示的抑制剂包括但不限于蛋白质,肽,抗体,肽体,碳水化合物或小有机分子,肽体描述于例如W001/83525。

[0126] 如这里使用的,“基本上纯”指主体物质是占优势存在的物质(例如以摩尔为基础,它在组合物中比任何其他各种物质更丰富)。在一些实施方案中,基本上纯化的级分是其中主体物质包括占存在的全部大分子物质至少大约50%(摩尔比)的组合物。在一些实施方案中,基本上纯的组合物含有组合物中存在的的所有的大分子物质的大约80%,85%,90%,95%,或99%以上。在一些实施方案中,主体物质被纯化至基本上均质(通过常规检测方法不能检测到组合物中的杂质物质),其中组合物基本上由单一大分子物质组成。

[0127] 术语患者包括人和动物受试者。



[0128] 在本申请中,除非另外具体说明,单数包括复数。在本申请中,“或”的使用除非另有说明意思是“和/或”。此外,术语“包括”以及其他形式,例如“includes”和“included”不是局限性的。还有,除非另有说明,术语“元素”或“成分”包括包括一个单位的元素和成分以及包括一种以上亚单位的元素和成分这两种情况。

[0129] 破骨细胞形成中涉及骨保护素配体(OPGL),细胞因子的肿瘤坏死因子(TNF)家族成员。提高的破骨细胞活性与很多骨质稀少疾病有关,包括绝经后骨质疏松,佩吉特氏病,溶骨转移灶,和类风湿性关节炎。因此,OPGL活性降低可以导致破骨细胞活性的降低并且可以降低骨质稀少疾病的严重性。根据本发明的一些实施方案,针对OPGL的抗体可以被用来治疗骨质稀少疾病,包括但不限于上面提到的那些。

[0130] 在本发明的一些实施方案中,提供了抗人骨保护素配体(OPGL)的全长人单克隆抗体。在一些实施方案中,提供了包括重链和轻链免疫球蛋白,特别是相应于可变区的序列的氨基酸序列及其编码核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了相应于互补决定区(CDR),特别是从CDR1至CDR3的序列。根据一些实施方案,也提供了表达这样的免疫球蛋白分子和单克隆抗体的杂交瘤细胞系。在一些实施方案中,提供了抗人OPGL的纯化的人单克隆抗体。

[0131] 在人工酵母染色体(YAC)中克隆和再构建兆碱基大小的人基因座并且将它们导入小鼠种系的能力为说明非常大或粗略作图基因座的功能成分以及制备有用的人疾病模型提供了一条途径。此外,应用用它们的人等价物取代小鼠基因座这样的技术能为发育期间人基因产物的表达和调节,它们与其他系统的联系,以及它们在疾病诱导和进展中的参与提供独特视角。

[0132] 这样一种策略重要的实施是小鼠体液免疫系统的“人源化”。将人免疫球蛋白(Ig)基因座导入小鼠,其中内源Ig基因已失活,为抗体程序表达和组装以及它们在B-细胞发育中的作用的机理研究提供了机会。此外,这样的策略为制备完全的人单克隆抗体(Mabs)提供了来源。在一些实施方案中,预期完全的人抗体将小鼠固有的或小鼠产生的Mabs免疫原性和变应性反应最小化,因此,在一些实施方案中,提高施用的抗体的效力和安全性。在一些实施方案中,在慢性和复发人疾病例如骨质疏松,炎症,自身免疫和癌症的治疗中可以使用完全的人抗体,包括反复施用抗体。

[0133] 人们能通过基因工程产生小鼠抗体产生缺陷,具有人Ig基因座大片段的小鼠株,预期这样的小鼠在没有小鼠抗体存在下能产生人抗体。大的人Ig片段可以保留大的可变基因多样性,以及抗体产生和表达的适当调节。通过利用抗体多样性和选择以及缺失对人蛋白质的免疫耐受性的小鼠机制,这些小鼠株中重复产生的人抗体所有组成成分可以得到抗所有感兴趣的抗原,包括人抗原的高亲和力抗体。利用杂交瘤技术,可以制备和选择具有期望的特异性的抗原特异性人Mabs。

[0134] 在一些实施方案中,人们可以使用来自人之外的物种的恒定区以及人可变区。

[0135] 天然存在的抗体结构

[0136] 天然存在的抗体结构单元一般包括四聚体。每一个这样的四聚体一般由两个相同的多肽链对组成,每一对具有一条全长“轻链”(在一些实施方案中,大约25kDa)和一条全长“重链”(在一些实施方案中,大约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分一般包括大约100至110或更多氨基酸的可变区,其一般负责抗原识别。每条链的羧基末端部分一般定义负

责效应物功能的恒定区。人轻链一般分类为  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链。重链一般分类为  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , 或  $\epsilon$ , 抗体同种型分别定义为 IgM, IgD, IgG, IgA, 和 IgE。IgG 有几个亚类, 包括但不限于 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4。IgM 有几个亚类, 包括但不限于 IgM1 和 IgM2。类似地, IgA 分为几个亚类, 包括但不限于 IgA1 和 IgA2。一般情况下, 全长轻链和重链中, 可变区和恒定区通过大约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接, 重链也包括大约 10 个以上氨基酸的“D”区。参见, 例如, *Fundamental Immunology* 第七章 (Paul, W. 编著, 第二版, Raven Press, N. Y. (1989)) (为所有的目的全文引作参考)。各个轻 / 重链对的可变区一般形成抗原结合位点。

[0137] 可变区一般具有相同的相对保守的构架区 (FR) 的一般结构, 通过三个超可变区, 也称作互补决定区或 CDR 连接。各对两个链的 CDRs 一般通过构架区排列, 其可以与特异性表位结合。从 N- 末端至 C- 末端, 轻链和重链可变区一般包括结构域 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 和 FR4。氨基酸在每个结构域的排列一般根据 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest 的定义 (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 和 1991)), 或 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196 :901-917 (1987); Chothia 等, *Nature* 342 : 878-883 (1989)。

[0138] 双特异性和双功能抗体

[0139] 双特异性和双功能抗体一般是具有两个不同的重链 / 轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。通过各种方法可以制备双特异性抗体, 包括但不限于杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接。参见, 例如, Song & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79 : 315-321 (1990), Kostelny 等, *J. Immunol.* 148 :1547-1553 (1992)。

[0140] 抗体的制备

[0141] 根据一些实施方案, 本发明包括特异性结合 OPGL 的一些抗体。在一些实施方案中, 通过用全长 OPGL, OPGL 的可溶形式, 或者其片段免疫, 可以制备抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗体可以是多克隆或单克隆的, 和 / 或可以是重组抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗体是例如通过对能产生人抗体的转基因动物免疫而制备的 (参见, 例如, PCT 公开申请 No. W093/12227)。

[0142] 在一些实施方案中,  $\alpha$  OPGL-1 的轻链和重链可变区的互补决定区 (CDRs) 可以嫁接于来自相同或另一种物种的构架区 (FRs)。在一些实施方案中,  $\alpha$  OPGL-1 的轻链和重链可变区的 CDRs 可以嫁接于共有人 FRs。为了产生共有人 FRs, 在一些实施方案中, 来自几种人重链或轻链氨基酸序列的 FRs 被比对, 以鉴定共有氨基酸序列。在一些实施方案中,  $\alpha$  OPGL-1 重链或轻链的 FRs 被来自不同重链或轻链的 FRs 置换。在一些实施方案中,  $\alpha$  OPGL-1 轻链和重链的 FRs 中罕见氨基酸不被置换, 而其余 FR 氨基酸被置换。罕见氨基酸是通常在 FRs 中没有发现它们的位置上的特异氨基酸。在一些实施方案中, 来自  $\alpha$  OPGL-1 的嫁接的可变区可以与和  $\alpha$  OPGL-1 的恒定区不同的恒定区使用。在一些实施方案中, 嫁接的可变区是单链 Fv 抗体的一部分。CDR 嫁接描述于例如美国专利 No. 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 和 5530101, 为了任何目的引作参考。

[0143] 根据一些实施方案, 通过使用转基因小鼠制备本发明的抗体, 所述小鼠具有插入的产生人抗体基因组的大部分, 但是使得内源鼠抗体的产生有缺陷。这样的小鼠能产生人免疫球蛋白分子和抗体, 但是鼠免疫球蛋白分子和抗体的产生有缺陷。用来实现该结果的

技术在这里说明书中公开的专利,申请和参考文献中公开。在一些实施方案中,人们可以使用例如 PCT 公开申请 No. W098/24893 中公开的那些,该专利文献在此为任何目的引作参考。也参见 Mendez 等, Nature Genetics 15 :146-156 (1997),该专利文献在此为任何目的引作参考。

[0144] 根据一些实施方案,如下制备对 OPGL 特异性的完全的人单克隆抗体。用感兴趣的抗原免疫包含人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。获得来自表达抗体的小鼠的淋巴细胞(例如 B- 细胞)。这样回收的细胞与骨髓型细胞系融合制备无限增殖杂交瘤细胞系,并且对这样的杂交瘤细胞系进行筛选和选择,来鉴定产生对感兴趣的抗原特异性的抗体的杂交瘤细胞系。在一些实施方案中,提供了产生对 OPGL 特异性抗体的杂交瘤细胞系的制备。

[0145] 在一些实施方案中,杂交瘤细胞系 AMG6. 1, AMG6. 4, AMG6. 5, AMG7. 1 和 AMG7. 2 产生本发明的抗体。在一些实施方案中,杂交瘤细胞系 AMG6. 1, AMG6. 4 和 AMG6. 5 产生本发明的抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体结合 OPGL, 离解常数 (Kd) 大约为 0. 23 和 0. 29nM。在本发明的一些实施方案中,抗体与 Kd 以小于 0. 23nM 的 OPGL 结合。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的抗体是 IgG2 同种型。在本发明的一些实施方案中,抗体包括人  $\kappa$  轻链和人 IgG2 重链。在一些实施方案中,克隆本发明的抗体用于在哺乳动物细胞中表达。在一些实施方案中,抗体的可变区与 IgG2 同种型恒定区之外的恒定区连接。

[0147] 在一些实施方案中,对  $\alpha$  OPGL-1 的重链和轻链的保守性修饰(并且对编码核苷酸进行相应的修饰)会产生具有和  $\alpha$  OPGL-1 的那些相似的功能和化学特征的 OPGL 的抗体。相反,通过选择重链和轻链氨基酸序列中的取代可以完成  $\alpha$  OPGL-1 的功能和/或化学特征的显著修饰,它们对保持下面的性质的作用显著不同:(a) 取代作用区域中的分子主链的结构,例如,作为片层或螺旋构象,(b) 靶位点的分子的电荷或疏水性,或(c) 侧链体积。

[0148] 例如,“保守性氨基酸取代”可以包括非天然氨基酸残基对天然氨基酸残基的取代,使得对那个位点的氨基酸残基的极性 or 电荷几乎没有或没有影响。此外,多肽中的任何天然残基也可以被丙氨酸取代,这一点以前对于“丙氨酸扫描诱变”已经描述过。

[0149] 本领域技术人员在期望这样的取代时能确定期望的氨基酸取代作用(不管是保守性的或非保守性的)。在一些实施方案中,氨基酸取代可以用来鉴定  $\alpha$  OPGL-1 的重要的残基,或者提高或降低抗体对这里描述的 OPGL 的亲合性。

[0150] 在一些实施方案中,本发明的抗体能在杂交瘤细胞系之外的细胞系中表达。在一些实施方案中,编码特定抗体的序列能被用来转化合适的哺乳动物宿主细胞。根据一些实施方案,通过任何公知的将多核苷酸导入宿主细胞的方法能进行转化,包括,例如在病毒(或病毒载体)中包装多核苷酸和用病毒(或载体)转导宿主细胞或者通过本领域公知的转染方法,例如美国专利 No. 4399216, 4912040, 4740461 和 4959455 中举例说明的那些(这些专利文献在此为了任何目的引作参考)。在一些实施方案中,使用的转化方法可以根据要转化的宿主而定。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞中的方法是本领域公知的,包括但不限于葡聚糖介导的转染,磷酸钙沉淀,1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物介导的转染,原生质融合,电穿孔,多核苷酸在脂质体中的胶囊化作用,和直接将 DNA 微注射到核中。

[0151] 可获得的作为用于表达的宿主的哺乳动物细胞系是本领域公知的,包括但不限于从美国典型培养物保藏中心(ATCC)可获得的很多无限增殖细胞系,包括但不限于中国仓

鼠卵巢 (CHO) 细胞, HeLa 细胞, 小仓鼠肾 (BHK) 细胞, 猴肾细胞 (COS), 人肝细胞癌细胞 (例如 Hep G2) 和很多其它细胞系。在一些实施方案中, 通过测定哪一种细胞系有高表达水平并且产生具有组成型 OPGL 结合性质的抗体可以选择细胞系。

[0152] 根据一些实施方案, 本发明的抗体可用于检测生物样品中的 OPGL。在一些实施方案中, 这使得可以鉴定产生蛋白质的细胞或组织。在一些实施方案中, 与 OPGL 结合并且阻断与其它结合化合物相互作用的抗体在调节破骨细胞分化和骨再吸收中具有治疗性用途。在一些实施方案中, 抗 OPGL 抗体可以阻断 OPGL 结合 ODAR, 这可以导致信号转导级联中的阻断和 NF- $\kappa$ B 介导的转录激活作用的丧失。应用例如荧光素酶报道分子测定测量 NF- $\kappa$ B 介导的转录激活作用的分析是本领域技术人员公知的。

[0153] 在一些实施方案中, 提供了治疗骨病的方法, 包括施用治疗有效量的抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中, 提供了治疗骨病的方法, 包括施用治疗有效量的抗 OPGL 抗体和另一种治疗剂。在一些这样的实施方案中, 以治疗有效量施用所述另外的治疗剂。在一些实施方案中, 所述骨病是特征在于净骨损失的疾病, 包括但不限于骨质稀少和骨质溶解。在一些实施方案中, 使用抗 OPGL 抗体的治疗抑制骨再吸收速度。因此, 在一些实施方案中, 为了补偿骨形成低于正常水平, 可以应用治疗来降低再吸收速度高于正常的骨再吸收速度, 或者将骨再吸收降低至低于正常水平。在一些实施方案中, 可以对抗体测定不存在或存在 OPGL 下与 OPGL 的结合, 并且检查它们抑制 OPGL 介导的破骨细胞生成和 / 或骨再吸收的能力。

[0154] 根据一些实施方案可以治疗的状况包括但不限于下组:

[0155] 骨质疏松症, 包括但不限于原发性骨质疏松症, 内分泌骨质疏松症 (包括但不限于甲状腺功能亢进, 甲状旁腺功能亢进, 库欣综合征, 和肢端肥大症), 骨质疏松症的遗传和先天形式 (包括但不限于成骨不全, 高胱氨酸尿症, 门克斯综合征, 赖-戴综合征), 和由于肢端固定的骨质疏松症;

[0156] 成年人和少年骨佩吉特氏病 (畸形性骨炎);

[0157] 骨髓炎, 即导致骨损失的骨感染性病变;

[0158] 高钙血症, 包括但不限于实体肿瘤 (包括但不限于乳房, 肺和肾) 和血液恶性病变 (包括但不限于多发性骨髓瘤, 淋巴瘤和白血病) 导致的高钙血症, 特发性高钙血症, 和与甲状腺功能亢进和肾功能失调相关的高钙血症;

[0159] 骨质稀少, 包括但不限于手术之后的骨质稀少, 施用甾族药物诱导的骨质稀少, 与小肠和大肠疾病相关的骨质稀少, 和与慢性肝和肾病相关的骨质稀少;

[0160] 骨坏死, 即骨细胞死亡, 包括但不限于与创作性损伤有关的骨坏死, 与戈谢病有关的骨坏死, 与镰状细胞贫血有关的骨坏死, 与系统性红斑狼疮有关的骨坏死, 与类风湿性关节炎有关的骨坏死, 与牙周病有关的骨坏死, 与溶骨性转移有关的骨坏死, 与其它状况有关的骨坏死; 和

[0161] 与类风湿性关节炎有关的软骨损失和关节侵蚀。

[0162] 在一些实施方案中, 可以单独地或者与至少一种用于治疗骨病的另外的治疗剂一起使用抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中, 与治疗有效量的另外一种治疗剂结合使用抗 OPGL 抗体。可以与抗 OPGL 抗体一起施用的举例的治疗剂包括但不限于指定为 BMP-1 至 BMP-12 的骨形态发生因子, 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 和 TGF- $\beta$  家族成员; 白介素-1 (IL-1) 抑制剂, 包括但不限于 IL-1ra 及其衍生物和 Kineret<sup>TM</sup>, anakinra; TNF  $\alpha$  抑制剂, 包括但不限于

可溶性 TNF $\alpha$  受体, Enbrel<sup>TM</sup>, etanercept, 抗 -TNF $\alpha$  抗体, Remicade<sup>TM</sup>, 英夫单抗, 和 D2E7 抗体; 甲状旁腺素及其类似物; 甲状旁腺素相关蛋白及其类似物; E 系列前列腺素; 双磷酸盐 (例如阿仑特罗和其他); 骨增强矿物例如氟化物和钙; 非甾族抗炎药物 (NSAIDs), 包括但不限于 COX-2 抑制剂, 例如 Celebrex<sup>TM</sup>, 塞来西布, 和 Vioxx<sup>TM</sup>, 罗非克西; 免疫抑制剂, 例如甲氨蝶呤或来氟米特, 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 包括但不限于分泌性白细胞蛋白酶抑制剂 (SLPI); IL-6 抑制剂 (包括但不限于抗 IL-6 抗体), IL-8 抑制剂 (包括但不限于抗 IL-8 抗体), IL-18 抑制剂 (包括但不限于 IL-18 结合蛋白和抗 IL-18 抗体), 白介素 -1 转化酶 (ICE) 调节剂; 成纤维细胞生长因子 FGF-1 至 FGF-10 和 FGF 调节剂; PAF 拮抗剂; 角质形成细胞生长因子 (KGF), KGF- 相关分子, 和 KGF 调节剂; 基质金属蛋白酶 (MMP) 调节剂; 一氧化氮合酶 (NOS) 调节剂, 包括但不限于, 诱导型 NOS 的调节剂; 糖皮质激素受体调节剂; 谷氨酸受体调节剂; 脂多糖 (LPS) 水平调节剂; 和去甲肾上腺素和调节剂及其模拟物。

[0163] 在一些实施方案中, 抗 OPGL 抗体与特定治疗剂一起使用来治疗各种炎症状况, 自身免疫状况, 或伴随骨损失的其他试剂。在一些实施方案中, 根据状况和期望的治疗水平, 可以施用两种, 三种或更多试剂。在一些实施方案中, 通过包含在相同配方中一起提供这些试剂。在一些实施方案中, 通过包含在相同配方中一起提供这样的试剂和抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中, 通过包含在治疗试剂盒中可以一起提供这样的试剂。在一些实施方案中, 通过包含在治疗试剂盒中可以一起提供这样的试剂和抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中, 可以分开提供这样的试剂。在一些实施方案中, 当通过基因治疗施药时, 相同载体中可以包含编码蛋白质试剂和 / 或抗 OPGL 抗体的基因。在一些实施方案中, 编码蛋白质试剂和 / 或抗 OPGL 抗体的基因可以处于相同启动子区的控制下。在一些实施方案中, 编码蛋白质试剂和 / 或抗 OPGL 抗体的基因可以在分开的载体中。

[0164] 在一些实施方案中, 本发明涉及包括抗 OPGL 抗体和至少一种白介素 -1 (IL-1) 抑制剂的治疗方案, 和应用这样的治疗方案的治疗方法。在一些实施方案中, 治疗方案包括抗 OPGL 抗体和 IL-1 抑制剂和至少一种这里描述的另外的分子。在一些实施方案中, 治疗方法与抗 OPGL 抗体联合使用 IL-1 抑制剂和 / 或 TNF $\alpha$  抑制剂。在一些实施方案中, 抗 OPGL 抗体与 IL-1 抑制剂和 / 或 TNF $\alpha$  抑制剂联合可以用于治疗哮喘, 类风湿性关节炎和多发性硬化这样的状况。

[0165] 白介素 -1 (IL-1) 是抗炎细胞因子。在一些例子中, IL-1 是很多疾病和医学状况中的介导体。在一些例子中, 巨噬细胞 / 单细胞系细胞生产 IL-1。在一些例子中, IL-1 以两种形式产生: IL-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 和 IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )。

[0166] 如果自发的或实验性疾病或医学状况与体液或组织中升高的 IL-1 水平有关和 / 或如果来自身体的细胞或组织在培养物中产生升高水平的 IL-1, 则认为这种疾病或医学状况是“白介素 -1 介导的疾病”。在一些实施方案中, 通过下面另外两种状况识别这样的白介素 -1 介导的疾病: (1) 通过施用 IL-1 或上调 IL-1 的表达能从实验上用动物模拟与疾病或医学状况相关的病理发现; 和 (2) 通过用抑制 IL-1 作用的试剂治疗能抑制或消除疾病或医学状况中实验动物模型中诱导的病理。在一些实施方案中, 上述状况中的一项或多项符合 IL-1- 介导的疾病。在一些实施方案中, 所有三种状况都符合 IL-1- 介导的疾病。

[0167] 急性和慢性白介素 -1 (IL-1)- 介导的疾病包括但不限于下组: 急性胰腺炎; 肌萎缩侧索硬化 (ALS, 或 Lou Gehrig's 病); 阿尔茨海默病; 恶病质 / 厌食, 包括但不限于

AIDS- 诱导的恶病质 ;哮喘和其它肺病 ;动脉粥样硬化 ;自身免疫性脉管炎 ;慢性疲劳综合征,梭状芽孢杆菌相关疾病,包括但不限于梭状芽孢杆菌相关腹泻,冠状动脉状况和适应症,包括但不限于充血性心衰,冠状动脉再狭窄,心肌梗塞,心肌功能障碍(例如与脓毒症有关),和冠状动脉旁路移植 ;癌症,包括但不限于白血病,包括但不限于多发性骨髓瘤白血病和髓细胞白血病(例如 AML 和 CML),和肿瘤转移 ;糖尿病(包括但不限于胰岛素依赖性糖尿病) ;子宫内膜异位 ;发热 ;纤维肌瘤 ;肾小球肾炎 ;移植物抗宿主疾病和 / 或移植物排斥 ;出血性休克 ;痛觉过敏 ;炎性肠病 ;关节炎状况,包括但不限于骨关节炎,牛皮癣关节炎,和类风湿性关节炎 ;炎性眼病,包括但不限于例如与角膜移植有关的那些 ;局部缺血,包括但不限于脑局部缺血(包括但不限于作为例如创伤,癫痫,出血或中风的结果的脑损伤,这些的每一种情况都可以导致神经变性) ;Kawasaki' s 病 ;学习障碍 ;肺病(包括但不限于急性呼吸窘迫综合症,或 ARDS) ;多发性硬化 ;肌病(例如肌肉蛋白质代谢,包括但不限于脓毒症中的肌肉蛋白质代谢) ;神经毒性(包括但不限于 HIV 诱导的这样的状况) ;骨质疏松症 ;疼痛,包括但不限于与癌症相关的疼痛 ;帕金森氏病 ;牙周病 ;早产 ;牛皮癣 ;再灌注损伤 ;脓毒性休克 ;放射治疗副作用 ;颞颌关节病 ;睡眠障碍 ;葡萄膜炎 ;从例如由劳损,扭伤,软骨损伤,创伤,整形术,感染,或其它疾病过程引起的炎症。

[0168] 在一些实施方案中, IL-1 抑制剂可以是能特异性防止细胞受体激活成 IL-1 的任何蛋白质或分子。举例说明的机理包括但不限于下调 IL-1 产生,结合游离 IL-1,干扰 IL-1 与其受体结合,干扰 IL-1 受体复合体的形成(即 IL-1 受体与 IL-1 受体辅助蛋白缔合),干扰与其受体结合之后 IL-1 信号传递的调节。

[0169] 一些白介素 -1 抑制剂包括但不限于 IL-1 受体拮抗剂,包括但不限于 Kineret™, anakinra, IL-1ra, IL-1ra 变体,和 IL-1ra 衍生物,这里统称为“IL-1ra 蛋白质”;抗 -IL-1 受体单克隆抗体(参见,例如, EP623674, 为任何目的在此引作参考); IL-1 结合蛋白,包括但不限于,可溶性 IL-1 受体(参见,例如,美国专利 No. 5492888, 美国专利 No. 5488032, 和美国专利 No. 5464937, 美国专利 No. 5319071, 和美国专利 No. 5180812, 为任何目的在此引作参考);抗 -IL-1 单克隆抗体(参见,例如, W09501997, W09402627, W09006371, 美国专利 No. 4935343, EP364778, EP267611 和 EP220063, 为任何目的在此引作参考); IL-1 受体辅助蛋白及其抗体(参见,例如, W096/23067 和 W099/37773, 为任何目的在此引作参考);白介素 -1 $\beta$  转化酶 (ICE) 或 caspase 的抑制剂(参见,例如, W099/46248, W099/47545, 和 W099/47154, 为任何目的在此引作参考),其可以用来抑制 IL-1 $\beta$  产生和分泌;白介素 -1 $\beta$  蛋白酶抑制剂;和阻断 IL-1 的体内合成或胞外释放的其他化合物和蛋白质。

[0170] 例示的 IL-1 抑制剂公开于,例如美国专利 No. 5747444, 5359032 ;5608035 ;5843905 ;5359032 ;5866576 ;5869660 ;5869315 ;5872095 ;5955480 ;5965564 ; 国际 专 利 申 请 (W0)98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426, 99/36415 ;欧洲专利申请 (EP)534978 和 894795 ;和法国专利申请 FR2762514。所有上述参考文献的公开内容为任何目的在此引作参考。

[0171] 白介素 -1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 是作为白介素 -1 的天然抑制剂起作用的人蛋白质并且是 IL-1 家族的成员,包括 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ 。一些受体拮抗剂,包括 IL-1ra 和变体及其衍生物,以及制备和使用它们的方法描述于美国专利 No. 5075222 ;W091/08285 ;

WO91/17184 ;AU9173636 ;WO92/16221 ;WO93/21946 ;WO94/06457 ;WO94/21275 ;FR2706772 ;WO94/21235 ;DE4219626 ;WO94/20517 ;WO96/22793 ;WO97/28828 ;和 WO99/36541, 它们为任何目的在此引作参考。在一些实施方案中, IL-1 受体拮抗剂可以是糖基化的。在一些实施方案中, IL-1 受体拮抗剂可以是非糖基化的。

[0172] 美国专利 No. 5075222 (' 222 专利) 中描述了 IL-1ra 的三种形式及其变体。第一种形式在美国专利 No. 5075222 中被称作“IL-1i”, 表征为 SDS-PAGE 上的 22-23kD 的分子, 等电点大约是 4.8, 从 Mono QFPLC 柱子上用大约含 52mM NaCl 的 Tris 缓冲液, pH7.6 洗脱。第二种形式, IL-1ra $\beta$ , 表征为 22-23kD 蛋白质, 从 Mono Q 柱子上用 48mM NaCl 洗脱。IL-1ra $\alpha$  和 IL-1ra $\beta$  是糖基化的。第三种形式, IL-1rax, 表征为 20kD 蛋白质, 从 Mono Q 柱子上用 48mM NaCl 洗脱, 并且是非糖基化的。美国专利 No. 5075222 还描述了一些编码抑制剂的基因的分离方法, 在合适的载体中克隆那些基因的方法, 将那些基因转化和转染到一些细胞类型中的方法, 和表达那些基因产生抑制剂的方法。

[0173] 在一些实施方案中, IL-1ra 氨基酸序列中进行了缺失, 插入, 和 / 或取代 ( 分别或统称作“变体”)。在一些实施方案中, IL-1ra 变体是生物活性的 ( 例如具有抑制 IL-1 的能力)。

[0174] 在一些实施方案中, 本发明涉及包括抗 OPGL 抗体和至少一种 TNF $\alpha$  抑制剂的治疗方案, 和应用该治疗方案的方法。在一些实施方案中, 治疗方案包括抗 OPGL 抗体和 TNF $\alpha$  抑制剂和至少一种这里描述的另外的分子。

[0175] 一些疾病和医学状况是由 TNF 介导的并且归类为炎症状况。如这里使用的“TNF- 介导的疾病”包括但不限于与体液或组织中升高水平的 TNF 相关的和 / 或其中细胞或组织取自在培养物中产生高水平 TNF 的个体的疾病或医学状况。在一些实施方案中, 如果 (1) 通过施用或上调 TNF 表达在动物中能实验性模拟与疾病或医学状况相关的病理发现和 / 或 (2) 通过用抑制 TNF 作用的试剂治疗能抑制或破坏疾病或医学状况的实验动物模型中诱导的病理, 则认为疾病是 TNF- 介导疾病。

[0176] 一些疾病和医学状况是 TNF 介导的, 并且可以分类为炎症状况。如这里使用的, “TNF 介导的疾病”包括但不限于: 恶病质和厌食; 癌症, 包括但不限于, 白血病; 慢性疲劳综合征; 冠状动脉状况和 / 或适应症, 包括但不限于, 充血性心衰, 冠状再狭窄, 心肌梗塞, 心肌功能障碍 ( 包括但不限于与脓毒症有关的这样的状况), 和冠状动脉旁路移植; 抑郁症; 糖尿病, 包括但不限于, 青少年起病 1 型糖尿病, 糖尿病, 和胰岛素抗性 ( 包括但不限于与肥胖有关的胰岛素抗性); 子宫内膜异位, 子宫内膜炎, 和相关的状况; 纤维肌瘤和痛觉缺失; 移植物抗宿主排斥; 痛觉过敏; 炎性肠病, 包括但不限于克隆氏病和艰难梭菌 - 相关腹泻; 局部缺血, 包括但不限于, 作为创伤, 癫痫, 出血, 和 / 或中风结果的脑损伤; 肺病, 包括但不限于成人呼吸窘迫综合征, 哮喘, 肺纤维化; 多发性硬化; 神经炎性疾病; 眼部疾病和状况, 包括但不限于角膜移植, 眼退化和葡萄膜炎; 疼痛, 包括但不限于, 与癌相关的疼痛; 胰腺炎, 牙周病; 毛发红糠疹 (PRP); 前列腺炎, 包括细菌性和非细菌性前列腺炎, 和相关状况; 牛皮癣和相关状况; 肺纤维化; 再灌注损伤; 风湿病, 包括但不限于类风湿性关节炎, 骨关节炎, 青少年关节炎 ( 包括但不限于青少年类风湿性关节炎), 血清反应阴性多关节炎, 强直性脊柱炎, Reiter's 综合征和反应性关节炎, Still's 病, 牛皮癣关节炎, 肠病关节炎, 多肌炎, 皮肌炎, 硬皮病, 系统性硬化, 脉管炎 ( 例如 Kawasaki's 病), 脑脉管炎, 赖姆病, 葡萄

球菌诱导 (“脓毒性”) 的关节炎, 斯耶格伦综合征, 风湿热, 多软骨炎和风湿性多肌病和巨细胞动脉炎); 脓毒性休克; 放疗副作用; 系统性红斑狼疮 (SLE); 颞颌关节病; 甲状腺炎; 和组织移植和 / 或例如由劳损, 扭伤, 软骨损伤, 创伤, 整形术, 感染 (例如 HIV, 艰难梭菌和相关物种) 或其他疾病过程引起的炎症。

[0177] 在一些实施方案中, TNF 抑制剂通过下调或抑制 TNF 产生, 结合游离 THF, 干扰 TNF 与其受体结合, 和干扰与其受体结合之后 TNF 信号传递调节中的至少一种而发挥作用。术语 “TNF 抑制剂” 包括但不限于可溶性 TNF 受体, 包括但不限于, 可溶性肿瘤坏死因子受体 I 型 (sTNF-RI; 也称作 p55 受体), 可溶性肿瘤坏死因子受体 II 型 (也称作 p75 受体), 和 Enbrel™, etanercept; 抗 TNF 抗体, 包括但不限于, Remicade™, 英夫单抗和 D2E7 (参见, 例如美国专利 No. 6090382 和 6258562); 抗 TNF 受体抗体; sTNF-RI (参见, 例如, W098/24463), Etanercept (Enbrel™); TNF- $\alpha$  转化酶 (TACE) 的抑制剂; 和影响 TNF 活性的其他分子。

[0178] 例示的 TNF- $\alpha$  抑制剂描述于, 例如, 欧洲专利申请

[0179] EP308378 ; EP422339 ; EP393438 ; EP398327 ; EP412486 ; EP418014, EP417563, EP433900 ; EP464533 ; EP512528 ; EP526905 ; EP568928 ; EP607776, 其中描述了来氨米特抑制 TNF- $\alpha$  的用途; EP663210 ; EP542795 ; EP818439 ; EP664128 ; EP542795 ; EP741707 ; EP874819 ; EP882714 ; EP880970 ; EP648783 ; EP731791 ; EP895988 ; EP550376 ; EP882714 ; EP853083 ; EP550376 ; EP943616 ; EP939121 ; EP614984 ; EP853083 ; 美国专利号 5, 136, 021 ; 5, 929, 117 ; 5, 948, 638 ; 5, 807, 862 ; 5, 695, 953 ; 5, 834, 435 ; 5, 817, 822 ; 5830742 ; 5, 834, 435 ; 5, 851, 556 ; 5, 853, 977 ; 5, 359, 037 ; 5, 512, 544 ; 5, 695, 953 ; 5, 811, 261 ; 5, 633, 145 ; 5, 863, 926 ; 5, 866, 616 ; 5, 641, 673 ; 5, 869, 677 ; 5, 869, 511 ; 5, 872, 146 ; 5, 854, 003 ; 5, 856, 161 ; 5, 877, 222 ; 5, 877, 200 ; 5, 877, 151 ; 5, 886, 010 ; 5, 869, 660 ; 5, 859, 207 ; 5, 891, 883 ; 5, 877, 180 ; 5, 955, 480 ; 5, 955, 476 ; 5, 955, 435 ; 5, 994, 351 ; 5, 990, 119 ; 5, 952, 320 ; 5, 962, 481 ; 国际专利申请 W090/13575, W091/03553, W092/01002, W092/13095, W092/16221, W093/07863, W093/21946, W093/19777, W095/34326, W096/28546, W098/27298, W098/30541, W096/38150, W096/38150, W097/18207, W097/15561, W097/12902, W096/25861, W096/12735, W096/11209, W098/39326, W098/39316, W098/38859, W098/39315, W098/42659, W098/39329, W098/43959, W098/45268, W098/47863, W096/33172, W096/20926, W097/37974, W097/37973, W097/47599, W096/35711, W098/51665, W098/43946, W095/04045, W098/56377, W097/12244, W099/00364, W099/00363, W098/57936, W099/01449, W099/01139, W098/56788, W098/56756, W098/53842, W098/52948, W098/52937, W099/02510, W097/43250, W099/06410, W099/06042, W099/09022, W099/08688, W099/07679, W099/09965, W099/07704, W099/06041, W099/37818, W099/37625, W097/11668, W099/50238, W099/47672, W099/48491 ; 日本专利申请 10147531, 10231285, 10259140, 和 10130149, 10316570, 11001481, 和 127, 800/1991 ; 德国专利申请 19731521 ; 和英国专利申请 2218101, 2326881, 2246569。

[0180] 所有上面提到的参考文献公开内容为了任何目的在此引作参考。

[0181] EP393438 和 EP422339 描述了可溶性 TNF 受体 I 型 (也已知为 sTNFR-I 或 30kDa TNF 抑制剂) 和可溶性 TNF 受体 II 型 (也已知为 sTNFR-II 或 40kDa TNF 抑制剂), 这里统称作 “sTNFRs”。EP393438 和 EP422339 还描述了 sTNFR-I 和 sTNFR-II 的修饰形式, 包括但不限于, 片段, 功能衍生物, 和变体。此外, EP393438 和 EP422339 描述了编码抑制剂的基因



的分离方法,在合适的载体中克隆基因的方法,将基因转化和转染到一些细胞类型中的方法,和表达基因产生抑制剂的方法。

[0182] sTNFR-I 和 sTNFR-II 是神经生长因子/TNF 受体的受体超家族成员,包括神经生长因子受体(NGF),B 细胞抗原 CD40,4-1BB,大鼠 T- 细胞抗原 MR COX40,fas 抗原,和 CD27 和 CD30 抗原(Smith 等(1990)Science248:1019-1023)。这组细胞表面受体的保守特征是富含半胱氨酸的胞外配体结合结构域,它们可以分为在非常保守的位置包含 4-6 个半胱氨酸残基大约 40 个氨基酸的四个重复基序(Smith 等(1990),上文)。

[0183] EP393438 公开了 40kDa TNF 抑制剂  $\Delta 51$  和 40kDa TNF 抑制剂  $\Delta 53$ ,它们是全长重组 40kDa TNF 抑制剂蛋白质的截短形式。 $\Delta 51$  和  $\Delta 53$  分别在成熟蛋白质的羧基末端缺失 51 或 53 个氨基酸。

[0184] 公开的 PCT 申请 No. W098/01555 描述了不包含第四结构域(sTNFR-I 的氨基酸残基 Thr<sup>127</sup>-Asn<sup>161</sup>和 sTNFR-II 的氨基酸残基 Pro<sup>141</sup>-Thr<sup>179</sup>);第三结构域的一部分(sTNFR-I 的氨基酸残基 Asn<sup>111</sup>-Cys<sup>126</sup>和 sTNFR-II 的氨基酸残基 Pro<sup>123</sup>-Lys<sup>140</sup>);和任选地,不包含第一结构域的一部分(sTNFR-I 的氨基酸残基 Asp<sup>1</sup>-Cys<sup>19</sup>和 sTNFR-II 的氨基酸残基 Leu<sup>1</sup>-Cys<sup>32</sup>)的 sTNFR-I 和 sTNFR-II 的截短形式。在一些实施方案中,截短的 sTNFRs 包括式 R<sub>1</sub>-[Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>103</sup>]-R<sub>2</sub>和 R<sub>4</sub>-[Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>115</sup>]-R<sub>5</sub>代表的蛋白质。这些蛋白质分别是 sTNFR-I 和 sTNFR-II 的截短形式。

[0185] 如这里使用的,“R<sub>1</sub>-[Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>103</sup>]-R<sub>2</sub>”代表一种或多种蛋白质,其中 [Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>103</sup>] 是 sTNFR-I 的残基 19 至 103,W098/01555 的图 1 提供了其序列;其中 R<sub>1</sub>代表 Cys<sup>19</sup>的甲二磺酰化或非甲二磺酰化胺基或者选自 Cys<sup>18</sup>至 Asp<sup>1</sup>的一个或多个氨基末端氨基酸残基;和其中 R<sub>2</sub>代表 Cys<sup>103</sup>的羧基或者选自 Phe<sup>104</sup>至 Leu<sup>110</sup>的一个或多个羧基末端氨基酸残基。

[0186] 本发明举例的截短的 sTNFR-I 包括但不限于 sTNFR-I2.6D/C105,sTNFR-I2.6D/C106,sTNFR-I2.6D/N105,sTNFR-I2.3D/d8,sTNFR-I2.3D/d18,sTNFR-I2.3D/d15,或者是甲二磺酰化或者是非甲二磺酰化的,其变体和衍生物。一些举例的截短的 sTNFR-I 描述于,例如,公开的 PCT 申请 No. W098/01555。

[0187] 如这里使用的,“R<sub>3</sub>-[Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>115</sup>]-R<sub>4</sub>”代表一种或多种蛋白质,其中 [Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>115</sup>] 是 sTNFR-II 的残基 Cys<sup>32</sup>至 Cys<sup>115</sup>,W098/01555 的图 8 提供了其序列;其中 R<sub>3</sub>代表 Cys<sup>32</sup>的甲二磺酰化或非甲二磺酰化胺基或者选自 Cys<sup>31</sup>至 L e u<sup>1</sup>的一个或多个氨基末端氨基酸残基;并且其中 R<sub>4</sub>代表 Cys<sup>115</sup>的羧基或者选自 A l a<sup>116</sup>至 A r g<sup>122</sup>的一个或多个羧基末端氨基酸残基。

[0188] 在一些实施方案中,本发明涉及包括抗 OPGL 抗体和至少一种丝氨酸蛋白酶抑制剂的治疗方案,和应用这种治疗方案的治疗方法。在一些实施方案中,治疗方案包括抗 OPGL 抗体和一种丝氨酸蛋白酶抑制剂和至少一种这里描述的另外的分子。

[0189] 内源蛋白水解酶可以降解入侵的生物体,抗原-抗体复合物,和一些不再需要或有用的组织蛋白质。感染物质可以将另外的蛋白水解酶导入生物体。蛋白酶抑制剂可以调节内源和入侵的蛋白水解酶。

[0190] 在一些实施方案中,天然存在的蛋白酶抑制剂通过局部地和暂时地限制它们的反应来控制内源蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶抑制剂可以抑制通过感染物质导入体内的蛋白酶。在一些情况下,特别容易受蛋白水解攻击和感染的组织,包括但不限于呼吸道的

那些,富含蛋白酶抑制剂。

[0191] 蛋白酶抑制剂占人血浆蛋白质的大约 10%。从这种来源分离了至少八种抑制剂,并且在文献中表征。这些包括但不限于,  $\alpha$  2- 巨球蛋白 ( $\alpha$  2M),  $\alpha$  1- 蛋白酶抑制剂 ( $\alpha$  1PI),  $\alpha$  1- 抗胰凝乳蛋白酶 ( $\alpha$  1Achy),  $\alpha$  1- 抗胶原酶 ( $\alpha$  1AC), 和内 -  $\alpha$  - 胰蛋白酶抑制剂 (I- $\alpha$ -I)。

[0192] 在一些情况下,蛋白酶 / 蛋白酶抑制剂平衡的破坏能导致在蛋白酶介导的组织破坏,包括但不限于,肺气肿,关节炎,肾小球肾炎,牙周炎,肌萎缩,肿瘤入侵,和各种其他病理状况。在一些情况下,例如象脓毒症或急性白血病这样的严重病理过程,存在的游离蛋白水解酶的量由于酶从分泌细胞释放而增加。

[0193] 此外,在一些情况下,减小生物体调节抑制剂能力也可以引起蛋白酶 / 蛋白酶抑制剂平衡的改变。这样的减小的调节抑制剂能力的非限制性例子是  $\alpha$  1- 蛋白酶抑制剂缺乏,这与肺气肿发生有关。

[0194] 在一些情况下,当这样的异常状况存在时能发生对生物体的严重破坏,除非能采取措施来控制蛋白水解酶。因此,已经探索了能对生物体施用以控制蛋白水解酶的蛋白酶抑制剂。

[0195] 白细胞弹性蛋白酶,胰蛋白酶,组织蛋白酶 G, 和胰弹性蛋白酶是已知为丝氨酸蛋白酶的一类蛋白酶的非限制性例子。

[0196] 在一些情况下,当胞外释放时,白细胞弹性蛋白酶降解结缔组织和其他有价值蛋白质。尽管正常功能的生物体降解一定量的结缔组织和其他蛋白质,过量白细胞弹性蛋白酶的存在可能与各种病理状态有关,包括但不限于肺气肿和类风湿性关节炎。在一些实施方案中,为了阻碍白细胞弹性蛋白酶的作用,当它以大于正常量存在时,就寻求对白细胞弹性蛋白酶特异性的蛋白酶抑制剂。如果能以药学有用的纯的形式和足够量分离或制备,则这样一种蛋白酶抑制剂是有用的。

[0197] 一些白细胞弹性蛋白酶抑制剂描述于,例如, Schiessler 等,“人粘液分泌中巨细胞中性蛋白酶的酸 - 稳定抑制剂”, *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leucocytes*, Havemann 等 (编著), Urban and Schwarzenberg, Inc. (1978), 和 Travis 和 Salvesen, *Ann. Rev. Biochem.* 52 :655-709 (1983)。

[0198] 在一些情况下,在各种各样的急性状况,包括但不限于胰腺炎期间,胰蛋白酶引起一些软的器官组织的降解,例如胰组织。如果能以药学有用的纯的形式和足够量分离或制备,则胰蛋白酶抑制剂是有用的。

[0199] 组织蛋白酶 G 是白细胞中存在的另一种蛋白酶。在一些实施方案中,组织蛋白酶 G 能体外降解各种蛋白质,包括补体途径的那些。胰弹性蛋白是在胰腺炎中有作用的另一种蛋白酶。因此,这些蛋白酶的抑制剂也可能是有药用价值的。

[0200] 在一些实施方案中,相信对丝氨酸蛋白酶不同抑制剂的底物特异性和敏感性只是几种氨基酸残基改变的结果。类似地,有可能构思一类丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中相对少的氨基酸的改变会导致不同蛋白酶的抑制作用。在一些实施方案中,这类抑制剂的成员抑制每一种丝氨酸蛋白酶。

[0201] 举例的丝氨酸蛋白酶抑制剂是分泌性白细胞蛋白酶抑制剂 (SLPI) 及其片段和类似物。举例的丝氨酸蛋白酶抑制剂还包括但不限于,抗 - 白细胞蛋白酶 (ALP), 粘液蛋白酶

抑制剂 (MPI), 人精液血浆抑制剂-1 (HUSI-1), 支气管粘液抑制剂 (BMI), 和子宫颈粘液抑制剂 (CUSI)。在一些实施方案中, 丝氨酸蛋白酶抑制剂也可以是 LPS 调节剂。参见, 例如, Jin 等 (1997), Cell88(3):417-26。在一些实施方案中, 这些分子适合在导致骨损失的状况中使用, 因为它们优先涉及软骨。

[0202] 举例的丝氨酸蛋白酶抑制剂描述于, 例如, 美国专利 No. 4760130; 美国专利 No. 5900400; 和美国专利 No. 5633227; 这些专利文献在此为了任何目的引作参考。上述文献中公开的分子以及其所有的变体或类似物统称为“丝氨酸蛋白酶抑制剂”。

[0203] IL-18 是促炎细胞因子, 发现它诱导干扰素- $\gamma$ , 并且以前称作干扰素  $\gamma$  诱导因子 (IGIF)。在一些情况下, 已经证明 IL-1 上调 IL-18 产生, 并且 IL-18 诱导大量促炎细胞因子的产生, 包括 IL-6 和 MMP-1。参见, 例如, Dinarello 等 (1998), J. Leukocyte Biol. 63: 658-64。在一些情况下, caspase 1 对于 IL-18 产生也是重要的。实验还提示 TNF- $\alpha$  调节 IL-18 产生, 并且同时抑制 TNF- $\alpha$  和 IL-18 保护肝脏不中毒。参见, 例如, Faggioni 等 (2000), PNAS97:2367-72。

[0204] IL-18 通过回忆 IL-1 系统的受体系统而体内起作用。IL-18 与细胞表面受体 (IL-18R) 相互作用, 该受体与辅助蛋白 (IL-18RAcP) 相互作用。形成 IL-18, IL-18R 和 IL-18RAcP 复合体时进行 IL-18- 介导的信号传递。IL-18 的天然抑制剂是 IL-18bp。在一些实施方案中, 通过结合 IL-18 分子并且防止与 IL-18R 相互作用, IL-18bp 作为“引诱受体”起作用。

[0205] 在一些实施方案中, 本发明涉及包括抗 OPGL 抗体和至少一种 IL-18 抑制剂的治疗方案, 和应用这样的治疗方案的治疗方法。在一些实施方案中, 治疗方案包括抗 OPGL 抗体和 IL-18 抑制剂和至少一种这里描述的另外的分子。根据一些实施方案可以治疗的例示的状况包括但不限于炎症, 自身免疫疾病, IL-1 介导的疾病, 和 TNF- 介导的疾病。根据一些实施方案可以用抗 OPGL 抗体和至少一种 IL-18 抑制剂治疗的例示的状况包括但不限于关节炎, 包括但不限于类风湿性关节炎; 系统性红斑狼疮 (SLE); 移植物抗宿主疾病 (GvHD); 肝炎, 败血症; 和伴随这些疾病的骨和软骨损失。

[0206] 举例的 IL-18 抑制剂包括但不限于与 IL-18 结合的抗体; 与 IL-18R 结合的抗体; 与 IL-18RAcP; IL-18bp; IL-18R 片段 (例如 IL-18 受体的可溶胞外结构域) 结合的抗体; 与 IL-18 结合并且减小或阻止其与 IL-18R 相互作用的肽; 与 IL-18R 结合并且减小或阻止其与 IL-18 或与 IL-18RAcP 相互作用的肽; 与 IL-18RAcP 结合并且减小或阻止其与 IL-18R 相互作用的肽; 减小或阻止 IL-18 产生或者 IL-18, IL-18R 和 IL-18RAcP 之间相互作用的小分子。

[0207] 一些 IL-18 抑制剂描述于, 例如, 1994 年 7 月 14 日授权的美国专利 No. 5912324; 1999 年 12 月 8 日公开的 EP0962531; 1994 年 11 月 15 日公开的 EP712931; 1994 年 7 月 14 日授权的美国专利 No. 5914253; 1997 年 7 月 10 日公开的 W097/24441; 2000 年 5 月 9 日授权的美国专利 No. 6060283; 1996 年 12 月 26 日公开的 EP850952; 1998 年 9 月 16 日公开的 EP864585; 1998 年 9 月 24 日公开的 W098/41232; 2000 年 4 月 25 日授权的美国专利 No. 6054487; 1997 年 8 月 14 日公开的 W099/09063; 1997 年 11 月 3 日公开的 W099/22760; 1998 年 1 月 23 日公开的 W099/37772; 1998 年 3 月 20 日公开的 W099/37773; 2000 年 1 月 26 日公开的 EP0974600; 2000 年 3 月 9 日公开的 W000/12555; 1997 年 10 月 31 日公开的日

本专利申请 JP111399/94 ;1998 年 2 月 8 日公开的以色列专利申请 IL121554A0 ;这些专利文献在此为了任何目的引作参考。

[0208] 在一些实施方案中,抗 OPGL 抗体可以与至少一种用于炎症的治疗剂一起施用。在一些实施方案中,抗 OPGL 抗体可以与至少一种用于免疫疾病的治疗剂一起施用。用于炎症和免疫疾病的举例的治疗剂包括但不限于皮质类固醇,包括但不限于,泼尼松龙 ;非甾族抗炎药物 (NSAIDs),包括但不限于,环加氧酶 1 型 (COX-1) 和环加氧酶 2 型 (COX-2) 抑制剂 ;疾病修饰抗风湿药物 (DMARDs),包括但不限于,甲氨蝶呤,羟基氯奎,氯奎,环孢菌素,金化合物 (例如醋硫葡金,金硫丁二酸盐,和葡糖硫金),来氟米特 ;IV 型磷酸二酯酶抑制剂,包括但不限于,环戊苯吡酮和己酮可可碱 ;他克莫司 (FK-506) ;西罗莫司 (瑞帕霉素) ;霉酚酸 ;5- 脂肪氧化酶抑制剂,包括但不限于,弃白通 ;白介素 -6 (IL-6) 调节剂 ;38kDa 促细胞分裂剂激活蛋白激酶的小分子调节剂 (p38-MAPK) ;炎症途径中涉及的胞内分子的小分子调节剂,其中这样的胞内分子包括但不限于,jnk, IKK, NF-Kb, ZAP70, 和 lck。用于炎症的一些举例的治疗剂描述于,例如, C. A. Dinarello 和 L. L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheuma toid Arthritis ;A Primer for Clinicians第三版 (2001)Amgen Inc. Thousand Oaks, CA。用于炎症和自身免疫疾病的举例的治疗剂,包括但不限于,干扰素 - $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 调节剂 ;OX40/OX40L 的调节剂 (包括可溶形式的 OX40) ;4-1BB/4-1BB 配体的调节剂 (包括可溶形式的 4-1BB) ;和 B 细胞 -T 细胞共同刺激途径的调节剂,包括但不限于,受体配体对 CD28/B7, CD40/CD40L, ICOS/B7RP1, 和 AGP-3/TACI/BAFFR (AGP-3 结合 TACI 和 BAFFR 受体两者) 的调节剂。一些举例的 B 细胞 -T 细胞共同刺激途径的调节剂,包括但不限于, CD28, B7. 1 和 B7. 2 (包括可溶形式的 B7. 1 或 B7. 2 和可溶形式的 CTLA4, 这两者可以融合成异源肽或蛋白质,它减少或防止降解和 / 或延长半衰期,降低毒性,降低免疫原性,或通过提高溶解度或循环半衰期提高治疗性蛋白质的生物活性) ;CD40 和 CD40L 的抑制剂 (包括可以与异源肽或蛋白质融合的可溶形式的 CD40) ;ICOS 和 B7RP1 的抑制剂 (包括可以与异源肽或蛋白质融合的可溶形式的 ICOS) 和 AGP-3, TACI 和 BAFFR 的抑制剂 (包括可溶形式的 TACI 和 BAFFR)。ICOS, B7RP1 及其抑制剂描述于,例如, W000/46240。AGP-3, TACI 和 BAFFR 及其抑制剂描述于,例如, W000/47740, W001/85872, W002/15273, W098/39361, 和 Bulow 和 Bram (1997) Science 278 :138-140。

[0209] 在一些实施方案中,抗 OPGL 抗体被用来治疗骨损失,包括但不限于,恶性或转移肿瘤引起的骨的溶骨性破坏产生的骨损失。在一些实施方案中,抗 OPGL 抗体可以被用来治疗与癌症相关的骨损失。举例的癌症包括但不限于乳房癌,前列腺癌,甲状腺癌,肾癌,肺癌,食道癌,直肠癌,膀胱癌,子宫颈癌,卵巢癌和肝癌,以及胃肠道癌。在一些实施方案中,抗 OPGL 抗体可以被用来治疗与例如一些血液恶病变相关的骨损失,包括但不限于,多发性骨髓瘤和淋巴瘤,包括何杰金氏病。

[0210] 在一些实施方案中,单独施用抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中,抗 OPGL 抗体与至少一种其他治疗剂一起施用,包括但不限于,至少一种其他癌症治疗剂。举例的癌症治疗剂包括但不限于放疗和化疗。在一些实施方案中,化疗可以包括用一种或几种下面的药物治疗 :葱环霉素,紫杉醇,他莫西芬,阿霉素,5- 氟尿嘧啶,和本领域公知的其他药物。在一些实施方案中,癌症治疗剂是黄体激素释放激素 (LHRH) 拮抗剂。在一些实施方案中,LHRH 拮抗剂是肽拮抗剂。

[0211] 在一些实施方案中, LHRH 拮抗剂包括肽: Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO: 20), 其中 Nal 是 3-(2-萘基)丙氨酰基; 4-Cl-Phe 是 (4'-氯苯基)丙氨酰基; Pal 是 3-(3'-吡啶基)丙氨酰基; 和 Lys(iPr) 是 N-ε-2-丙基-赖氨酰基。

[0212] 在一些实施方案中, LHRH 拮抗剂是 LHRH 拮抗剂十肽。一些举例的十肽描述于, 例如, 美国专利 No. 5843901, 这里为了任何目的引作参考。

[0213] 根据一些实施方案举例的治疗抗体包括但不限于小鼠, 小鼠-人嵌合, CDR-嫁接, 人源化和完全的人抗体, 和合成抗体, 包括但不限于, 通过筛选抗体库选择的那些。举例的抗体包括但不限于, 与肿瘤细胞上存在的细胞表面蛋白质 Her2, CDC20, CDC33, 粘蛋白样糖蛋白, 和表皮生长因子受体 (EGFR) 结合, 并且任选地诱导对展示这些蛋白质的肿瘤细胞的细胞抑制和 / 或细胞毒性作用。举例的抗体还包括 HERCEPTIN™ (司徒曼布), 其可以被用来治疗乳房癌和其他形式的癌, 和 RITUXAN™ (利妥希玛), ZEVALIN™ (ibritumomab tiuxetan), 和 LYMPHOCIDE™ (epratuzumab), 其可以被用来治疗非何杰金氏淋巴瘤和其他形式的癌症。一些举例的抗体还包括 ERBITUX™ (IMC-C225), BEXXAR™ (I<sup>131</sup>tositumomab), 和 Campath。

[0214] 在一些实施方案中, 癌症治疗剂是选择性诱导肿瘤细胞编程性细胞死亡的多肽, 包括但不限于, TNF-相关多肽 TRAIL。在一些实施方案中, 在至少一种癌症治疗剂治疗之前, 同时和可以顺序施用抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中, 可以预防性施用抗 OPGL 抗体, 以便防止或减轻转移癌引起的骨损失。在一些实施方案中, 可以施用抗 OPGL 抗体治疗由于转移而存在的骨损失状况。

[0215] 在一些实施方案中, 抗 OPGL 抗体可以被用来防止和 / 或治疗与多发性骨髓瘤相关的骨损失和 / 或防止和 / 或治疗疾病本身。多发性骨髓瘤是 B 细胞产生的肿瘤, 它可以导致显著发病率和 / 或死亡率。在一些实施方案中, 多发性骨髓瘤的临床表现为局灶性骨损失, 它可能是由于局部区域提高的破骨细胞激活作用。通过放射性分析, 很多骨髓瘤患者存在骨病变并且有骨骼疼痛。在一些情况下, 骨髓瘤患者易病理性骨折, 可能是自发发生的或由于损伤。在一些情况下, 骨髓瘤期间发生的骨骼病变不只是导致骨折, 而且还畸形, 偶尔神经压迫, 特别是在棘突中。在一些患者中, 发生血清钙病理性增加 (高血钙), 在疾病治疗中引起显著问题。在一些实施方案中, 可以对患者施用抗 OPGL 抗体来减少或阻断骨再吸收和钙释放, 这可以降低骨折和脊柱畸形的危险。

[0216] 在一些情况下, 骨髓瘤细胞不直接参与骨破坏, 取而代之的是产生胞外信号, 它导致破骨细胞分化和激活。在一些情况下, 破骨细胞产生高水平的细胞因子 IL-6, 特别是当它们变得被活化时。IL-6 是 B 细胞生长因子, 并且是鼠和人骨髓瘤细胞体外生长的原因。骨髓瘤细胞还直接或间接产生 OPGL, 它可以导致骨髓腔中包埋的骨髓瘤细胞周围局部骨溶解。在一些情况下, 紧邻骨髓瘤细胞的正常破骨细胞接着产生 IL-6, 其可以导致肿瘤细胞的局部扩充。骨髓瘤细胞以克隆方式扩充并且占据骨腔, 所述骨腔是由于不适当的骨再吸收产生的。

[0217] 已经观察到, 对啮齿动物施用 OPG 诱导破骨细胞群的快速死亡 (参见, 例如 Lacey 等 (2000) Am. J. Pathol. 157:435-448)。破骨细胞数目的减少阻碍那些细胞对增加的 IL-6 产生的作用, 并且因此影响骨小梁中骨髓瘤细胞的生长和存活。因此, 在一些实施方案中,

对骨髓瘤患者施用抗 OPGL 抗体不只是阻断骨的高度再吸收,而且还影响肿瘤本身的扩大和存活。

[0218] B-细胞表达 OPGL 的受体,ODAR。骨髓瘤细胞也表达 ODAR,另外可以产生 OPGL。在一些情况下,OPGL 和 ODAR 两者在相同的细胞种群中表达可以产生影响骨髓瘤细胞存活的自分泌刺激。因此,在一些实施方案中,施用抗 OPGL 抗体可以降低肿瘤细胞存活率,从而减小或消除骨髓瘤患者的肿瘤负担。

[0219] 在一些实施方案中,本发明提供含有治疗有效量的抗 OPGL 抗体和药学可接受稀释剂,载体,增溶剂,乳化剂,防腐剂和 / 或佐剂的药物组合物。

[0220] 在一些实施方案中,本发明提供含有治疗有效量的抗 OPGL 抗体和治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,和药学可接受稀释剂,载体,增溶剂,乳化剂,防腐剂和 / 或佐剂的药物组合物。在一些实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂选自:骨形态发生因子,转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ),白介素-1 (IL-1) 抑制剂,包括但不限于 IL-1ra 及其衍生物和 Kineret<sup>TM</sup>, anakinra; TNF  $\alpha$  抑制剂,包括但不限于可溶性 TNF  $\alpha$  受体, Enbrel<sup>TM</sup>, etanercept, 抗-TNF  $\alpha$  抗体, Remicade<sup>TM</sup>, 英夫单抗, 和 D2E7 抗体; 甲状旁腺素及其类似物; 甲状旁腺素相关蛋白及其类似物; E 系列前列腺素; 双磷酸盐 (例如阿仑特罗和其他); 骨增强矿物例如氟化物和钙; 非甾族抗炎药物 (NSAIDs), 包括但不限于 COX-2 抑制剂, 例如 Celebrex<sup>TM</sup>, 塞来西布和 Vioxx<sup>TM</sup>, 罗非克西; 免疫抑制剂, 例如甲氨蝶呤或来氟米特, 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 包括但不限于分泌性白细胞蛋白酶抑制剂 (SLPI); IL-6 抑制剂 (包括但不限于抗 IL-6 抗体), IL-8 抑制剂 (包括但不限于抗 IL-8 抗体), IL-18 抑制剂 (包括但不限于 IL-18 结合蛋白和抗 IL-18 抗体), 白介素-1 转化酶 (ICE) 调节剂; 成纤维细胞生长因子 FGF-1 至 FGF-10 和 FGF 调节剂; PAF 拮抗剂; 角质形成细胞生长因子 (KGF), KGF- 相关分子, 和 KGF 调节剂; 基质金属蛋白酶 (MMP) 调节剂; 一氧化氮合酶 (NOS) 调节剂, 包括但不限于, 诱导型 NOS 的调节剂; 糖皮质激素受体调节剂; 谷氨酸受体调节剂; 脂多糖 (LPS) 水平调节剂; 和去甲肾上腺素和调节剂及其模拟物。

[0221] 在一些实施方案中,可接受的配方材料优选是使用的剂量和浓度对接受者没有毒性。

[0222] 在一些实施方案中,所述药物组合物可以含有用于改变,保持或保留例如 pH, 渗透压, 粘度, 澄清度, 颜色, 等张性, 气味, 无菌, 稳定性, 溶解或释放速度, 组合物的吸收或渗透的配方材料。在一些实施方案中,合适的配方材料包括但不限于,氨基酸 (例如甘氨酸, 谷氨酰胺, 天冬酰胺, 精氨酸或赖氨酸); 抗微生物剂; 抗氧化剂 (例如抗坏血酸, 亚硫酸钠或亚硫酸氢钠); 缓冲液 (例如硼酸盐, 碳酸氢盐, Tris-HCl, 柠檬酸盐, 磷酸盐或其他有机酸); 填充剂 (例如甘露糖醇或甘氨酸); 螯合剂 (例如乙二胺四乙酸 (EDTA)); 络合剂 (例如咖啡因, 聚乙烯吡咯烷酮,  $\beta$ -环糊精或羟丙基- $\beta$ -环糊精); 填料; 单糖; 二糖; 和其他碳水化合物 (例如葡萄糖, 甘露糖或糊精); 蛋白质 (例如血清白蛋白, 明胶或免疫球蛋白); 着色剂, 矫味剂和稀释剂; 乳化剂; 亲水性聚合物 (例如聚乙烯吡咯烷酮); 低分子量多肽; 成盐抗衡离子 (例如钠); 防腐剂 (例如苯扎氯铵, 苯甲酸, 水杨酸, 硫汞撒, 苯乙醇, 羟苯甲酸甲酯, 羟苯甲酸丙酯, 氯己定, 山梨酸或过氧化氢); 溶剂 (例如甘油, 丙二醇或聚乙二醇); 糖醇 (例如甘露糖醇或山梨糖醇); 悬浮剂; 表面活性剂或湿润剂 (例如普流罗尼类, PEG, 脱水山梨糖醇酯, polysorbates, 如 polysorbate20, polysorbate80, triton,

tromethamine, 卵磷脂, 胆甾醇, 四丁酚醛), 稳定增强剂 (例如蔗糖或山梨糖醇); 张力增强剂 (例如碱金属卤化物, 优选氯化钠或氯化钾, 甘露糖醇, 山梨糖醇); 送递赋形剂; 稀释剂; 赋形剂和 / 或药物佐剂 (Remington's Pharmaceutical Science, 18 版, A. R. Gennaro 编著, Mack Publish Company (1990))。

[0223] 在一些实施方案中, 抗 OPGL 抗体和 / 或治疗分子与本领域公知的半衰期延长赋形剂连接。这样的赋形剂包括但不限于 Fc 结构域, 聚乙二醇和葡聚糖。这样的赋形剂描述于, 例如, 美国申请登记号 No. 09/428082 和公开的 PCT 申请 No. W099/25044, 这里为了任何目的的引作参考。

[0224] 在一些实施方案中, 本领域技术人员根据, 例如, 想要的给药途径, 送递方式和期望的剂量, 来确定优化的药物组合物。例如, 参见, Remington's Pharmaceutical Science, 上文。在一些实施方案中, 这样的组合物可以影响本发明的抗体的物理状态, 稳定性, 体内释放速度和体内清除速度。

[0225] 在一些实施方案中, 药物组合物中的主要赋形剂或载体性质上可以是含水或不含水的。例如, 在一些实施方案中, 合适的赋形剂或载体可以是注射用水, 生理盐水或人工脑脊液, 可能补充有肠胃外施用组合物中常用的其他材料。在一些实施方案中, 中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是其他举例的赋形剂。在一些实施方案中, 药物组合物含有大约 pH7.0-8.5 的 Tris 缓冲液, 或大约 pH4.0-5.5 的乙酸盐缓冲液, 其可以进一步含有山梨糖醇或其合适的取代物。在一些实施方案中, 含有抗 OPGL 抗体, 有或没有至少一种另外的治疗剂的组合物, 可以通过将具有期望程度纯度的选择的组合物与任选的配方试剂混合来制备用于贮存 (Remington's Pharmaceutical Science, 上文), 其是冻干饼或水溶液形式。此外, 在一些实施方案中, 使用合适的赋形剂例如蔗糖, 可以将含有抗 OPGL 抗体, 有或没有至少一种另外的治疗剂的组合物配制成冻干物。

[0226] 在一些实施方案中, 可以选择本发明的药物组合物用于肠胃外给药。在一些实施方案中, 可以选择药物组合物用于吸入或者通过消化道例如口服送递。这样的药学可接受组合物的制备是本领域公知的。

[0227] 在一些实施方案中, 配方成分以给药点可接受的浓度存在。在一些实施方案中, 使用缓冲液将组合物保持在生理 pH 或稍微较低的 pH, 一般在大约 5 至大约 8 的 pH 范围。

[0228] 在一些实施方案中, 当涉及肠胃外给药时, 治疗组合物可以是药学可接受赋形剂中无热原的, 肠胃外可接受的, 含有期望的抗 OPGL 抗体, 有或没有另外的治疗剂的水溶液形式。在一些实施方案中, 用于肠胃外注射的赋形剂是无菌蒸馏水, 其中将有或没有至少一种另外的治疗剂的抗 OPGL 抗体配制成无菌等张溶液, 适当保存。在一些实施方案中, 制备涉及配制期望的分子和试剂, 例如可注射微球, 可生物降解的颗粒, 聚合化合物 (例如聚乳酸或聚乙醇酸), 珠或脂质体, 它可以提供产品的可控或持续释放, 然后通过延效型注射送递。在一些实施方案中, 也可以使用透明质酸, 有在循环中促进保持的作用。在一些实施方案中, 可以使用可植入的药物送递装置引入期望的分子。

[0229] 在一些实施方案中, 药物组合物可以配制成用于吸入的制剂。在一些实施方案中, 可以将有或没有至少一种另外的治疗剂的抗 OPGL 抗体配制成用于吸入的干燥粉末。在一些实施方案中, 也可以用用于气溶胶送递的推进剂配制含有有或没有至少一种另外的治疗剂的抗 OPGL 抗体的吸入用溶液。在一些实施方案中, 溶液可以喷雾。肺部给药进一步描述

于 PCT 申请 No. PCT/US94/001875, 它描述了化学修饰蛋白质的肺部递送。

[0230] 在一些实施方案中, 涉及可以口服给药的制剂。在一些实施方案中, 可以用固体剂型例如片剂和胶囊的复合中常规使用的那些载体或者不用那些载体, 可以配制以这种方式给药的有或没有至少一种另外的治疗剂的抗 OPGL 抗体。在一些实施方案中, 可以设计当生物利用率最大并且预先全身性降解最小的消化道中的点释放制剂的活性部分的胶囊。在一些实施方案中, 可以含有至少一种另外的试剂以有利于抗 OPGL 抗体和 / 或任何另外的治疗剂的吸收。在一些实施方案中, 还可以使用稀释剂, 矫味剂, 低熔点蜡, 植物油, 润滑剂, 悬浮剂, 片剂崩解剂和粘合剂。

[0231] 在一些实施方案中, 药物组合物在适合片剂制备的无毒性赋形剂混合物中可以含有有效量的抗 OPGL 抗体, 有或没有至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中, 通过将片剂溶解于无菌水中, 或其他合适的赋形剂中, 可以制备单剂型的溶液。在一些实施方案中, 合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂, 例如碳酸钙, 碳酸钠或碳酸氢钠, 乳糖, 或磷酸钙; 或粘合剂, 例如淀粉, 明胶, 或阿拉伯胶; 或润滑剂, 例如硬脂酸镁, 硬脂酸或滑石。

[0232] 另外的药物组合物对于本领域技术人员是明显的, 包括涉及持续或控制释放送递配方中含有抗 OPGL 抗体, 有或没有至少一种另外的治疗剂的制剂。在一些实施方案中, 各种各样的其他持续或控制释放送递方式的配制技术, 例如脂质体载体, 可生物降解微颗粒或多孔珠和延效型注射剂, 是本领域技术人员公知的。参见, 例如, PCT 申请 No. PCT/US93/00829, 它描述了用于送递药物组合物的多孔聚合物微颗粒的控制释放。在一些实施方案中, 持续释放制剂可以含有有形产物形式的半渗透性聚合物基质, 例如膜, 或微胶囊。持续释放的基质可以包括聚酯, 水凝胶, 聚交酯 (US3773919 和 EP058481), L- 谷氨酸和  $\gamma$ - 乙基-L- 谷氨酸的共聚物 (Sidman 等, Biopolymers, 22 :547-556 (1983)), 聚 (2- 羟乙基 - 甲基丙烯酸酯) (Langer 等, J. Biomed. Mater. Res. 15 :167-277 (1981) 和 Langer, Chem. Tech. , 12 :98-105 (1982)), 乙酸亚乙基乙烯酯 (Langer 等, 上文) 或聚-D(-)-3- 羟基丁酸 (EP133988)。在一些实施方案中, 持续释放的组合物还可以包括脂质体, 它可以通过本领域公知的几种方法制备。参见, 例如 Eppstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 3688-3692 (1985) ;EP036676 ;EP088046 和 EP143949。

[0233] 一般体内施用的药物组合物是无菌的。在一些实施方案中, 可以通过经无菌过滤膜过滤来实现。在一些实施方案中, 在组合物被冻干的情况下, 可以在冻干和重新配置之前或之后利用该方法灭菌。在一些实施方案中, 肠胃外给药的组合物可以以冻干形式或溶液贮存。在一些实施方案中, 一般将肠胃外组合物放到有灭菌出口的容器中, 例如有皮下注射针头可穿孔的盖的静脉内溶液袋或小瓶。

[0234] 在一些实施方案中, 一旦配制了药物组合物, 它可以作为溶液, 混悬液, 凝胶, 乳状液, 固体保存在无菌小瓶中, 或者作为脱水或冻干的粉末剂保存在无菌小瓶中。在一些实施方案中, 这样的制剂可以以即用形式或者以给药之前重新配制的形式 (例如冻干的) 贮存。

[0235] 在一些实施方案中, 本发明涉及制备单剂量给药单位的试剂盒。在一些实施方案中, 每个试剂盒可以包括盛有干燥蛋白质的第一容器和盛有含水配方的第二容器。在本发明的一些实施方案中, 包括包含单腔或多腔预填充注射器 (例如液体注射器和溶解注射器) 的试剂盒。

[0236] 在一些实施方案中, 治疗上要使用的含有有或没有至少一种另外的治疗剂的抗



OPGL 抗体的药物组合物的有效量取决于,例如,治疗内容和主体。本领域技术人员明白根据一些实施方案,治疗的适当剂量水平因此部分地根据送递的分子,使用有或没有至少一种另外的治疗剂的抗 OPGL 抗体的适应症,给药途径,和患者尺寸(体重,体表面积或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而不同。在一些实施方案中,医师可以调整剂量和改变给药途径,以获得最佳治疗效果。在一些实施方案中,根据上面提到的因素,一般剂量范围可以是大约 0.1 微克/千克至最多大约 100 毫克/千克或更多。在一些实施方案中,剂量可以是 0.1 微克/千克至最多大约 100 毫克/千克;或者 1 微克/千克至最多大约 100 毫克/千克;或者 5 微克/千克至最多大约 100 毫克/千克。

[0237] 在一些实施方案中,给药频率要考虑使用的制剂中抗 OPGL 抗体和/或任何另外的治疗剂的药物动力学参数。在一些实施方案中,医师施用组合物,直到达到实现期望的效果的剂量。在一些实施方案中,因此可以以单一剂量,或随时间作为两个或多个剂量给药(其可以含有或不含有相同量的期望的分子),或者作为通过植入装置或导管连续输注来施用组合物。本领域技术人员按常规确定精确的合适的剂量,并且这是平常他们完成的常规任务。在一些实施方案中,通过应用合适的剂量反应数据可以确定合适的剂量。

[0238] 在一些实施方案中,药物组合物的给药途径是公知的方法,例如,口服,静脉内注射,腹膜内,脑内(实质内),脑室内,肌内,眼内,动脉内,肝门内,或病变内途径;通过持续释放系统或者通过植入装置。在一些实施方案中,可以通过浓注或连续输液或者通过植入装置施用组合物。

[0239] 在一些实施方案中,通过植入其上吸附期望的分子或者将期望的分子制成胶囊的膜,海绵状物或者其他合适的材料可以局部施用组合物。在一些实施方案中,施用植入装置的情况下,可以将装置植入任何合适的组织或器官,期望的分子的送递可以通过扩散,随时间释放药团,或连续给药。

[0240] 在一些实施方案中,期望以离体的方式使用含有抗 OPGL 抗体,有或没有至少一种另外的治疗剂的药物组合物。在这样的情况下,取自患者的细胞,组织和/或器官接触含有抗 OPGL 抗体,有或没有至少一种另外的治疗剂的药物组合物,然后接着将这些细胞,组织和/或器官植回患者。

[0241] 在一些实施方案中,通过使用这里描述的方法植入经基因工程处理的细胞来表达和分泌多肽,能送递抗 OPGL 抗体和/或任何另外的治疗剂。在一些实施方案中,这样的细胞可以是动物细胞或人细胞,并且可以是自体的,异源的,或异种的。在一些实施方案中,细胞可以无限繁殖。在一些实施方案中,为了减少免疫应答机会,可以将细胞制成胶囊以避免周围组织浸润。在一些实施方案中,胶囊材料一般是生物相容的半渗透性聚合物外壳或膜,它使得蛋白质产物释放,但是阻止患者免疫系统或者来自周围组织的其它有害因子破坏细胞。

[0242] 实施例

[0243] 提供下面的实施例,包括实施的实验和获得的结果,只是详细说明的目的,而不是要限制本发明。

[0244] 实施例 1

[0245]  $\alpha$  OPGL-1 重链和轻链的克隆

[0246] 使用表达全长人 OPGL cDNA 的 CHO 细胞免疫包含人免疫球蛋白基因的转基因小

鼠。来自免疫小鼠的淋巴结与鼠骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤。在 ELISA 分析中对杂交瘤细胞系上清液测定与人 OPGL 反应的抗体。发现抗 -OPGL 表达杂交瘤细胞系 AMG6.5, AMG6.4, 和 AMG6.1 表达对 OPGL 有高亲和性的抗体 (Kd 分别是 0.28nM, 0.29nM, 和 0.23nM), 选择 AMG6.5 进行克隆。来自 AMG6.5 和 AMG6.4 的重链和轻链 cDNA 克隆是相同的, 使用 AMG6.5 克隆  $\alpha$  OPGL-1 轻链 cDNA, 同时使用 AMG6.4 克隆  $\alpha$  OPGL-1 重链 cDNA。

[0247]  $\alpha$  OPGL-1 轻链的克隆

[0248] 利用 PCR 扩增方法, 从由 AMG6.5 总 RNA 制备的第一 cDNA 链获得  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  轻链可变区。使用带有延伸的 5' - 接头 (5' -GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT-3' (SEQ ID NO:15)) 的随机引物, 和 Gibco SuperScript II™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (cat. no. 18089-011) 提供的材料和方法, 从 AMG6.5 总 RNA 制备第一 cDNA 链。下面的寡核苷酸用于 PCR:

[0249] 5'  $\kappa$  RACE 引物:

[0250] 5' -GAT GAC CCA GTC TCC AGC CAC CCT G-3' (SEQ ID NO:5)

[0251] 3'  $\kappa$  RACE 引物:

[0252] 5' -AAG GGT CAG AGG CCA AAG GAT GG-3' (SEQ ID NO:6)

[0253] 将扩增的 DNAs 克隆到 pCRII-TOPO (Invitrogen) 中并且对得到的质粒测序。使用  $\kappa$  链共有序列设计全长  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  链 PCR 扩增用的引物。5'  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  引物在起始 Met 密码子之前插入用于克隆的 XbaI 位点 (TCTAGA) 和 "CCACC" Kozak 序列。3'  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  引物在终止密码子后面插入 Sa/I 位点用于克隆。

[0254] 5'  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  引物:

[0255] 5' -CAA CTC TAG A CC ACC ATG GAA ACC CCA GCG-3' (SEQ ID NO:7)

[0256] XbaI 位点 Kozak M E T P A (SEQ ID NO:16)

[0257] 3'  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  引物:

[0258] 5' -TTT GAC GTC GAC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAAG-3' (SEQ ID NO:8)

[0259] SalI 位点 \* \* C E G R N F (SEQ ID NO:17)

[0260] 使用如上所述的 AMG6.5 第一 cDNA 链, 通过使用 5' 或 3'  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  引物的 PCR 扩增, 获得全长  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  链 cDNA 克隆。PCR 反应产生编码  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  链的 235 个氨基酸残基 (包括 20 氨基酸  $\kappa$  链信号序列) 的 738bp 片段 (图 4, SEQ ID NO:4)。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen cat. no. 28104) 纯化之后, 使用该片段构建  $\kappa$  轻链表达载体。

[0261] 用 XbaI 和 SalI 酶切上面产生的 738bp 全长  $\kappa$  片段, 使用 Promega Wizard DNA Clean-Up 系统 (Promega cat. no. A7100) 纯化, 并且克隆到 pDSR  $\alpha$  19 中产生质粒  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSR  $\alpha$  19 (图 5)。先前有人描述过 pDSR  $\alpha$  19 (参见 W090/14363, 这里为了任何目的引作参考 (参见, 例如, 图 12))。简要地说, 为了制备 pDSR  $\alpha$  19, 用下面的方法修饰 pDSR  $\alpha$  2: 将 FSH polyA 从大约 1400 个碱基对缩短到 885 个碱基对, 现在末端在 NdeI 位点; 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 启动子现在含有 209 个碱基对, 从 5' 端缩短粒大约 1kb; 从 DHFR polyA 序列缺失大约 550 个碱基对的 BglIII 片段。

[0262] 对  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  轻链表达克隆测序, 确认它编码 AMG6.5 杂交瘤中鉴定的相同的肽。最终的表达载体  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSR  $\alpha$  19 为 5476bp 并且包含表 2 所示的 7 个功能区。

[0263] 表 2:  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSR  $\alpha$  19 的特征

- [0264] 质粒碱基对数
- [0265] 2-881
- [0266] 来自牛垂体糖蛋白激素的  $\alpha$ -亚基 ( $\alpha$ -FSH) 的转录终止 / 多腺苷酸化信号 (Goodwin 等, *Nucleic Acids Res.* 198311 :6873-82 ;Genbank 登记号 X00004)
- [0267] 882-2027
- [0268] 包含内源小鼠 DHFR 启动子, cDNA 编码序列, 和 DHFR 转录终止 / 多腺苷酸化信号的小鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR) 小基因 (Gasser 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 198279 :6522-6 ; Nunberg 等, *Cell* 198019 :355-64 ;Setzer 等, *J Biol Chem.* 1982257 :5143-7 ;McGrogan 等, *J Biol Chem.* 1985260 :2307-14)
- [0269] 2031-3947
- [0270] 包含氨苄西林抗性标记基因和质粒在大肠杆菌中复制的起点的 pBR322 序列 (Genbank 登记号 J01749)
- [0271] 3949-4292
- [0272] SV40 早期启动子, 增强子和复制起点 (Takebe 等, *Mol Cell Biol* 19888 :466-72, Genbank 登记号 J02400)
- [0273] 4299-4565
- [0274] 来自 HTLV-1LTR 结构域的翻译增强子元件 (Seiki 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 198380 :3618-22, Genbank 登记号 J02029)
- [0275] 4574-4730
- [0276] 来自 SV4016S 的内含子, 19S 剪接供体 / 受体信号 (Okayama 和 Berg, *Mol Cell Biol* 19833 :280-9, Genbank 登记号 J02400)
- [0277] 4750-5476
- [0278] XbaI 和 SaI 位点之间的  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  轻链 cDNA。
- [0279] 图 5 所示载体的环形质粒图。
- [0280]  $\alpha$  OPGL-1 重链的克隆
- [0281] 从用 Clontech Marathon™ cDNA 扩增试剂盒 (cat no. K1802-1) 制备的 AMG6.4 杂交瘤双链 cDNA 克隆  $\alpha$  OPGL-1 IgG2 重链。通过使用人种系 I g G2 重链恒定区特异性引物 (下文所示) 和 RACE 引物和 Marathon™ cDNA 扩增试剂盒中提供的其他材料和方法实施的 cDNA 末端 5' 和 3' 快速扩增 (RACE) 技术实现 AMG6.4 重链 cDNA 的扩增。
- [0282] 5' IgG2RACE 引物
- [0283] 5' -GGC ACG GTC ACC ACG CTG CTG AG-3' (SEQ ID NO :9)
- [0284] 3' IgG2RACE 引物
- [0285] 5' -CCT CCA CCA AGG GCC CAT CGG TCT-3' (SEQ ID NO :10)
- [0286] 将 600bp5' RACE 产物和 1200bp3' RACE 产物克隆到 pCR2.1 (Invitrogen) 中并且测序。该序列信息被用来设计用于克隆全长序列的  $\alpha$  OPGL-1 重链特异性引物。重链 5' 引物 (5'  $\alpha$  OPGL-1 IgG2 引物) 针对有义链并且在天然起始位点前有 HindIII 位点和共有 Kozak 序列。重链 3' 引物 (3'  $\alpha$  OPGL-1 IgG2 引物) 是反义引物, 并且在重链 I gG2 序列的最后一个氨基酸之后包含 SaI 位点和终止密码子。
- [0287] 5'  $\alpha$  OPGL-1 IgG2 引物:

- [0288] 5' -CAGAAGCTTGACCACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GC-3'
- [0289] (SEQ ID NO :11)
- [0290] HindIII Kozak M E F G L S W L F L V A
- [0291] (SEQ ID NO :18)
- [0292] 3'  $\alpha$  OPGL-1IgG2 引物:
- [0293] 5' -GCA TGTCGAC TTA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG-3' (SEQ ID NO :12)
- [0294] SalI \* \* K G P S L S L (SEQ ID NO :19)
- [0295] 通过使用 5' - 和 3' - $\alpha$  OPGL-1IgG2 引物进行 PCR 扩增,使用上述双链 cDNA 产生全长重链 cDNA。PCR 产生编码  $\alpha$  OPGL-1IgG2 重链蛋白质的 467 个氨基酸残基(包括 19 个氨基酸 IgG 信号序列)的 1433bp 片段(图 2, SEQ ID NO :2)。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen cat no. 28104)纯化之后,使用该片段如下构建重链表达载体。
- [0296] 使用 HindIII 和 SalI 酶切上述产生的编码全长 IgG2 重链片段的 DNA,使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(Qiagen cat no. 28704)纯化,并且将该片段克隆到 pDSR  $\alpha$  19 中。得到的表达质粒称作  $\alpha$  OPGL-1-IgG2/pDSR  $\alpha$  19(图 6)。所有的载体成分与上述  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSR  $\alpha$  19 载体相同,除了在 XbaI 和 SalI 位点之间  $\alpha$  OPGL-1-IgG2 重链 cDNA 置换  $\alpha$  OPGL-1  $\kappa$  轻链 cDNA。对  $\alpha$  OPGL-1-IgG2 重链表达克隆测序,证实它编码 AMG6.4 杂交瘤中鉴定的相同的多肽。
- [0297] 实施例 2
- [0298] 在 CHO 细胞中的  $\alpha$  OPGL-1 表达
- [0299] 通过将  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSR  $\alpha$  19 和  $\alpha$  OPGL-1-IgG2/pDSR  $\alpha$  19 共转染到二氢叶酸还原酶缺陷(DHFR)中国仓鼠卵巢细胞(CHO AM-1/D,美国专利 No. 6210924)接着分离并分析各个克隆来实现  $\alpha$  OPGL-1 抗体的稳定表达。
- [0300] 在转染之前的这天(第 0 天),用生长在 CHO d<sup>-</sup>培养基(DMEM-高葡萄糖,10%胎牛血清,1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺,1X 丙酮酸钠,1%非必须氨基酸(NEAA))(Gibco®)和 1% h t 补充物(Gibco®)中的  $1.5 \times 10^6$  AM-1/D 细胞在 100mm 组织培养皿中铺板。第一天,将 400 微升无血清 RPMI1640 培养基(Gibco®)等分到 12x75mm 聚丙烯试管中。向培养基滴加 24 微升 TransIT®-LT1 试剂(Mirus Corporation)并且将混合物在室温下温育 10 分钟。然后向混合物滴加总共 15 微克线性质粒 DNA(7.5 微克的  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  /pDSR  $\alpha$  19 和 7.5 微克的  $\alpha$  OPGL-1-IgG2/pDSR  $\alpha$  19,用 PvuI 消化),在室温下温育 10 分钟。
- [0301] 从细胞去除 CHO d<sup>-</sup>培养基,用 10 毫升 Dulbecco's 磷酸缓冲盐水(Gibco®)洗涤。向细胞加入 6 毫升补加有 HT, L-glu, NEAA 和丙酮酸钠(Gibco®)的无血清 MEM 培养基。向板滴加 DNA/LT1 复合体,小心来回摇晃,使 DNA 平均分给细胞。在组织培养箱中培养 6 小时之后,用新鲜 CHO d<sup>-</sup>培养基替换培养基。48 小时之后,将细胞分给 10 个 CHO 选择培养基(DMEM-高葡萄糖,10%透析过的胎牛血清,1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺,1%非必须氨基酸和 1X 丙酮酸钠)(Gibco®)中的 100mm 培养皿。每周更换两次培养基直到菌落出现。
- [0302] 10-14 天之后,使用 1x 胰蛋白酶-EDTA(Gibco®)中浸泡的 5mm 克隆皿(Labcore®)挑选菌落,并且在 24 孔组织培养板中用 CHO 选择培养基培养。当细胞开始汇合之后,加入无血清培养基(CHO 选择培养基, FBS 阴性),然后在 48 小时之后收集。通

过用辣根过氧化物酶 (HRP) - 偶联的山羊抗 - 人 IgG Fc 抗体 (Pierce, Rockford, IL) 进行蛋白质印迹对这些条件培养基分析抗体表达, 来测定  $\alpha$  OPGL-1 重链, 和用山羊抗 - 人  $\kappa$  链抗体 (Pierce, Rockford, IL) 接着用 HRP - 偶联的兔抗 - 山羊 IgG (H+L 抗体) (Pierce, Rockford, IL) 来测定  $\alpha$  OPGL-1 轻链。使最高表达克隆扩展并且在液氮中保存。

#### [0303] 实施例 3

#### [0304] $\alpha$ OPGL-1 的制备

#### [0305] 细胞系 125Q 的制备和产生

[0306] 通过在 96 孔板中在无血清条件下的两轮限制稀释克隆产生  $\alpha$  OPGL-1 的 CHO 细胞。以各种悬浮容器中生产和生长特征为基础选择克隆。进行 EIA 来选择产生最高水平  $\alpha$  OPGL-1 的克隆。然后通过让克隆在 100 毫升, 250 毫升, 500 毫升, 1 升和 3 升旋转瓶以及在 3 升 Applikon 生物反应器中生长来测定生长特征, 包括倍增时间和密度。选择在培养中以最快倍增时间达到最高密度的克隆, 并且标记为细胞系 125Q。当克隆扩展得到足够细胞以大约  $1 \times 10^7$  细胞 / 毫升冷冻 360 安瓿时, 将细胞重新悬浮于冷藏的无血清培养基 (补加有 10 毫升 / 升非必须氨基酸和 10 毫升 / 升 L- 谷氨酰胺 (Gibco/LTI/Invitrogen), 和 10% 二甲亚砜 (JT Baker) 的 90% VM-Soy Batch 培养基 (详情参见表 3)) 并且冷冻。在限制接近的设备中保存安瓿并且浸在液氮真空瓶中的液氮中。

[0307] 以小规模旋转器和较大规模生物反应器中的生长和生产为基础, 根据用于生产  $\alpha$  OPGL-1 的细胞系选择 125Q 细胞系。

#### [0308] 细胞培养

[0309] 通过在 125Q 细胞系中表达而制备  $\alpha$  OPGL-1, 125Q 细胞系是从质粒  $\alpha$  OPGL-1- $\kappa$  / pDSR  $\alpha$  19 和  $\alpha$  OPGL-1-IgG2/pDSR  $\alpha$  19 表达  $\alpha$  OPGL-1 的 CHO 细胞的克隆细胞系。图 19 所示用于  $\alpha$  OPGL-1 的细胞培养方法。对于每一轮制备, 来自 125Q 细胞系小瓶的细胞最初在 50 毫升补加有 10 毫升 / 升非必须氨基酸和 10 毫升 / 升 L- 谷氨酰胺 (Gibco/LTI/Invitrogen) (VM-Soy Supp) 的 VM-Soy Batch 培养基 (成分参见表 3) 中在 125 毫升锥形摇瓶中以 100rpm 培养 5 天。然后用全部培养物接种 500 毫升旋转烧瓶中的 VM-Soy Supp 达到  $3 \times 10^5$  活细胞 / 毫升 (3E5vc/ml), 并且以 70rpm 旋转培养 3-4 天。使用来自 500 毫升旋转烧瓶的全部培养物接种 3L 旋转烧瓶中的 VM-Soy Supp 达到 3E5vc/ml, 并且以 70rpm 旋转培养 3-4 天。

[0310] 然后将 3L 旋转烧瓶中的培养物吸取到两个 3L 旋转烧瓶中, 在没有酚红的 VM-Soy Supp 中达到 3E5vc/ml 并且在相同的条件下培养。然后用这些旋转烧瓶培养物接种另外四个旋转烧瓶, 在没有酚红的 VM-Soy Supp 中达到 3E5vc/ml 并且在相同的条件下培养。用来自四个 3L 旋转烧瓶的四升培养物接种 20L 生物反应器中的 10L 没有酚红的 VM-Soy Supp, 生物反应器以分批进料方式运行 7-10 天。以分批进料方式, 加入含有浓缩培养基的营养进料 (“进料” 在下面的表 3 中所示) 保持细胞生长和培养物存活。

[0311] 然后用来自 20L 生物反应器的全部培养物接种 150L 生物反应器中的 70L 没有酚红的 VM-Soy Supp, 生物反应器以分批进料方式运行 9-10 天。最后, 用来自 150L 生物反应器的全部培养物接种 2000L 生物反应器中的大约 880L VM-Soy (没有补充物或酚红), 生物反应器以分批进料方式运行。测定分批进料方式过程中进料速度, 使得每一个生物反应器培养物中的葡萄糖水平保持在 0.6g/L。每天测定细胞密度和葡萄糖浓度并且相应调节进料速度。

[0312] 2000L 生物反应器中的生产持续大约两周,期间细胞组成型产生  $\alpha$  OPGL-1 并且分泌到细胞培养基中。

[0313] 设置 pH,温度和溶解的氧含量来控制生产反应器;pH 是 7.0 并且通过二氧化碳气体和加入碳酸钠控制;溶解的氧是 120 毫米汞柱并且通过空气,氮气和氧气流控制。在整个过程中细胞保持 37°C。所有的气体通过 0.22 微米或更小孔径的膜过滤器。

[0314] 在制备结束时,将细胞培养液加给盘式堆积离心机并且从细胞分离培养物上清液。通过 Cuno90SP 深度过滤器接着 0.2 微米 Posidyne 过滤器 (Pall Co.) 进一步澄清浓缩物。然后使用 50kD NMWL 膜 (Millipore Biomax50) 通过切向流超滤 (UF) 浓缩澄清的条件培养基。将条件培养基浓缩 15 至 30 倍。然后通过纯化或冷冻处理得到的浓缩条件培养基 (CCM),用于后面的纯化。图 19 总结了生产方法。

#### [0315] 细胞培养基

[0316] 整个细胞培养过程中使用的细胞培养基 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基/Ham's 营养 F12 (DMEM/F12, 1 : 1) 为基础,并且含有补充水平的氨基酸,另外的营养物和盐,大豆水解产物和重组人胰岛素 (**Nucellin®Zn**, Eli Lilly)。表 3 列出成分,该培养基称作 VM-Soy。在使用之前通过 0.2 微米孔径膜过滤器将培养基溶液过滤。

[0317] 表 3 细胞培养基成分

[0318] 基本培养基和进料的成分

成分	VMsOy 分批培养基 (mg/L)	进料 (mg/L)
成分		
无机盐		
[0319] CaCl <sub>2</sub> (无水)	116.60	233.2
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0026	0.0052
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.1000	0.2
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.8340	1.668
KCl	311.80	623.6
MgCl <sub>2</sub> (无水)	57.280	114.56
MgSO <sub>4</sub> (无水)	97.680	195.36
NaCl	905.990	1811.98

	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	125.00	250
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142.040	284.08
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.8640	1.728
	其它成分		
	D-葡萄糖	3151.00	12302
	次黄嘌呤钠	5.40	10.8
	亚油酸	0.090	0.18
	硫辛酸	0.2060	0.412
	酚红	8.10	16.2
	腐胺 .2HCl	0.1620	0.324
	丙酮酸钠	110.00	220
	氨基酸		
	L-丙氨酸	26.70	53.4
	L-精氨酸 HCl	295.00	590
	L-天冬酰胺.H <sub>2</sub> O	45.00	90
	L-天冬氨酸	39.90	79.8
[0320]	L-半胱氨酸.HCl.H <sub>2</sub> O	35.120	70.24
	L-胱氨酸 .2HCl	62.580	125.16
	L-谷氨酸	44.10	88.2
	L-谷氨酰胺	657.00	1314
	甘氨酸	52.50	105
	L-组氨酸 .HCl.H <sub>2</sub> O	62.950	125.9
	L-异亮氨酸	108.940	217.88
	L-亮氨酸	118.10	236.2
	L-赖氨酸 HCl	182.50	365
	L-甲硫氨酸	34.480	68.96
	L-苯丙氨酸	70.960	141.92
	L-脯氨酸	57.50	115
	L-丝氨酸	73.50	147
	L-苏氨酸	106.90	213.8
	L-色氨酸	18.040	36.08
	L-酪氨酸 .2Na.2H <sub>2</sub> O	111.580	223.16
	L-缬氨酸	105.70	211.4
	维生素		
	生物素蛋白	0.0073	0.0146

	D-泛酸钙	4.480	8.96
	氯化胆碱	17.960	35.92
	叶酸	5.30	10.6
	i-肌醇	25.20	50.4
	烟酰胺	4.040	8.08
	吡哆醛 HCl	4.00	8
	吡哆醇 HCl	0.0620	0.124
	维生素B <sub>2</sub>	0.4380	0.876
	维生素B <sub>1</sub> HCl	4.340	8.68
	胸苷	0.3635	0.727
	维生素 B12	1.360	2.72
[0321]	附加成分		
	Nucellin Zn, (rhu胰岛素)	5.00	15
	亚硒酸	0.0050	0.015
	乙醇胺	0.0012	0.0037
	三碘甲腺原氨酸	0.000040	0.00012
	氯化可的松	0.020	0.06
	柠檬酸铁	122.450	122.450
	Pluronic F-68	1000.00	500
	大豆水解物	6000.00	6000.00
	NaHCO <sub>3</sub>	3000.00	3000.00
	NaCl	3500.00	

## [0322] 纯化方法

[0323] CHO 细胞中表达的  $\alpha$  OPGL-1 分泌到胞外培养基中。可以应用一系列步骤制备纯物质。该方法使用疏水性电荷诱导, 阳离子交换, 和疏水性相互作用色谱法, 以及低 pH 步骤和病毒过滤器。下面描述这些方法。

## [0324] A. 疏水性电荷诱导色谱法 (HCIC)

[0325] 该色谱法步骤去除大多数宿主细胞蛋白质和 DNA。浓缩条件培养基 (CCM) 通过 Cuno30SP 过滤器过滤后通过 Cuno VR07 带电荷的纤维素基过滤器, 然后加样到 MEP HyperCel 树脂上。加样之后, 柱子用平衡缓冲液 (20mM Tris pH7.2) 冲洗。使用低 pH 缓冲液 (20mM 乙酸钠, pH5.0) 从树脂洗脱抗体。从柱子上洗脱时, 以柱子流出物的 280nm 吸光度为基础收集产物。

## [0326] B. 病毒灭活

[0327] 将 MEP 合并液滴定至 pH3.7 并且保持大约 60 分钟, 将可能的污染逆转录病毒灭活。保持步骤之后, 将 pH 调节至大约 6.0。

## [0328] C. 病毒过滤

[0329] 调节了 pH 的合并液通过 Millipore Viresolve NFR 过滤器或等同物过滤。抗体流过过滤器, 而  $\geq 50$ nm 的可能的污染病毒留下。

## [0330] D. 阳离子交换色谱法 (CEX)

[0331] 使用 SP 琼脂糖凝胶 HP (AmershamPharmacia) 或等同物通过阳离子交换色谱法进



一步纯化抗体。阳离子交换色谱法步骤去除另外的 CHO 细胞蛋白质, DNA, 低分子量蛋白质, 和聚集形式的  $\alpha$  OPGL-1。将病毒过滤合并液加样到阳离子交换树脂上, 加样之后, 用平衡缓冲液 (20mM NaMES pH6.2) 冲洗柱子。然后用递增盐线性梯度 (20mM NaMES pH6.2, 0M NaCl 至 20mM NaMES pH6.2 ; 0.3M NaCl) 洗脱抗体。从柱子上洗脱时, 以柱子流出物的 280nm 吸光度为基础收集产物。

[0332] E. 疏水性相互作用色谱法 (HIC)

[0333] 使用 Phenyl Toyopearl 650S (Tosoh Biosep) 或等同物通过疏水性相互作用色谱法进一步纯化抗体。疏水性相互作用色谱法被用作精制步骤并且去除另外的 CHO 细胞蛋白质, DNA, 低分子量蛋白质, 和聚集形式的  $\alpha$  OPGL-1。在加样到柱子上之前通过加入硫酸铵将阳离子交换合并液调节至 15-25°C 下电导率  $> 105\text{mS/cm}$ 。加样之后, 用平衡缓冲液 (1M 磷酸钾, pH8) 冲洗柱子。然后用递减盐浓度的线性梯度 (1M 磷酸钾, 0mM Tris pH8 至 0M 磷酸钾, 20mM Tris pH8) 洗脱抗体。从柱子上洗脱时, 以柱子流出物的 280nm 吸光度为基础收集产物。

[0334] F. 浓缩和渗滤

[0335] 通过使用 50kD NMWL 膜 (Millipore Biomax 50) 的切向流超滤将 HIC 柱合并液浓缩并且渗滤到配制缓冲液中。配制缓冲液含有 10mM 乙酸盐, 5% 山梨糖醇, pH5.2 和 30mg/mL 的  $\alpha$  OPGL-1。

[0336] 最后过滤和贮存

[0337] 纯化的产品通过 0.2 微米 P\DF 过滤器 (Millipore), 取样, 并且在大约 -30°C 安全冷冻库中储存。

[0338] 实施例 4

[0339]  $\alpha$  OPGL-1 的结合特异性

[0340] 如实施例 1 和 2 中讨论的用两个表达载体转染的 CHO 细胞中产生的抗体可以在下面的实施例 4, 5, 和 6 中使用。

[0341] 人 OPG 结合并中和大鼠, 小鼠和猕猴以及人中的 OPGL。  $\alpha$  OPGL-1 以高亲和性结合人 OPGL, 但是不显著与鼠 OPGL 结合 (表 4)。

[0342] 表 4 :  $\alpha$  OPGL-1 对细胞膜表达的人, 猕猴或小鼠序列的 OPGL 的亲合性

	OPGL 物种	$\alpha$ OPGL-1 ED <sub>50</sub> (ng/ml)
[0343]	人	16
	猕猴	19
	小鼠	没有特异性结合

[0344] 这些物种的 OPGL 在 CHO 细胞中表达为全长的膜结合的蛋白质。通过与  $\alpha$  OPGL-1 和 FITC- 标记的抗人 IgG2 二抗温育的细胞的 FACS 分析来评价  $\alpha$  OPGL-1 与细胞表面表达的 OPGL 的结合。  $\alpha$  OPGL-1 结合人和猕猴 OPGL, 但是不特异性结合小鼠 OPGL。

[0345] 另外, 据报道, 人 OPG 表现出与肿瘤坏死因子相关编程性细胞死亡诱导配体 (TRAIL) 弱的结合 (Truneh 等, 2000), 该配体是 TNF 家族相关成员, 它表现出与 OPGL 的 DNA

和氨基酸序列同源性 (Lacey 等, 1998)。但是, 检测不到 OPG 与其他 TNF- 相关蛋白质例如 TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , 或 CD40 配体结合。

[0346] EIA 板上  $\alpha$  OPGL-1 特异性结合 OPGL (图 7)。室温下重组可溶 OPGL (2 微克 / 毫升) 包被到 96- 孔 EIA 板上 16-24 小时。用 PBS 中 1% BSA 封闭之后, 向孔中加入各种浓度的在 1% BSA/PBS 中稀释的  $\alpha$  OPGL-1 (大约 2ng/ml 至 1000ng/ml) 并且在室温下温育平板大约 2 小时。使用 TMB-H2O2 (四甲联苯胺和过氧化氢) 底物混合物使用山羊抗 - 人 IgG (Fab') -HRP 检测结合的抗体。读取 450nm 和 650nm 的吸光度。

[0347]  $\alpha$  OPGL-1 特异性结合转染细胞表面上表达的 OPGL (图 8)。在 FACS 缓冲液 (PBS, 0.1% BSA, 0.01% 叠氮化钠) 中稀释的  $\alpha$  OPGL-1 (100ng/ml) 用各种浓度的 OPGL, TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , TRAIL, 或 CD40 配体 (大约 0.1ng/ml 至 1000ng/ml) 预先温育, 然后加给大约 200, 000 CHO REN218-9 细胞, 它们是细胞表面上稳定表达膜结合的 OPGL 的 CHO 细胞。2-8°C 下 1 小时之后, 通过离心去除没有结合的抗体并且洗涤。细胞然后在 2-8°C 下与 FITC- 标记的 F(ab')<sub>2</sub> 山羊抗 - 人 IgG (Fc  $\gamma$  片段特异性) 温育 30 分钟。离心和洗涤之后, 使用流式细胞术测定细胞表面荧光。图 8 说明  $\alpha$  OPGL-1 与 CHO REN218-9 细胞的结合是特异性的, 并且加入可溶 OPGL 会竞争性减小, 但是加入 TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , TRAIL, 或 CD40 配体则不这样。

[0348] 在竞争实验中, 加入外源 OPGL 会抑制  $\alpha$  OPGL-1 与 EIA 平板上 OPGL 结合 (图 9), 但是加入 TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , TRAIL, 或 CD40 配体则不这样 (图 10)。以和上面对于  $\alpha$  OPGL-1 与 EIA 平板上 OPGL 结合方法基本上相同的方法进行该程序, 但是在加给 OPGL 包被板之前, 恒定浓度的  $\alpha$  OPGL-1 (100ng/mL) 用各种浓度的可溶 OPGL 或其他配体 (每种大约 1ng/ml 至 1000ng/ml) 预先温育。

[0349] 实施例 5

[0350]  $\alpha$  OPGL-1 中和活性

[0351] 破骨细胞形成的抑制

[0352] RAW264.7 (ATCC No. TIB-71, Manassas, VA) 是鼠巨噬细胞细胞系, 它来自 Abelson 鼠白血病病毒诱导的肿瘤。RAW264.7 细胞在 OPGL 存在下分化为破骨细胞样细胞。对于 OPGL 存在下 RAW 细胞培养形式中产生破骨细胞的基础分析的详细描述见 Simonet 等 (1997) Cell 118p. 309, 和 Lacey 等 (1998) Cell 119p. 165, 它们在这里为了任何目的引作参考。

[0353] 配体刺激 RAW 细胞分化为破骨细胞样细胞, 通过 TRAP 活性和破骨细胞的性质能测定分化作用。因此, 能测定  $\alpha$  OPGL-1 对破骨细胞生成的作用。

[0354] 在细胞培养基 (DMEM, 10% FBS, 0.292mg/ml L-Glut, 100 单位 / 毫升青霉素 G, 100 微克 / 毫升硫酸链霉素) 中, 在恒定量的 OPGL (40ng/ml) 和不同量的  $\alpha$  OPGL-1 (6.3ng/ml 至 200ng/ml) 存在下, RAW 细胞温育 4 天。第四天结束时, 通过渗透作用和酸化作用, 接着用对 - 硝基苯磷酸酯处理 5 分钟将细胞染色用于酒石酸盐 - 抗性酸磷酸酶 (TRAP) 活性测定。简要地说, 从培养基抽吸细胞, 向各个孔加入 100 微升柠檬酸盐缓冲液 (410 毫升 0.1M 柠檬酸, 590 毫升 0.1M 柠檬酸盐, 三钠盐, 1mL tritonX-100), 并且将平板在室温下温育 3-5 分钟。然后加入 100 微升 PNPP 溶液 (157.8mg 酸磷酸酶试剂 (Sigma104100), 7.2ml 酒石酸盐溶液 (Sigma cat. no. 387-3), 和 22.8ml 柠檬酸盐缓冲液), 并且将平板在室温下温育 3-5 分钟。加入 50 微升 0.5M NaOH 溶液终止反应。

[0355] TRAP 将对 - 硝基苯基磷酸酯转化为对 - 硝基苯酚, 通过 405nm 的光密度测定进行

定量测定。因此对于破骨细胞发育是替代标记的 TRAP 活性与 405nm 的光密度相关联。图 11 所示光密度对  $\alpha$  OPGL-1 浓度的图, 并且证明在该项分析中  $\alpha$  OPGL-1 抑制破骨细胞形成。

#### [0356] OPGL 结合其受体的抑制作用

[0357] 通过  $\alpha$  OPGL-1 阻断 OPG 配体与其相关受体, 破骨细胞分化和激活受体 (ODAR, 也称作 RANK) 结合的能力证明  $\alpha$  OPGL-1 的效力。这项分析应用均匀的时间分辨荧光共振 (HTRF) 测定  $\alpha$  OPGL-1 与铕-偶联骨保护素配体 (Eu-OPGL) 的结合。如果  $\alpha$  OPGL-1 抑制 Eu-OPGL 结合 ODAR, 荧光输出将减小, 存在的  $\alpha$  OPGL-1 的量与荧光量成反比关系。

[0358] 用铕标记 OPGL, 当在 337nm 光激发时其在 620nm 发射。ODAR 与 FLAG 融合并且与 Fc 融合, Fc-ODAR-FLAG 融合蛋白用与别藻蓝蛋白 (APC) 连接的抗-FLAG 抗体标记, 别藻蓝蛋白是当在 620nm 光激发时在 665nm 发射的荧光团。因此, 当 Eu- 标记的 OPG 配体结合 Fc-ODAR-FLAG/ 抗-FLAG-APC 复合体时, 当在 337nm 光激发时三元复合体在 665nm 发射。

[0359] 0.05  $\mu$ g/ml 的 Eu-OPGL 与测定缓冲液 (50mM Tris pH8, 100mMNaCl, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 1% BSA, 和 0.05% Tween20) 中各种浓度 (0.1 至 150ng/ml) 的  $\alpha$  OPGL-1 在室温下温育大约 1 小时 (预温育混合物)。还在测定缓冲液中制备 Fc-ODAR-FLAG (1  $\mu$ g/ml) 和抗-FLAG-APC (2.5  $\mu$ g/ml) 的混合物并且在室温下温育 1 小时 (荧光染料混合物)。然后合并等体积的预温育混合物和荧光染料混合物并且在室温下温育 3 小时。在 Packard Discovery HTRF 微量板分析仪上对板读数测定荧光度, 使用 337nm 激发波长和 665nm 发射波长。

[0360] 当  $\alpha$  OPGL-1 与 Eu-OPG 配体预温育之后与 Fc-ODAR-FLAG/ 抗-FLAG-APC 混合时, 665nm 的荧光密度以剂量依赖方式减小, 如图 12 所示, 证明  $\alpha$  OPGL162 能有效抑制 OPGL 与 ODAR 的结合。

#### [0361] 实施例 6

#### [0362] 猕猴的药物动力学

[0363] 六只雄性和六只雌性猕猴, 鼠龄小于 4.5 年并且体重 2-4kg 分成 4 个剂量组。第 1 组由三只雄性和三只雌性组成。第 2, 3, 和 4 组各自由一只雄性和一只雌性组成。对第 1 组的动物施用单一 SC 剂量的 1mg/kg  $\alpha$  OPGL-1, 而对第 2, 3, 和 4 组的动物分别施用单一 IV 剂量的 0.1, 1.0, 或 10.0mg/kg 的  $\alpha$  OPGL-1。

[0364] 动物接受转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞表达的  $\alpha$  OPGL-1。取血清样品测定  $\alpha$  OPGL-1 水平, 抗体分析, 骨更新标记物血清 N- 端肽 (血清 N-Tx) 分析, 碱性磷酸酶 (ALP) 分析, 和血清钙 (血清 Ca) 分析。收集尿液分析 N- 端肽 (尿 N-Tx) 和肌酐。

[0365] 通过三阶段分布表征 IV 给药之后的血清浓度-时间曲线 (图 13)。最初, 有一个快速分布期, 接着是一个显著减慢的平台期, 它表现出是浓度-依赖性的。第三观察期是快速消除期。

[0366] 应用利用 WinNonlin Professional (v1.5) 的完全血清浓度-时间曲线的非-区室分析, 和试验物质施用之后最多 14 天的数据指数分析, 以及使用 SAAM II (v1.1.2) 的 10,000ng/mL 以上分析, 来研究  $\alpha$  OPGL-1 在猴子中的药物动力学。所有 IV 给药分布的初始体积平均是 28.9ml/kg, 类似于血浆浓度。所有 IV 给药分布的稳定态体积 ( $V_{ss}$ ) 平均是 39ml/kg。指数分析表明  $\alpha$  OPGL-1 有 6.02 小时的平均分布半衰期 ( $t_{1/2\alpha}$ ), 延续的第二期随着剂量的加大, 半衰期 ( $t_{1/2\beta}$ ) 从 0.1mg/kg 剂量的 86.9 小时延长至 10.0mg/kg 剂量的 444

小时。所有的 IV 给药组非区室估计终末消除半衰期 ( $t_{1/2z}$ ) 平均 31 小时。发现  $\alpha$  OPGL-1 的清除率 (CL, CL/F) 是非线性的, 接受 IV 给药 10mg/kg 剂量的动物平均清除率是 0.120ml/hr/kg) 比接受 0.1mg/kg (0.401ml/hr/kg) 的低 3.3- 倍。

[0367] 皮下给药之后, 吸收慢, 132 小时时平均峰值浓度 ( $C_{max}$ ) 是 11,600ng/ml。SC 给药之后暴露范围高度可变, 导致  $0.387 \pm 0.281$  ml/hr/kg 的平均清除率和  $202 \pm 80.1$  小时的平均存留时间。平均生物利用度是 89%。

[0368] 表 5 中总结了前面的数据。

[0369] 表 5 : IV 和 SC 施用单一剂量  $\alpha$  OPGL-1 之后猕猴体内平均 ( $\pm$ SD) 非-区室药物动力学参数<sup>a</sup>

非-区室参数估计						
参数	单位	1.0 mg/kg		0.1 mg/kg	1.0 mg/kg	10 mg/kg
		SC (n=6)		IV (n=2)	IV (n=2)	IV (n=2)
		平均值	SD	平均值	平均值	平均值
$T_{max}$	hr	132	60.2	0	0	0
$C_{max}$	ng/ml	11600	3410	4330	38200	326000
$t_{1/2z}$	hr	34.9	11.1	30.7	31.4	ND <sup>b</sup>
$AUC_{(0-\infty)}$	$\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$	3520	1750	253	3950	99900
CL, CL/F	ml/hr/kg	0.387	0.281	0.401	0.256	0.120
MRT	hr	202	80.1	84.8	124	519
V <sub>ss</sub>	ml/kg	N/A <sup>c</sup>	N/A	33.7	31.7	55.9

[0371] <sup>a</sup>对三个有显著图报道的值

[0372] <sup>b</sup>没有测定, PK 样品在平台 ( $\beta$ ) 期结束, 因此没有观察到终末期

[0373] <sup>c</sup>不可应用

[0374] 给药后 24 小时之内  $\alpha$  OPGL-1 引起血清 N-Tx 水平快速降低 (图 14)。发现最大效果的发生平均时间在 IV 给药从 0.1 增加至 10mg/kg 之后 12 小时至 7 天, 接受 SC 给药 1.0mg/kg 的动物在 12 小时和 11 天之间。最大效果随着剂量范围从 0.1 至 1mg/kg 而提高大约 80 至 91%。但是, 没有进一步抑制的较高剂量观察到最大抑制作用是 91%。IV 给药 0.1mg/kg 之后 28 天和 SC 给药 1mg/kg 之后 70 天血清 N-Tx 平均水平回到基线。尿液 N-Tx 表现出与血清 N-Tx 相似趋势, 除了第 105 天的研究所有的组回到基线值 (图 15)。

[0375] IV 给药 10.0mg/kg 之后 7 天血清 Ca 的抑制随着给药增加至低于基线平均值 31.6% 的平均最低点。所有的其他给药组血清 Ca 平均降低少于它们基线平均值的 26.4%。第 17 天, 被处理动物所有的血清 Ca 水平回到它们的基线平均值的 10% 之内 (图 20)。

[0376] 因为骨再吸收和形成密切相关, 与形成标记物 N-Tx 相比, 还观察到骨形成标记物 (ALP) 的变化在 ALP 水平上下下降缓慢得多并且延长更长时间的抑制作用 (图 21)。 $\alpha$  OPGL-1 给药之后观察到的骨形成标记 (ALP) 之前骨再吸收标记的减少证明  $\alpha$  OPGL-1 是骨抗-再吸收剂。

[0377] 大多数动物 (12 只中的 9 只) 产生抗  $\alpha$  OPGL-1 抗体。抗  $\alpha$  OPGL-1 抗体发生率不是剂量或途径依赖性的。当没有给药组具有抗体阴性和阳性动物时不可能评估抗  $\alpha$  OPGL-1 抗体对 0.1mg/kg 以上  $\alpha$  OPGL-1 药物动力学的作用。0.1mg/kg IV 时,  $\alpha$  OPGL-1 的大多数在

抗体产生之前清除,因此没有观察到对  $\alpha$  OPGL-1 处理的效果 (图 16)。

[0001]

序列表

<110> W. J. 博伊尔  
 F. H. 马丁  
 J. R. 科尔瓦兰  
 G. C. 达维斯

<120> 抗 OPGL 抗体

<130> 06843.0049-00000

<150> 60/301, 172

<151> 2001-06-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1426

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

```

aagcttgacc accatggagt ttgggctgag ctggcctttt cttgtggcta ttttaaagg 60
tgtccagtgt gaggtgeage tgttgagte tgggggagge ttgtacage ctggggggtc 120
cctgagaete tectgtgcag cctctggatt cacctttage agctatgcca tgagctgggt 180
ccgcccagct ccaggaaggg ggetggagt ggtctcaggt attactggga gtggtggtag 240
tacatactac geagactccg tgaagggccg gtteaccate tceagagaca attccaagaa 300
cacgctgtat ctgcaafga acagecagag agecagaggae aeggecgtat attacigtgc 360
gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttggttcgac ccttggggcc agggaaacct 420
ggtcaccgtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggte ttecccttg egecctgctc 480
caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggetgcctg gtcaaggact acttceccga 540
accggtgacg gtgtcgtgga actcaggegc tetgaccage ggcgtgcaca ccttccagc 600
tgtctacag tectcaggac tetactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctecagcaa 660
cttcggcacc cagacctaca cctgcaactg agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga 720
caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc 780
aggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctccggac 840
ccctgaggte acgtgcgtgg ttgtggacgt gagecaagaa gaacctgagg tccagttcaa 900
ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccaeggg aggagcagtt 960
caacagcagc ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtgtg caccaggact ggetgaacgg 1020
    
```

[0002]

caaggagtac aagtgeaagg tetccaacaa aggectccca gcccctcatcg agaaaaceat 1080  
 ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1140  
 ggagatgacc aagaaccagg tcagectgac ctgectggte aaaggttctt aceccagega 1200  
 catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc 1260  
 catgctggac tccgacggct ccttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagecag 1320  
 gtggcagcag gggaacgtct tetcatgctc cgtgatgcat gaggetctctg acaaccaeta 1380  
 caccgagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgataa gtegac 1426

<210> 2  
 <211> 467  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 2

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe  
 115 120 125

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

[0003]

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser  
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys  
 210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu  
 225 230 235 240

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380

[0004]



Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460

Pro Gly Lys  
 465

- <210> 3
- <211> 728
- <212> DNA
- <213> 小鼠

<400> 3  
 tctagaccac catggaacc ccagcgcage ttctcttccct cctgctaetc tggetcccag 60  
 ataccaccgg agaaattgtg ttgacgcagt ctcaggcac cctgtctttg tctccagggg 120  
 aaagagccac cctctcctgt agggccagtc agagtgttcg cggcaggtae ttagcctggg 180  
 accagcagaa acctggccag gtcgccaggc tctcatctta tgggtgatcc agcaggggcca 240  
 ctggcatccc agacaggttc agtggcagtg ggctcgggac agaattcaet ctcaccatca 300  
 gcagaetgga gctgaagat tttgcagtgt tttactgtca gcagtatggg agttcacctc 360  
 ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct 420  
 tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc 480  
 tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaaf 540  
 cgggtaacte ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca 600  
 gcagcacctt gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag 660  
 tcaccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat 720  
 aagtcgac 728

[0005]

<210> 4  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
  
 <400> 4  
  
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 I 5 10 15  
  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
 20 25 30  
  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Val Arg Gly Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
 65 70 75 80  
  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95  
  
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 100 105 110  
  
 Gly Ser Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 115 120 125  
  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 130 135 140  
  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160  
  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 165 170 175  
  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190  
  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

[0006]

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' kappa RACE 引物

<400> 5

gatgaccag tctccagcea cctg

25

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3' kappa RACE 引物

<400> 6

aagggtcaga ggccaaagga tgg

23

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5' 抗-OPGL-1 kappa 引物

<400> 7

caactetaga ccaccatgga aaceccagcg

30

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 3' 抗-OPGL-1 kappa 引物

<400> 8

tttgacgtcg acttatacae actetcccct gttgaag

37

[0007]



Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

[0009]

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 随机引物

<220>  
<221> misc\_特征  
<222> (18)..(23)  
<223> N 是 A, C, G, 或 T

<400> 15  
ggcggatag gectcaenm nnnt 24

<210> 16  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 5' 抗-OPGL-1 kappa 引物的部分的翻译

<400> 16

Met Glu Thr Pro Ala  
1 5

<210> 17  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 3' 抗-OPGL-1 kappa 引物的部分的翻译

<400> 17

Cys Glu Gly Arg Asn Phe  
1 5

<210> 18  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

[0010]

<223> 5' 抗-OPGL-1 IgG2 引物的部分的翻译

<400> 18

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala  
1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3' 抗-OPGL-1 IgG2 引物的部分的翻译

<400> 19

Lys Gly Pro Ser Leu Ser Leu  
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LHRH 拮抗剂肽

<220>

<221> MISC\_特征

<222> (1).. (1)

<223> Xaa 是 Ac-D-Nal, 其中 Nal 是 3-(2-萘基)丙氨酰基

<220>

<221> MISC\_特征

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 是 (4'-氯苯基)丙氨酰基

<220>

<221> MISC\_特征

<222> (3).. (3)

<223> Xaa 是 D-Pal, 其中 Pal 是 3-(3'-吡啶基)丙氨酰基

<220>

<221> MISC\_特征

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 是 N-甲基酪氨酸

<220>

<221> MISC\_特征

<222> (6).. (6)

<223> Xaa 是 D-天冬酰胺

[0011]

<220>  
 <221> MISC\_特征  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa 是 N-epsilon-2-丙基-赖氨酰基

<220>  
 <221> MISC\_特征  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa 是 D-丙氨酸-NH2

<400> 20

Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa  
 1 5 10



```

1 AAGCTTGACC ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTTT CTTGTGGCTA TTTTAAAAGG
61 TGTCAGTGT GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC
121 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT
181 CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTACTGGGA GTGGTGGTAG
241 TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA
301 CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC
361 GAAAGATCCA GGGACTACGG TGATTATGAG TTGGTTCGAC CCCTGGGGCC AGGGAACCCT
421 GGTCACCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC
481 CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA
541 ACCGGTGACG GTGTCTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCCTGCACA CCTTCCCAGC
601 TGTCCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
661 CTTCCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTGCA GTGCCACCCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC
781 AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA AAAACCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
841 CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
901 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
961 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG
1021 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT
1081 CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCCGGA
1141 GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
1201 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1261 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG
1321 GTGGCAGCAG GGGAACTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1381 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGATAA GTCGAC (SEQ ID NO: 1)

```

图 1

```

1 MEFGLSWLFL VAILKGVQCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
61 GKGLEWVSGI TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
121 TTVIMSWFDP WGQGLVTVS Sastkgpsvf plapcsrsts estaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkve
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
301 gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkg1pa piektisktk
361 gqprepvyt lppsreemtk nqsltc1vk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmls
421 dgsfflysk1 tvdksrwqg nvfscsvmhe alhnhytqks ls1spgk (SEQ ID NO: 2)

```

图 2

```
1 TCTAGACCAC CATGGAAACC CCAGCGCAGC TTCTCTTCTT CCTGCTACTC TGGCTCCCAG
61 ATACCACCGG AGAAATTGTG TTGACGCAGT CTCCAGGCAC CCTGTCTTTG TCTCCAGGGG
121 AAAGAGCCAC CCTCTCCTGT AGGGCCAGTC AGAGTGTTTC CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGGTGCATCC AGCAGGGCCA
241 CTGGCATCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTACCTC
361 GGACGTTTCGG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT
421 TCATCTTCCC GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC
481 TGAATAACTT CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
541 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC TACAGCCTCA
601 GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACCGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
661 TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTGAT
721 AAGTCGAC (SEQ ID NO: 3)
```

图 3

```
1 METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
51 GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
101 PEDFAVFYQC QYGSSPRTFG QGTKVEIKrt vaapsvfifp psdeqlksgt
151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdsd dstyslsstl
201 tiskadyekh kvvacevthq glsspvtksf nrged (SEQ ID NO: 4)
```

图 4

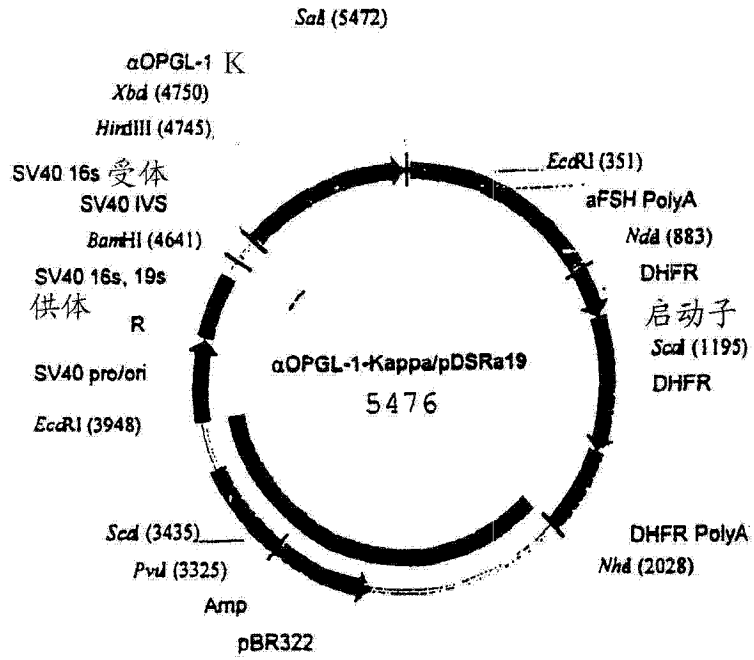


图 5

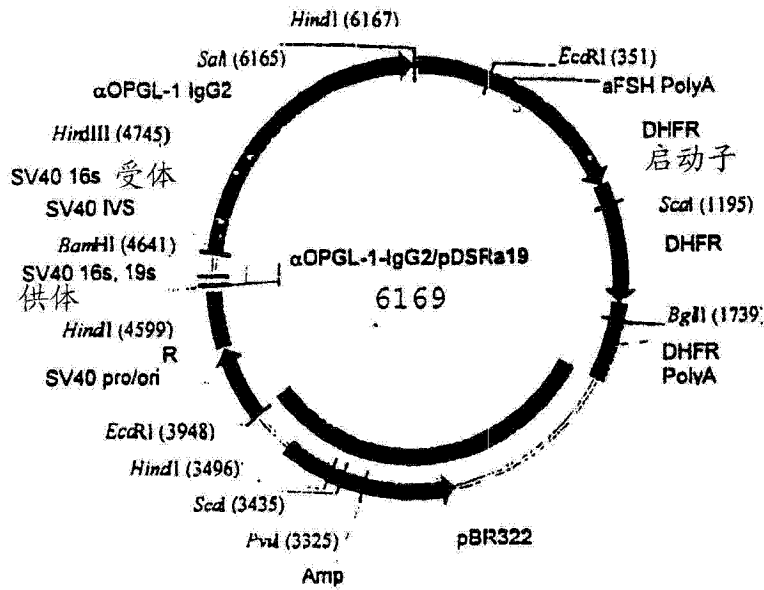


图 6

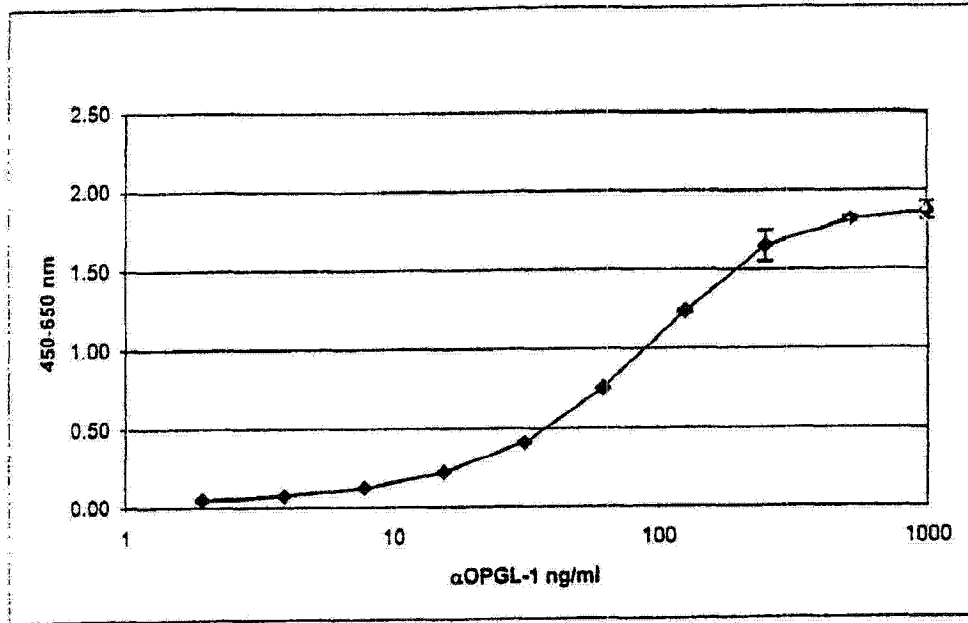


图 7

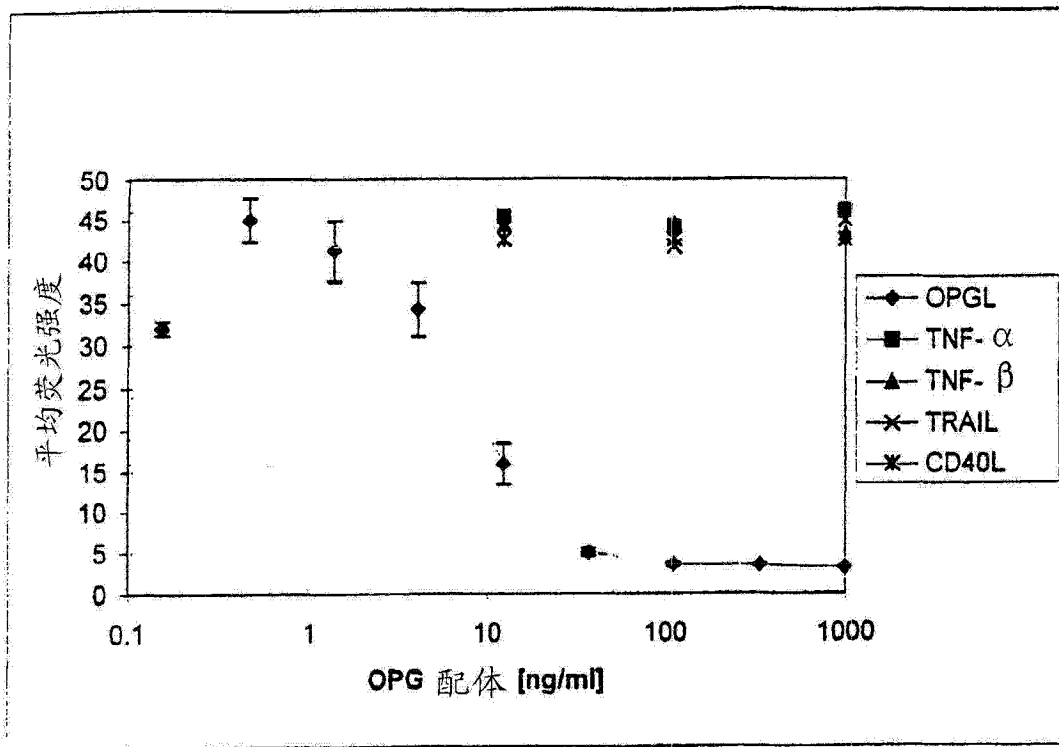


图 8

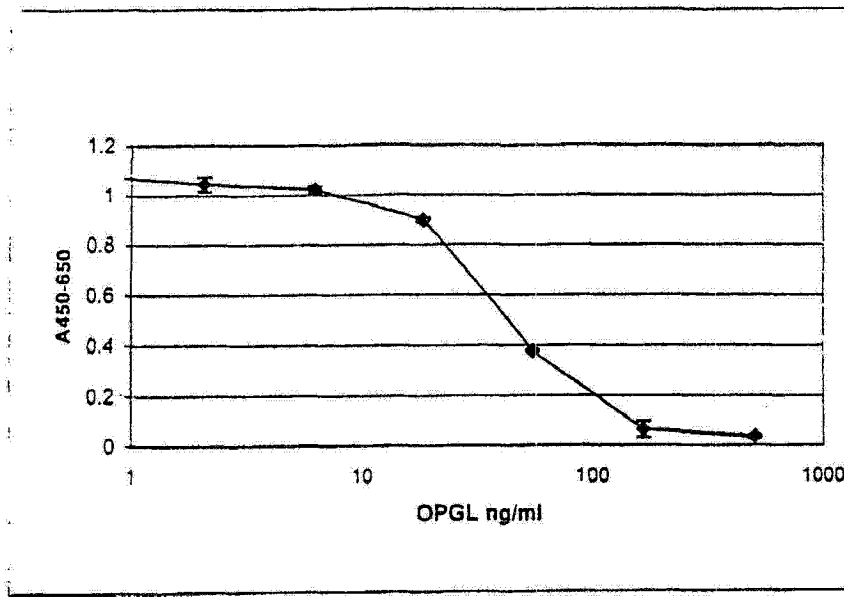


图 9

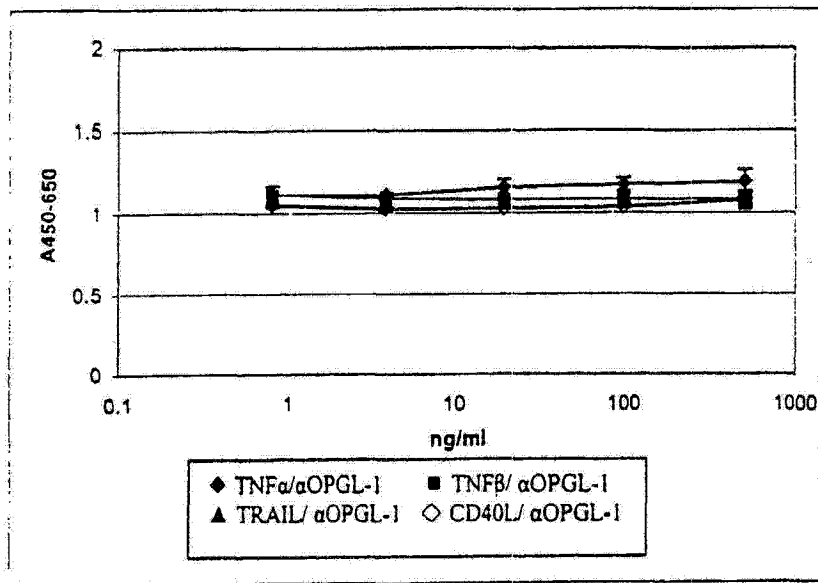


图 10

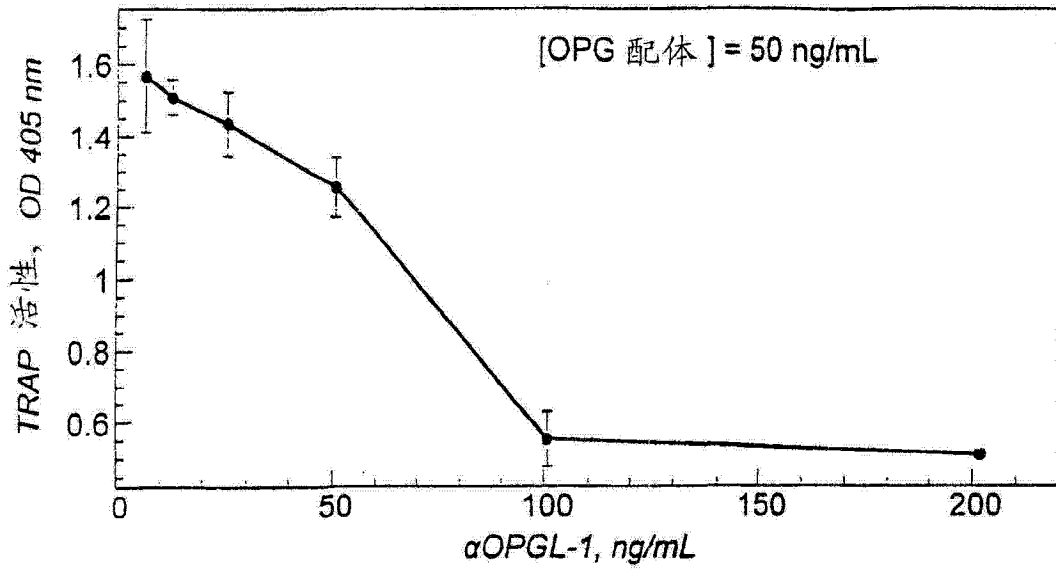


图 11

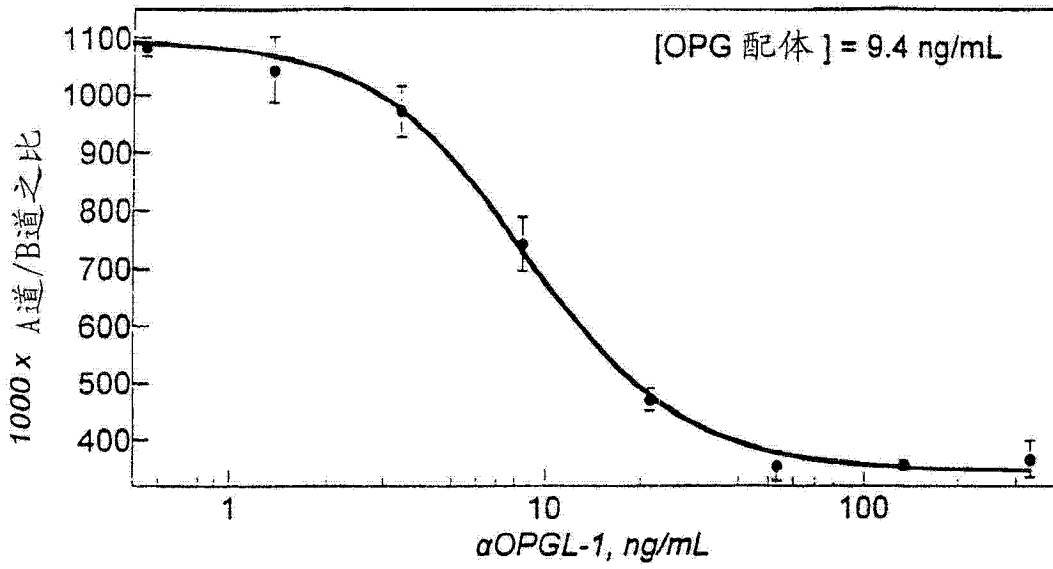


图 12

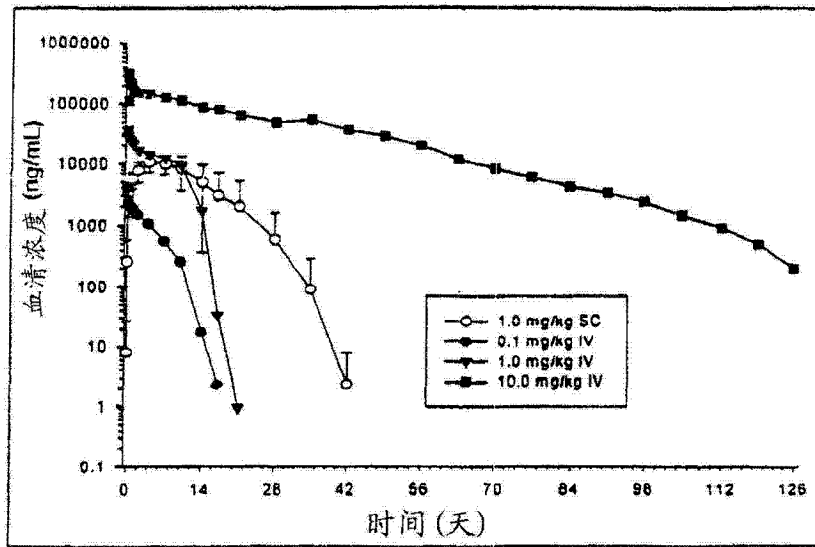


图 13

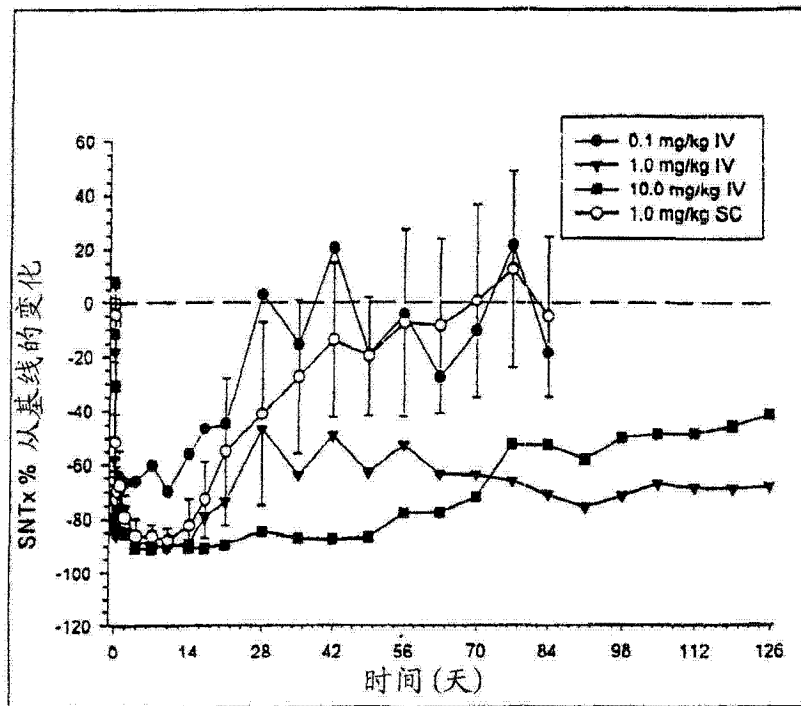


图 14

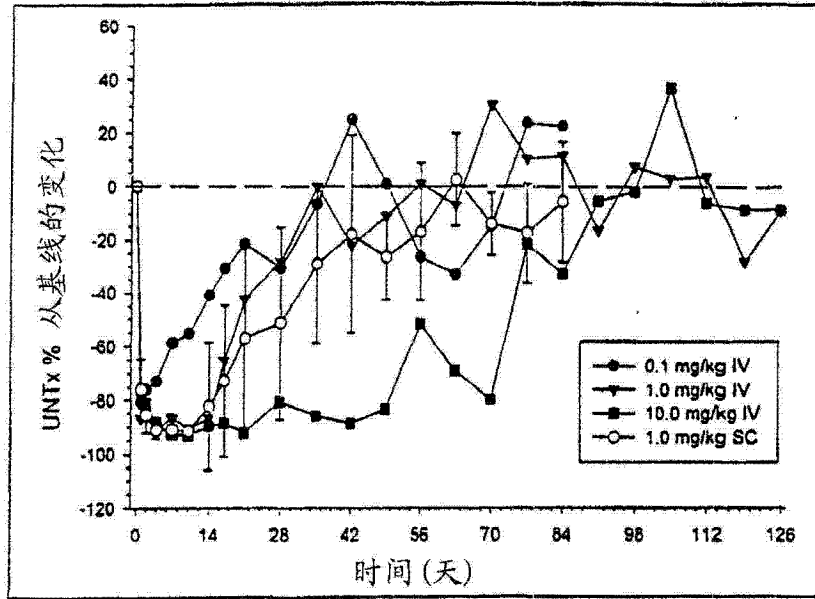


图 15

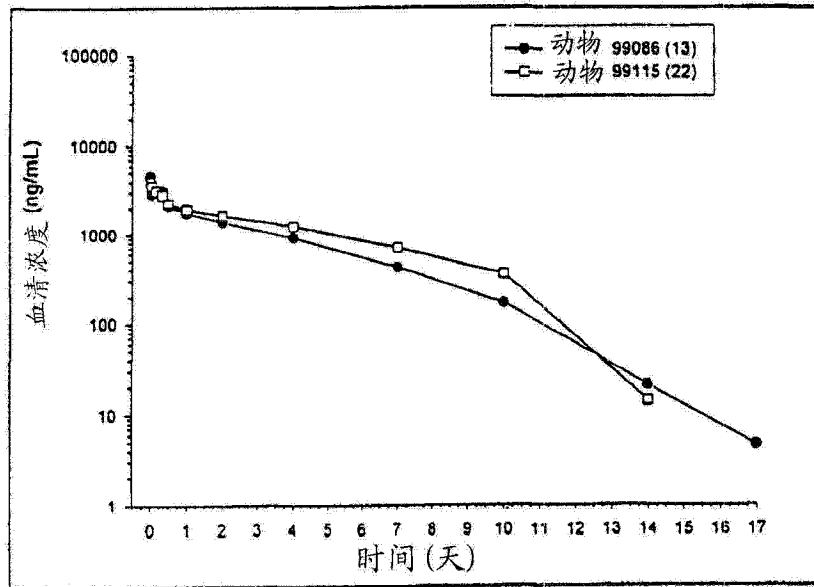


图 16

```

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA
41 PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
81 LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGLVTV
121 SS (SEQ ID NO: 13)
    
```

图 17



1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK  
 41 PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE  
 81 PEDFAVFCYQ QYGSSPRTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)

图 18

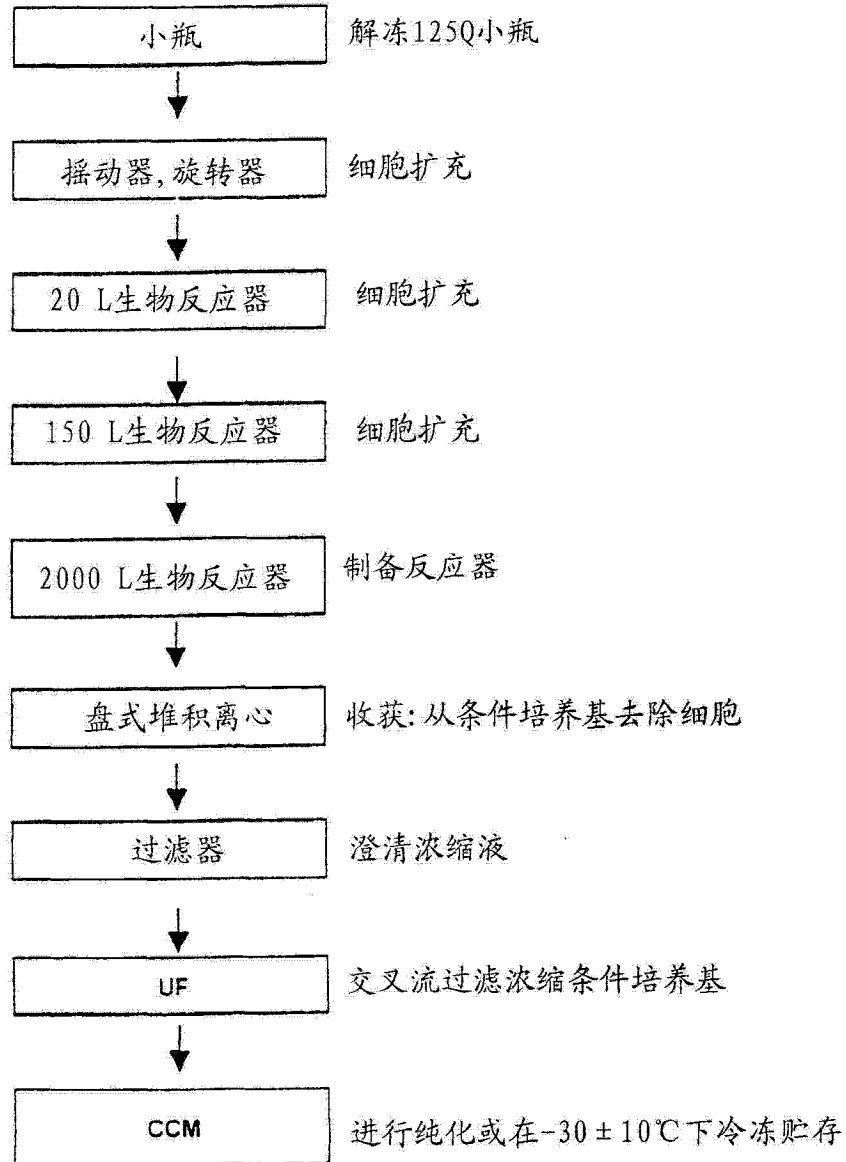


图 19

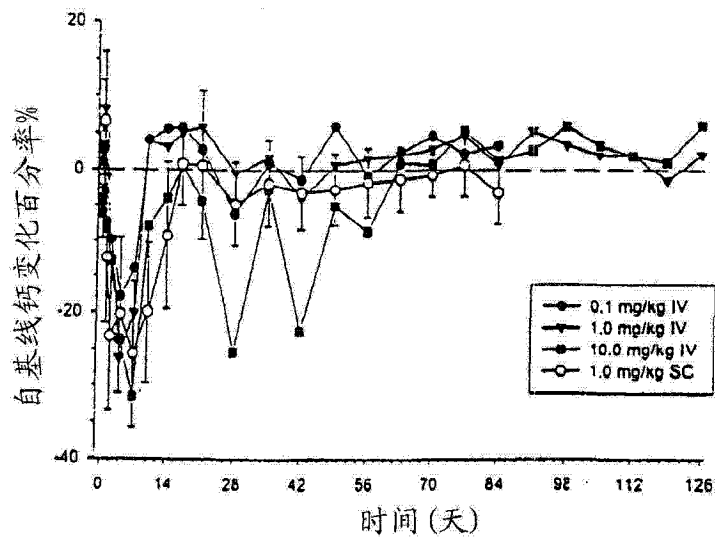


图 20

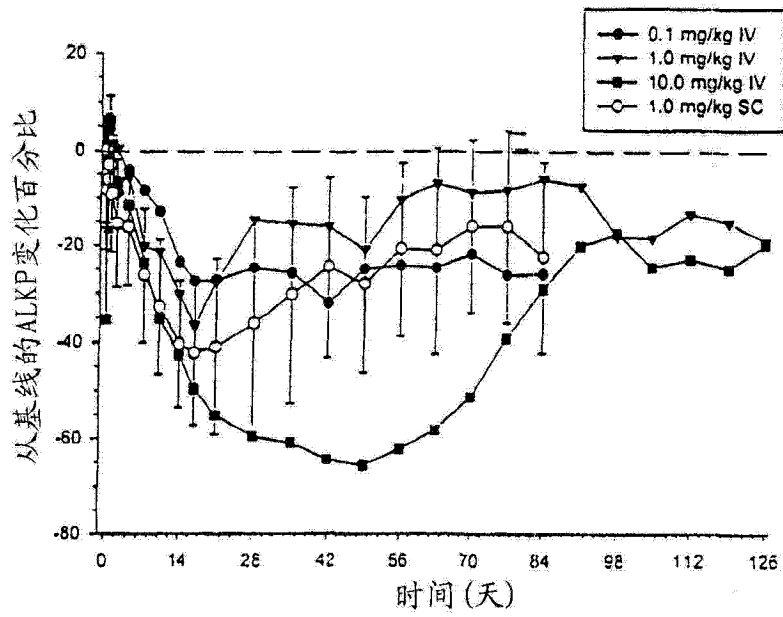


图 21