

(1)

九、發明說明

本申請案申稱美國暫時申請案序號 60/301,172(申請日期 2001年 6月 26日)之優先權，該案全文在此併入參考文獻。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於結合護骨素配位體(OPGL)之抗體。本發明亦關於治療骨質疾病，例如：骨質疏鬆症、源自關節炎之骨骼流失、變形性骨炎、及骨質減少之組成物及方法。

【先前技術】

骨組織係支持身體，其中包括礦物質(包括鈣及磷)、膠原蛋白的基質以及非膠原蛋白的蛋白質及細胞。骨質形成(被稱為儲存)與骨分解(被稱為重吸收)會在活的骨組織中呈現動態平衡。在骨中發現有三種細胞(骨細胞、成骨細胞及破骨細胞)涉及此種平衡。成骨細胞會促進骨組織形成，而破骨細胞則與重吸收相關。相較於骨質形成，重吸收或者骨基質及礦物質溶解是一種快速且高效率的過程，並可從骨中釋放大量之礦物質。破骨細胞涉及正常骨骼組織重整之調節及荷爾蒙誘發的重吸收。例如，回應細胞外液中鈣離子濃度降低後之副甲狀腺素分泌可刺激重吸收。相反的，血鈣素之功能可抑制重吸收。此外，維生素 D 代謝物可改變骨骼對副甲狀腺素以及降血鈣素之反應。

(2)

護骨素配位體 (OPGL)，其為細胞激動素 TNF 家族之一員，經由結合至受體活化蛋白質 NF- κ B (RANK，亦稱為破骨細胞分化及活化受體，或 ODAR)，可促進破骨細胞形成。另一方面護骨素 (OPG)，經由隔離 OPGL 及預防 OPGL 與 ODAR 結合，可抑制破骨細胞形成。因此，OPGL 與 ODAR 之結合量與骨質儲存及重吸收之間的平衡有關。

骨骼成熟之後，骨骼中骨之含量代表骨質形成及骨質重吸收間之平衡(或失衡)。骨質高峰發生於骨骼成熟之後四十歲之前。四十至五十歲之間，平衡位移至骨質重吸收。隨著年齡的增長(女性比男性早)骨質開始降低，一些女性在停經之後骨質顯著地加速流失(主要是白種人及亞裔)。

一般而言，骨質減少係關於任何骨質降低至正常含量以下的症狀。該症狀可緣起於骨合成速率降低或骨破壞速率增加或以上二因素。一般骨質減少的形式是原發性骨質疏鬆症，亦稱為後更年期及老年骨質疏鬆症。此骨質疏鬆症之形式，一般是因為年齡增長之骨流失所造成的結果，且經常是在增加骨質重吸收及正常骨質形成速率下所造成的結果。在美國許多白人女性會發展出症候性的骨質疏鬆症。在45歲及更年長的婦女中，骨質疏鬆症與髖部、股骨、頸以及關節骨折的發病率有直接關聯。50至70歲之間的老年男性可發展出症候性的骨質疏鬆症。在某些實例中，骨質疏鬆症可起因於 OPGL 之含量或活性增加。因此，可

(3)

使用調控 OPGL 活性之分子調控破骨細胞之生成。

目前已確認許多因子可促成後更年期及老年骨質疏鬆症。彼包括隨著老化改變激素之含量及歸因於腸對鈣及其它礦物質的吸收減低所造成之鈣攝取量不足。某些治療方式，包括激素治療或飲食補充均可延緩此過程。最近，已合併使用抗重吸收劑，例如雙膦酸鹽與選擇的動情激素受體修改劑 (SERMs)，預防及治療骨質降低。因此，可結合此類之治療方法以及調控 OPGL 活性之分子，治療某些骨質病症。

【發明內容】

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，其中重鏈包含序列確認號碼：2之胺基酸序列或其斷片，且輕鏈包含序列確認號碼：4之胺基酸序列或其斷片。

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，其中重鏈包含內含序列確認號碼：13之胺基酸序列或其斷片之變異區，且其中輕鏈包含內含序列確認號碼：14之胺基酸序列或其斷片之變異區。

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，其中重鏈包含序列確認號碼：2之胺基酸序列或其斷片。

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，其中重鏈包含內含序列確認號碼：13之胺基酸

(4)

序列或其斷片之變異區。

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，其中輕鏈包含序列確認號碼：4之胺基酸序列或其斷片。

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，其中輕鏈包含內含序列確認號碼：14之胺基酸序列或其斷片之變異區。

在某些具體實施例中，本發明提供一種包含重鏈及輕鏈之抗體，(a)其中重鏈包含第一變異區，其中第一變異區包含一段與序列確認號碼：13之胺基酸序列至少有90%相同之序列，及(b)其中輕鏈包含第二變異區，其中第二變異區包含一段與序列確認號碼：14之胺基酸序列至少有90%相同之序列，及(c)其中抗體可與護骨素配位體(OPGL)交互作用。

在某些具體實施例中，第一變異區包含一段與序列確認號碼：13之胺基酸序列至少有95%相同之序列，以及第二變異區包含一段與序列確認號碼：14之胺基酸序列至少有95%相同之序列。

在某些具體實施例中，第一變異區包含一段與序列確認號碼：13之胺基酸序列至少有99%相同之序列，以及第二變異區包含一段與序列確認號碼：14之胺基酸序列至少有99%相同之序列。

在某些具體實施例中，本發明提供包含序列確認號碼：2之胺基酸序列或其斷片之重鏈。在某些具體實施例中

(5)

，本發明提供包含變異區及恆定區之重鏈，其中變異區包含序列確認號碼：13之胺基酸序列或其斷片。

在某些具體實施例中，本發明提供包含序列確認號碼：4之胺基酸序列或其斷片之輕鏈。在某些具體實施例中，本發明提供包含序列確認號碼：14之胺基酸序列或其斷片之輕鏈。

在本發明某些具體實施例中，提供單鏈抗體。在本發明某些具體實施例中，提供單鏈 Fv 抗體。在本發明某些具體實施例中，提供 Fab 抗體。在本發明某些具體實施例中，提供 Fab' 抗體。在本發明某些具體實施例中，提供 (Fab')₂ 抗體。

在某些具體實施例中，提供包含本發明抗體之藥學組成物。在某些具體實施例中，提供包含有效治療量之 OPGL 抗體的藥學組成物。

在某些具體實施例中，藥學組成物包含 OPG 抗體及至少一個治療劑，其係選自：骨形態發生因子、轉形生長因子- β (TGF- β)、介白素 1 (IL-1) 抑制劑、IL-1ra、KineretTM、anakinra、TNF α 抑制劑、可溶解的 TNF α 受體、EnbrelTM、etanercept、抗-TNF α 抗體、RemicadeTM、infliximab、D2E7 抗體、副甲狀腺素、副甲狀腺素類似物、副甲狀腺素相關的蛋白質、副甲狀腺素類似物相關的蛋白質、前列腺素、雙磷酸鹽、阿多那酸鹽 (alendronate)、氟化物、鈣、非類固醇的抗發炎藥物 (NSAID)、COX-2 抑制劑、CelebrexTM、celecoxib、VioxxTM、rofecoxib；免

(6)

疫抑制劑、甲胺蝶呤、力夫諾賣 (leflunomide)、絲胺酸蛋白酶抑制劑、分泌型白血球蛋白酶抑制劑 (SLPI)、IL-6 抑制劑、IL6 抗體、IL-8 抑制劑、IL-8 抗體、IL-18 抑制劑、IL-18 結合蛋白質、IL-18 抗體、第一型白細胞介素轉換成酵素 (ICE) 調節劑、纖維母細胞生長因子 (FGF)、FGF 調節劑、PAF 拮抗劑、角質細胞生長因子 (KGF)、KGF-相關的分 子、KGF 調節劑；基質金屬蛋白酶 (MMP) 調節劑、一氧化氮合成酶 (NOS) 調節劑、糖皮質激素受體調節劑、麩胺酸鹽受體調節劑、脂多糖 (LPS) 含量之調節劑、去甲腎上腺素、去甲腎上腺素模仿劑、及去甲腎上腺素調節劑。

在本發明某些具體實施例中，提供治療骨質病症的方法，包含投用醫藥學上有效量之抗體。在某些具體實施例中，提供包含投用藥學組成物治療骨質病症的方法。

在某些具體實施例中，提供包含投用藥學組成物治療具有骨骼流失性發炎症狀之病患的方法。

在某些具體實施例中，提供包含投用藥學組成物治療具有骨骼流失性自體免疫症之病患的方法。

在某些具體實施例中，提供包含投用藥學組成物治療具有類風濕性關節炎之病患的方法。

在本發明某些具體實施例中，提供包含接觸樣品與抗體，在生物樣品中偵測 OPGL 含量之方法。

某些較佳的具體實施例之詳細描述

本節之標題僅用於作為整理目的，而非限制描述之主

(7)

題。所有本申請案引用之參考文獻，全文在此并入參考文獻。

定義

可使用標準技藝進行重組 DNA、寡核苷酸合成、以及組織培養及轉形作用(例如：電穿透作用、轉脂作用)。酶催化反應及純化技藝可依據製造業者之說明或一般技藝或本文描述之方法進行。前述技藝以及方法一般可依據技藝上習見的方法及描述於本說明中引用及討論之各種一般及特定的參考文獻進行。參閱，例如：Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989))，全文在此併入參考文獻。除非另行定義，本文中與實驗室程序以及技藝、分析化學、有機化學合成、以及藥用的以及醫藥學的化學相關之術語均為熟知及通常用於技藝中之名稱。可使用標準技藝進行化學合成、化學分析、醫藥學製備、調製及傳遞、及治療病患。

本揭示中，下列術語除非特別說明，其意義為：

本文之術語"分離的多核苷酸"是指一種基因的多核苷酸、互補型 DNA、或源自合成的多核苷酸或其組合，根據其起源"分離的多核苷酸"(1)與所有或部份多核苷酸(其中有自然存在的"分離的多核苷酸")並不相關，(2)係聯結至多核苷酸(並非自然聯結的)，或(3)在自然狀況下並不會存在於較大序列之部份。

(8)

本文之術語 "分離蛋白質" 係指由互補型 DNA、重組型 RNA、或源自合成或其組合所編碼之蛋白質，其係 (1) 至少不含一些通常將被發現之蛋白質，(2) 本質上不含相同來源 (例如同種) 之其它種蛋白質，(3) 由不同種的細胞表現，或 (4) 在天然狀況下不會發生。

本文之術語 "多肽" 意指天然的蛋白質，或經刪除、加入、及 / 或取代天然序列中一個或多個胺基酸的序列。本文之術語 "多肽" 亦包含 α OPGL-1 (如下述之序列確認號碼：2 及序列確認號碼：4)，或經刪除、加入、及 / 或取代一個或多個 α OPGL-1 之胺基酸的序列。在某些具體實施例中，本發明包含由圖 2 (序列確認號碼：2) 代表之人類重鏈免疫球蛋白分子以及由圖 4 (序列確認號碼：4) 代表之人類輕鏈免疫球蛋白分子，或斷片或其類似物。

本文之術語 "天然發生" 意指在天然中可發現之物。例如，存在於生物體 (包括病毒) 其可分離自天然來源且未經實驗室之人為修飾之多肽或聚核苷酸序列或其它天然發生之多肽或聚核苷酸序列。

本文之術語 "操作性聯結" 意指容許成份之間具有其預期功能的關係。例如，將控制序列 "操作性聯結" 至編碼序列，是指在該方式下連結後可在控制序列要求的相容條件下表現編碼之序列。

本文之術語 "控制序列" 意指可有效表現及操作彼連結的編碼序列之聚核苷酸序列。視宿主生物體而定該控制序列可不同。依據某些具體實施例，原核生物之控制序列可

(9)

包括啓動子、核糖體的結合部位、及轉錄終止序列。依據某些具體實施例，真核生物之控制序列可包括啓動子以及轉錄終止序列。在某些具體實施例中，"控制序列"可包括前導序列及/或融合伙伴序列。

本文之術語"多核苷酸"係指具有至少10個鹼基長度之聚合核苷酸形式。在某些具體實施例中，鹼基可為核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸或經修飾之任一類型的核苷酸形式。本文之術語包括單一及雙股形式的DNA。

本文之術語"寡核苷酸"包括天然之核苷酸，及聯結天然核苷酸之經修飾之核苷酸，及/或聯結非天然寡核苷酸之核苷酸。寡核苷酸為多核苷酸之次群，一般而言長度為200個鹼基或200個鹼基以下。在某些具體實施例中，寡核苷酸的長度為10至60個鹼基。在某些具體實施例中，寡核苷酸的長度為12、13、14、15、16、17、18、19、或20至40個鹼基。寡核苷酸可為單股的或雙股的，例如應用於構築基因突變。本發明之寡核苷酸可為正股或反股之寡核苷酸。

本文之術語"天然核苷酸"包括去氧核糖核苷酸及核糖核苷酸。本文之術語"經修飾之核苷酸"包括經修飾之或糖基經取代的核苷酸等。本文之術語"寡核苷酸聯結"包括的寡核苷酸聯結，例如：偶磷基硫代酸酯、偶磷基二硫代酸酯、偶磷基硒酸酯、偶磷基二硒酸酯、偶磷基安尼硫代酸酯(phosphoroanilothioate)、偶磷基安尼代酸酯(phosphoraniladate)、偶磷基醯胺等。參閱例如：

(10)

LaPlanche-et al.Nucl.Acids Res.14:9081(1986);Stec et al.J. Am.Chem. Soc.106:6077(1984);Stein et al.Nucl.Acids Res.16:3209(1988); Zon et al.Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991);Zon et al.Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108(F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)); Stec et al. U.S. Pat. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543(1990), 其揭示全文在此并入參考文獻。寡核苷酸可包括標記以利於偵測。

多胜肽相關的特性以及相似性可用已知的方法計算。該方法包括(但非限於)描述於 Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York(1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York(1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey(1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press(1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York(1991);以及 Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073(1988)。

測定相似性的較佳方法之設計原理係使測試序列之間產生最大符合。測定相似性之方法描述於公開之計算機程式。測定二種序列之間相似性的較佳電腦程式包括(但非

(11)

限於)：套裝的 GCG 程式，包括 GAP(Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387(1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN，及 FASTA(Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410(1990))。BLASTX 程式為公開的程式，可自 National Center for Biotechnology Information(NCBI)及其它來源取得 (BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., supra(1990))。習知的 Smith Waterman 算則亦可用以測定相似性。

校整二種胺基酸序列之某些校整圖解僅可在二種序列之短區域產生符合之配對，即使二種全長序列之間並無顯著關係，但此小校整區域仍具有非常高的序列相似性。因此在某些具體實施例中，可選擇對目標多肽產生跨越至少 50 個鄰近的胺基酸之校整方法 (GAP 程式) 進行校整。

例如，使用電腦算則 GAP(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) 時，二種多胜肽之序列相似性百分比係由其各胺基酸最理想校整之配對加以決定 ("配對跨度" 由算則決定)。在某些具體實施例中，隙開口處罰 (以平均對角線的 3 倍計算；"平均對角線" 是用於比對基質之對角線的平均；"對角線" 是符合特定比對基質的各理想胺基酸所給的分數或數目) 以及間隙延伸處罰 (通常是間隙開口處罰之 1/10 倍)，與比對基質例如 PAM 250 或 BLOSUM 62 可在算則中合併使用。在某些具體實施例

(12)

中，算則中亦可使用標準比對基質(PAM 250比對基質可參閱 Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3)(1978)；BLOSUM 62比對基質可參閱 Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89 : 10915-10919(1992))。

在某些具體實施例中，多肽序列比對之參數包括：

算則：Needleman et al., J. Mol. Biol., 48:443-453

(1970)；

比對基質：BLOSUM 62，來自 Henikoff et al., supra (1992)；

問隙處罰：12

問隙長度處罰：4

相似性閾：0

GAP 程式可適用上述參數。在某些具體實施例中，上述參數為使用 GAP 算則進行多肽比對之預設參數(端點問隙無處罰)。

本文中二十種習見的胺基酸及其縮寫如習見的方式。參閱 Immunology-A Synthesis(2nd Edition,E.S.Golub and D.R.Gren,Eds.,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991))，全文在此併入參考文獻。二十種習見胺基酸的立體異構物(例如，D-胺基酸)、非天然的胺基酸，例如： α -， α -二取代胺基酸、N-烷基胺基酸、乳酸、以及其它非習見的胺基酸亦可為本發明多胜肽適當的成份。非習見胺基酸的實施例包括：4-羥脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸鹽、 ϵ -N,N,N-三

(13)

甲基離胺酸、 ϵ -N-乙醯基離胺酸、鄰-磷絲胺酸、N-乙醯基絲胺酸、N-甲醯基甲硫胺酸、3-甲基組織胺酸、5-羥基離胺酸、 σ -N-甲基精胺酸、及其它相似的胺基酸以及亞胺酸(例如，4-羥脯胺酸)。依據標準用法及慣例，多肽記號法中，左手方向是胺基端的方向，右手方向是羧基端方向。

同樣地，若無特定說明，單股聚核苷酸序列的左手端是5'端；雙股的聚核苷酸序列的左手方向稱為5'方向。新生的RNA轉錄本從5'至3'方向加入稱為轉錄方向；在DNA股上位於RNA轉錄本5'端之5'端並與RNA具有相同序列之序列區域稱為"上游序列"；在DNA股上位於RNA轉錄本3'端之3'端並與RNA具有相同序列之序列區域稱為"下游序列"。

保留性胺基酸取代可包含非天然胺基酸殘基，其可經化學的肽合成無須經生物系統的合成而併入。此類取代包括擬肽的以及其它逆轉或倒置形式的胺基酸部份。

基於一般的側鏈性質，天然殘基可分成：

- 1) 厭水性殘基：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性的親水性殘基：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- 3) 酸性殘基：Asp、Glu；
- 4) 鹼性殘基：His、Lys、Arg；
- 5) 影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；以及
- 6) 芳香族殘基：Trp、Tyr、Phe。

例如，非保留性取代可包含將一類的殘基與另一類的

(14)

殘基交換。該經取代的殘基可引入與非人類抗體同源的人類抗體區域，或引入分子之非同源的區域。

依據某些具體實施例製作該改變，可考慮基於各胺基酸之拒水性及電價特性所指定之水徑指數 (hydropathic index)。其為：異白胺酸 (+4.5)；纈胺酸 (+4.2)；白胺酸 (+3.8)；苯丙胺酸 (+2.8)；半胱胺酸 / 胱胺酸 (+2.5)；甲硫胺酸 (+1.9)；丙胺酸 (+1.8)；甘胺酸 (-0.4)；蘇胺酸 (-0.7)；絲胺酸 (-0.8)；色胺酸 (-0.9)；酪胺酸 (-1.3)；脯胺酸 (-1.6)；組織胺酸 (-3.2)；麩胺酸鹽 (-3.5)；麩胺醯胺酸 (-3.5)；天門冬胺酸酯 (-3.5)；天門冬醯胺酸 (-3.5)；離胺酸 (-3.9)；以及精胺酸 (-4.5)。

在此技藝中據瞭解胺基酸水徑指數 (hydropathic index) 的重要性與蛋白質交互作用性生物的功能相關。參見 Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 105-131 (1982)。目前已知某些胺基酸可經其它具有相似水徑指數 (hydropathic index) 或分數的胺基酸取代仍且保有相似的生物活性。在某些具體實施例中基於水徑指數 (hydropathic index) 所進行的改變，其取代胺基酸之水徑指數 (hydropathic index) 在 +2 之內。在某些具體實施例中，在 +1 之內，以及在某些具體實施例中，在 +0.5 之內。

據瞭解，在此技藝中類似胺基酸之取代可有效地以親水性為基礎，尤其是生物功能的蛋白質或肽，從而創造出如本案中預期應用於免疫的具體實施例。在某些具體實施例中，蛋白質最大的局部平均親水性，係由其相鄰胺基酸

(15)

的親水性決定，與基免疫產生性及抗原性相關，即與蛋白質的生物性質相關。

此類胺基酸殘基之親水性值為：精胺酸(+3.0)；離胺酸(+3.0)；天門冬胺酸酯(+3.0+1)；麩胺酸鹽(+3.0+1)；絲胺酸(+0.3)；天門冬醯胺酸(+0.2)；麩胺醯胺酸(+0.2)；甘胺酸(0)；蘇胺酸(-0.4)；脯胺酸(-0.5+1)；丙胺酸(-0.5)；組織胺酸(-0.5)；半胱胺酸(1.0)；甲硫胺酸(-1.3)；纈胺酸(-1.5)；白胺酸(-1.8)；異白胺酸(-1.8)；酪胺酸(2.3)；苯丙胺酸(-2.5)以及色胺酸(-3.4)。在某些具體實施例中，基於相似的親水性值所進行的改變，取代之胺基酸其親水性值在+2之內，在某些具體實施例中，在+1之內，以及在某些具體實施例中，在+0.5之內。亦可從一級胺基酸序列上以親水性確認抗原決定部位。此類區域亦稱為"抗原決定的核心區域"。

典型的胺基酸取代如表1.

(16)

表 1：胺基酸取代

原始的 殘基	典型取代	較佳 取代
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、正白胺酸	Leu
Leu	正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、1,4-二胺基丁酸、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、正白胺酸	Leu

(17)

熟悉技藝的專業人士將能從該表中使用已知的技藝決定多肽的適當變型。在某些具體實施例中，熟悉此技藝的專業人士可確認分子適當的區域對不參與活性之目標區域進行改變，而不破壞活性。在某些具體實施例中，可經多胜肽之相似性確認分子守恆之殘基及部份。在某些具體實施例中，即使在生物活性或結構上重要區域用保留性胺基酸取代，仍不會破壞生物的活性或不會對多肽結構有不利地影響。

此外，熟悉此技藝的專業人士可參閱結構功能研究以確認多胜肽中相關於活性或結構之重要的相似的殘基。基於該比對，可預測蛋白質中相應於相似的蛋白質中相關於活性或結構之重要的胺基酸殘基。熟悉此技藝的專業人士可選擇化學上相似的胺基酸對預測的重要胺基酸殘基進行取代。

熟悉此技藝的專業人士亦可分析相似多胜肽結構的三維結構及胺基酸序列。基於該資料，熟悉此技藝的專業人士可依據其胺基酸殘基之校整預測抗體之三維結構。在某些具體實施例中，熟悉此技藝的專業人士可以不激烈的改變經預測為蛋白質表面之胺基酸殘基，因為該殘基可能涉及與其它分子之重要的交互作用。此外，熟悉此技藝的專業人士可產生測試性變種，其中在各要求的胺基酸殘基上內含單一的胺基酸取代。然後變種可使用熟悉此技藝的專業人士習知的活性測定方法進行篩選。從該變種中可取得適當的變種資料。例如，若發現改變特定的胺基酸殘基結

(18)

果會降低或造成不適當的活性，則應避免該改變之變種。換言之，基於該例行的實驗程序取得之資料，熟悉此技藝的專業人士可立即決定單獨或結合其它突變之進一步取代應避免的胺基酸。

許多科學文獻已可預報二級結構。參閱 Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427(1996), Chou et al., *Biochemistry*, 13(2):222-245(1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113(2):211-222(1974); Chou et al., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148(1978); Chou et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 以及 Chou et al., *Biophys. J.*, 26:367-384(1979)。此外，目前之計算機程式可輔助預測二級結構。預測二級結構之方法是基於同源現象模型化。例如，二種多胜肽或蛋白質 其帶有之序列相似性大於30%，或相似性大於40%經常會有相似的拓撲學構造。最近不斷擴大的蛋白質構造資料庫(PDB)可增強二級結構之預測能力，包括多肽或蛋白質的結構內可能產生的折疊數目。參閱 Holm et al., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247(1999)。據建議(Brenner et al., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376(1997))多肽或蛋白質中只有限數目之折疊，一旦解析關鍵性的構造數目，構造的預報將會更精確。

預測二級結構的額外方法，包括"threading"(Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87(1997); Sippl et al., *Structure*, 4(1):15-19(1996))、"profile

(19)

analysis"(Bowie et al., *Science*, 253:164-170(1991);
Gribskov et al., *Meth. Enzym.*, 183:146-159(1990);
Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*,
84(13):4355-4358(1987))、及 "evolutionary linkage"(參見
Holm, *supra*(1999), and Brenner, *supra*(1997))。

在某些具體實施例中，抗體變種包括糖基化作用變種，相較於母體多肽的胺基酸序列，其糖基化作用位點之數目及/或類型已改變。在某些具體實施例中，蛋白質變種比天然蛋白質包含較多或較少數目之 N-聯結的糖基化作用位點。N-聯結的糖基化作用位點之特徵在於：Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 序列，其中胺基酸殘基 X 可為脯胺酸之外的任何胺基酸殘基。創造此序列之胺基酸殘基取代可提供加入 N-聯結的碳水化合物鏈可能的新位點。此外，排除此序列之取代，將移除原本存在的 N-聯結的碳水化合物鏈。移除一個或多個 N-聯結的糖基化作用位點(天然的位點)並創造一個或多個新的 N-聯結位點，亦可重排排列 N-聯結的碳水化合物鏈。較佳的抗體變種包括半胱胺酸變種，當相較於母體的胺基酸序列，其中刪除一個或多個半胱胺酸殘基或經另一胺基酸(例如絲胺酸)取代。半胱胺酸變種必須在重新折疊成生物活性的構像後(例如分離自不溶的包涵體之後)才可為適用的抗體。半胱胺酸變種，一般而言其半胱胺酸殘基比天然的蛋白質少，一般有偶數之數目以使起因於不成對半胱胺酸的交互作用減到最少。

(20)

依據某些具體實施例，胺基酸之取代可：(1)降低蛋白質水解之敏感性、(2)降低氧化反應之敏感性、(3)改變形成蛋白質複合物之結合親和力、(4)改變結合親和力、及/或(4)賦予或修飾該多肽其它物理化學的或功能上的性質。依據某些具體實施例，天然序列(在某些具體實施例中，為形成分子間接觸結構區以外之多肽部份)可進行單一的或多重胺基酸取代(在某些具體實施例中，為保留性胺基酸取代)。在某些具體實施例中，保留性胺基酸取代一般不會在實質上改變母體序列的構造特性(例如，代替的胺基酸不會打斷母體序列的螺旋，或破壞其它母體序列特有的二級結構類型。多肽二級及三級結構之確認技藝的實施例描述於 *Proteins, Structures and Molecular Principles*(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984)); *Introduction to Protein Structure*(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y.(1991));及 Thornton et al. *Nature* 354:105(1991)，全文在此併入參考文獻。

本文之術語"多肽斷片"意指缺少胺基端及/或羧基端的多肽。在某些具體實施例中，斷片至少有5至467個胺基酸長。在某些具體實施例中，斷片至少有5、6、8、10、14、20、50、70、100、150、200、250、300、350、400、或450個胺基酸長。

通常用於藥物工業之肽類似物為具有模版肽類似性質之非肽藥物。此類型之非肽化合物稱為"模仿肽"或"擬肽"

(21)

◦ Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29(1986); Veber and Freidinger *TINS* p.392(1985); 及 Evans et al. *J. Med. Chem.* 30:1229(1987), 全文在此併入參考文獻。該化合物經常借助於電腦化分子模式化進行發展。結構上相似的於治療上適用肽類的模仿肽可用以產生相似的治療或預防性的效應。一般而言, 擬肽與範例多肽(即, 具有生化性質或醫藥活性之多肽), 例如人類抗體, 在結構上具有相似的, 但有一個或多個肽鍵合可視需要的用技藝上已知的方法經一種聯結取代, 取代的聯結係選自:

: --CH₂NH--、--CH₂S--、--CH₂-CH₂--、--CH=CH-(順及反式)、--COCH₂--、--CH(OH)CH₂--、以及--CH₂SO-。在某些具體實施例中可使用一個或多個保留性序列之胺基酸, 系統性的經相同類型之 D-胺基酸取代(例如, D-離胺酸代替 L-離胺酸)以產生更穩定的肽類。此外, 可用技藝上已知的方法產生包含保留性序列或實質上與保留性序列變異相同之限制性肽類(Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387(1992), 全文在此併入參考文獻); 例如, 加入內部的半胱胺酸殘基形成分子內雙硫橋以使肽環代。

"抗體"或"抗體肽"意指完整的抗體, 或可與完整的抗體進行專一性結合競爭之結合斷片。在某些具體實施例中, 結合斷片可經重組 DNA 技藝製作。在某些具體實施例中, 結合斷片可經酵素的或化學的方法切除完整的抗體而加以製作。結合斷片包括(但非限於): Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、以及單鏈抗體。

(22)

本文之術語"重鏈"包括任何具有充分的變異區序列以賦予 OPGL 專一性之多肽。本文之術語"輕鏈"包括任何具有充分的變異區序列以賦予 OPGL 專一性之多肽。全長之重鏈包括：變異結構區、V_H、以及三個恆定區結構區、C_{H1}、C_{H2}、以及 C_{H3}。V_H 結構區位於多肽之胺基端，以及 C_{H3}結構區位於羧基端。本文之術語"重鏈"包含全長之重鏈以及其斷片。全長之輕鏈包括變異結構區、V_L、及一個恆定區結構區 C_L。與重鏈相同，輕鏈之變異結構區始於多肽之胺基端。本文之術語"輕鏈"包含全長之輕鏈以及其斷片。Fab 斷片包含一個輕鏈以及一個重鏈之 C_{H1}及變異區。Fab 分子之重鏈不能與另一重鏈分子形成二硫化物鍵結。Fab'斷片含有一個輕鏈及一個重鏈，該重鏈在 C_{H1}以及 C_{H2}結構區之間含有更多的恆定區，因此在二個重鏈之間可經鏈間的二硫化物鍵結以形成 F(ab')₂分子。F_v 區域包含重鏈以及輕鏈之變異區，但缺少恆定區。單鏈抗體為 F_v 分子，其中重鏈及輕鏈變異區係經彈性的連結子連接形成單一的多胜鍵，其可形成抗原結合區域。單鏈抗體詳細地討論於 WO 88/01649及美國專利第 4,946,778以及 5,260,203號。

除了"多重專一性"或"多功能的"抗體之外，在某些具體實施例中，雙價抗體一般具有相同的結合部位。

實質上可抑制配位體與受體黏連之抗體，在當抗體過量時可降低受體結合的反受體的量至少約 20%、40%、60%、80%、85%、或更多(經活體外競爭性的結合測定加

(23)

以測量)。

本文之術語"抗原決定部位"包括任何能專一性的結合免疫球蛋白或 T-細胞受體之多肽決定子。在某些具體實施例中，抗原決定部位決定子包括化學活性的表面基團分子，例如：胺基酸、糖側鏈、磷醯基、或磺醯基，以及在某些具體實施例中，可帶有特定的三度空間構造的特性，及/或比電荷特性。抗原決定部位是抗原與抗體結合的區域。在某些具體實施例中，當抗體在蛋白質及/或大分子複合混合物中確認其目標抗原後，即可說抗體專一性地與抗原結合。在某些具體實施例中，當離解常數 < 1 微莫耳濃度時，即可說抗體專一性地與抗原結合，在某些具體實施例中，當離解常數 < 100 毫微莫耳濃度，以及在某些具體實施例中，當離解常數 < 1 毫微莫耳濃度時，即可說抗體專一性地與抗原結合。

本文之術語"藥劑"是一種化學化合物，化學化合物之混合物、生物性的大分子、或產自生物材料的萃取物。

本文之術語"標記"或"標記的"意指併入可偵測的標識，例如併入放射性標記之胺基酸或可用標記的卵白素(例如，內含螢光標識之抗生蛋白鏈菌素或可用光學或比色法的方法偵測之酵素活性)偵測之附著至多肽的生物素部份。在某些具體實施例中，標記或標識物亦可用於治療。多胜肽及醣蛋白之各種標記方法為已知的技藝。標記多胜肽之實施例包括(但非限於)：放射性同位素或放射性核素(例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、

(24)

1311)、螢光標記(例如, FITC、若丹明、鐳系元素磷光劑)、酵素的標記(例如, 辣根過氧化酶、 β -半乳糖苷酶、虫螢光素酶、鹼性磷酸酶)、化學冷光、生物素基團、經二級報導者(例如, 白胺酸拉鍊對序列、二級抗體之結合部位、金屬結合結構區、抗原決定部位標記)確認之預定的多肽抗原決定部位。在某些具體實施例中, 標記上附著各種長度的間隔臂以降低可能產生的位阻。

本文之術語"生物樣品"包括(但並非限於)任何來自生物(或前生物)的物質。該生物包括(但非限於): 人類、老鼠、猴子、老鼠、兔子、及其它動物。該物質包括(但非限於): 血液、血清、尿液、細胞、器官、組織、骨、骨髓、淋巴結、及皮膚。

本文之術語"骨質病症"包括(但並非限於): 骨質疏鬆症、骨質減少、變形性骨炎、溶解性骨腫瘤移轉、牙周炎、類風濕性關節炎、及由於不動造成之骨骼流失。除了此類骨病症之外, 已知某些癌症可增加破骨細胞活性及誘發骨質重吸收, 例如: 乳房、前列腺、及多發性骨髓瘤。目前習知此類癌症可產生導致骨中 OPGL 過度表現之因子, 以及導致破骨細胞數目及活性增加。

本文之術語"醫藥學藥劑或藥物"意指投用至病患能誘發所要求的治療效果之適當的化學化合物或組成物。

本文之術語"調節劑"意指改變或改變分子活性或功能之化合物。例如, 相較於缺少調節劑時觀察到的活性或功能的大小, 調節劑可增加或降低某些分子之活性或功能的

(25)

大小。在某些具體實施例中，調節劑是抑制劑，其可減低至少一個活性或功能分子之含量。某些分子典型的活性以及功能包括(但非限於)：結合親和力、酵素的活性、及訊息傳遞。某些典型的抑制劑包括(但非限於)：蛋白質、肽類、抗體、肽體、碳水化合物或小有機分子。肽體則描述於例如 W001/83525。

本文之"相當純"係指目標物種為存在的主要物種(即以莫耳濃度為計在組成物中其含量比任何其它個別物種都更豐富)。在某些具體實施例中，相當純的溶析份是組成物中目標物種包含至少約所有存在的所有大分子物種中的50%(以莫耳濃度為計)。在某些具體實施例中，相當純組成物將包含存在於組成物中大於約80%、85%、90%、95%、或99%之巨莫耳濃度物種。在某些具體實施例中，目標物種被純化至本質上的均一性(組成物中之污染物種無法用習見的偵測方法加以偵測)，本質上組成物由單一的大分子物種組成。

本文之術語病患包括人類及動物病患。

本申請案中，使用之單數形式，除非特別說明，包括複數形式。本申請案中除非特別說明"或"係指"及/或"。此外，本文之術語"包括"，以及其它形式，例如"包括"以及"包括"亦未加限制。同時，除非特別說明，術語例如單數之"元件"或"成份"包括包含一個單元之元件及成份，複數之元件以及成份包含一個以上之次單體。

護骨素配位體(OPGL)，是涉及破骨細胞形成的細胞

(26)

激動素中腫瘤壞死因子 (TNF) 家族的成員。增加破骨細胞活性與許多骨質病症相關，包括後-更年期的骨質疏鬆症、變形性骨炎、溶解性骨腫瘤移轉、及類風濕性關節炎。因此，降低 OPGL 活性可降低破骨細胞活性並可降低骨質病症之嚴重性。依據某些本發明之具體實施例，直接對抗 OPGL 的抗體可用於治療骨質病症，包括(但非限於)上述的骨質病症。

在本發明某些具體實施例中，提供對抗人類護骨素配位體 (OPGL) 完整的人類單株抗體。在某些具體實施例中，提供編碼包含免疫球蛋白分子重鏈及輕鏈，尤其是對應至變異區序列之核苷酸序列，以及胺基酸序列。在某些具體實施例中，提供對應至互補性決定區域 (CDR's)，特別是 CDR1 至 CDR3，之序列。依據某些具體實施例中，亦提供表現該免疫球蛋白分子以及單株抗體之融合瘤細胞株。在某些具體實施例中，提供對抗人類 OPGL 之純化的人類單株抗體。

能將巨大鹼基之人類基因座選殖及再建築進入人造酵母菌染色體 (YACs) 並將彼引進老鼠之種系，可對非常大的或粗略圖示的基因座之功能性成份加以說明，並可產生用於人類疾病的模式。此外，利用該技藝以人類的基因座取代老鼠的基因座可了解於發生期間人類基因產物之表現以及調節，彼與其它系統之聯絡、及彼在疾病誘發及進展上所扮演之角色。

該策略在實行上重要的之用途是 "人類化" 老鼠體液的

(27)

免疫系統。將人類免疫球蛋白(Ig)基因座引入內生性 Ig 基因已去活化的老鼠，以研究構成程式化表現及抗體組裝，與彼在 B-細胞發生上所伴演之角色等機制的基礎。此外，該策略可提供產生完整人類單株抗體(MAbs)的來源。在某些具體實施例中，完整的人類抗體預期可使老鼠內在的或老鼠-衍生的 Mabs 產生免疫的及過敏性的反應減到最少，因此，在某些具體實施例中，可增加投用抗體之功效以及安全性。在某些具體實施例中，完整的人類抗體可用於治療包含重覆抗體投藥之慢性及重覆發生的人類疾病，例如：骨質疏鬆症、發炎、自體免疫性、及癌症。

目前可將缺乏抗體產生之老鼠品系殖入人類 Ig 基因座大的斷片並使該老鼠在沒有老鼠抗體的情況下產生人類抗體。大的人類 Ig 斷片可保存大量可變的基因之多樣性，與抗體產生及表現之適當的調節。經由探討老鼠抗體之多樣化及選擇以及缺少對人類蛋白質之免疫耐受性等機構，此類老鼠品系中複製的人類抗體庫可產生高親和性抗體對抗任何重要的抗原(包括人類抗原)。使用融合瘤技藝，可製作及選擇具有特定抗原專一性的人類 MAbs。

在某些具體實施例中，在人類變異區之後可使用非人類的恆定區。

天然抗體結構

天然抗體構造單位通常包含一個四合體。該四合體一般由兩對相同的多勝鍵組成，一對為全長的"輕"鍵(在某

(28)

些具體實施例中，約 25 kDa)，另一對全長的"重"鏈(在某些具體實施例中，約 50-70 kDa)。各鏈的胺基端部份包括約 100 至 110 或更多個胺基酸之變異區，其可辨視抗原。各鏈的羧基端部份為恆定區，其具有致效劑功能。人類輕鏈一般可分成 κ 以及 λ 輕鏈。重鏈一般可分成 μ 、 δ 、 γ 、 α 、或 ϵ ，並分別將抗體之同功型定義成免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 D、免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 A、及免疫球蛋白 E。免疫球蛋白 G 有許多次群，包括(但非限於)：IgG1、IgG2、IgG3、以及 IgG4。免疫球蛋白 M 之次群包括(但非限於)：免疫球蛋白 M1 以及免疫球蛋白 M2。免疫球蛋白 A 同樣地可細分成次群，包括(但非限於)：免疫球蛋白 A1 以及免疫球蛋白 A2。全長的輕鏈及重鏈內，可變及恆定區用大約 12 個或更多個胺基酸之"J"區域相聯，重鏈亦包括約多 10 個胺基酸之"D"區域。參閱例如，*Fundamental Immunology Ch.7*(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))(全文在此并入參考文獻)。各輕/重鏈對之變異區可形成抗原結合部位。

變異區所展現之一般結構如同聯結著三個高變異區之相對守恆架構區域(FR)相同，亦稱為互補性決定區域或 CDR。各對來自二個鏈的 CDR 可經架構區域校準，其可結合於專一性抗原決定部位。從 N-端至 C-端，此輕及重鏈變異區一般包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 以及 FR4 結構區。各結構區指派之胺基酸一般係依據 *Kabat Sequences of Proteins of Immunological*

(29)

Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987及1991))、或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987); Chothia et al. Nature 342:878-883(1989)之定義。

雙專一性的或雙功能抗體

雙專一性的或雙功能抗體是人造的雜化抗體，其具有二種不同的重鏈/輕鏈對，及二種不同的結合部位。雙專一性的抗體可用各種方法製作。

製備抗體

依據某些具體實施例，本發明包含某些專一性結合於 OPGL 的抗體。在某些具體實施例中，可藉由用全長 OPGL、可溶解形式之 OPGL、或其斷片免疫以製作該抗體。在某些具體實施例中，本發明抗體可為多株的或單株的、及/或可為重組抗體。在某些具體實施例中，本發明抗體是以(例如)對能產生人類抗體基因的轉殖動物進行免疫而製備成的人類抗體(參閱，例如，PCT 公佈的申請案第 WO93/12227號)。

在某些具體實施例中， α OPGL-1的輕鏈及重鏈變異區之互補性決定區域(CDRs)可接上同種、或另一物種之架構區域(FRs)。在某些具體實施例中， α OPGL-1的輕鏈及重鏈變異區之 CDRs 可接上一致的人類 FR。為了創造一致的人類 FR，在某些具體實施例中，校準來自數個人類重

(30)

鏈或輕鏈胺基酸序列之 FR 以確認一致的胺基酸序列。在某些具體實施例中，將 α OPGL-1 之重鏈或輕鏈的 FRs 用不同的重鏈或輕鏈之 FR 取代。在某些具體實施例中， α OPGL-1 之重鏈或輕鏈的 FR 中少見的胺基酸則不經取代，而其他之 FR 胺基酸則被取代。少見的胺基酸是指在 FR 之特定位置上通常不會出現的特定胺基酸。在某些具體實施例中，接上 α OPGL-1 變異區後可使用相異於 α OPGL-1 恆定區之恆定區。在某些具體實施例中，所接上的變異區是單鏈 Fv 抗體的一部份。CDR 之移植描述於例如美國專利第 6,180,370、5,693,762、5,693,761、5,585,089 及 5,530,101 號，全文在此并入參考文獻。

依據某些具體實施例，本發明抗體之製備方法係利用具有實質上插入人類抗體產生基因組部份、但缺乏產生內生性(鼠科動物)抗體之導入外來基因的老鼠。該老鼠能產生人類免疫球蛋白分子及抗體而不能產生鼠科動物免疫球蛋白分子及抗體。用以達成此結果之技藝已揭示於本文揭示之專利、申請案、及參考文獻。在某些具體實施例中，可使用之方法例如揭示於 PCT 公佈的申請案第 WO98/24893 號，全文在此并入參考文獻。亦可參閱 Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156(1997)，全文在此并入參考文獻。

依據某些具體實施例，具 OPGL 專一性的完整人類單株抗體其製作如下。將已導入內含人類免疫球蛋白基因之外來基因的老鼠用所要的抗原進行免疫。從表現抗體的老

(31)

鼠身上取得淋巴細胞(例如 B-細胞)。將該細胞與骨髓型細胞株融合以製備成不死的融合瘤細胞株，篩選該融合瘤細胞株並選擇確認對重要抗原產生專一性抗體的融合瘤細胞株。在某些具體實施例中，提供可對 OPGL 產生專一性抗體的融合瘤細胞株。

在某些具體實施例中，本發明抗體係由融合瘤細胞株 AMG6.1、AMG6.4、AMG6.5、AMG7.1、以及 AMG7.2 製作。在某些具體實施例中，本發明抗體係由融合瘤細胞株 AMG6.1、AMG6.4、以及 AMG6.5 製作。在某些具體實施例中，本發明抗體結合於 OPGL 之離解常數(kD)介於大約 0.23 以及 0.29 毫微莫耳濃度之間。在本發明某些具體實施例中，抗體結合於 OPGL 之 kD 少於 0.23 毫微莫耳濃度。

在某些具體實施例中，本發明抗體為 IgG2 同功型。在本發明某些具體實施例中，抗體包含人類 κ 輕鏈及人類 IgG2 重鏈。在某些具體實施例中，本發明抗體已選殖入哺乳動物的細胞進行表現。在某些具體實施例中，抗體變異區係連結 IgG2 同功型恆定區以外之恆定區。

在某些具體實施例中，對 α OPGL-1 之重鏈及輕鏈進行保留性修飾(以及編碼核苷酸對應的修飾)將可產生功能上及化學特性與 α OPGL-1 相似的 OPGL 抗體。相反的，將對於維持(a)取代區域分子骨幹結構(例如：薄板狀或螺旋狀的構像)、(b)目標位點之分子電價或拒水性、或(c)側鏈團塊之效應顯著不同的重鏈及輕鏈之胺基酸序列選擇性取代，可對 α OPGL-1 之功能及/或化學特性進行實質性修飾。

(32)

例如，"保留性胺基酸取代"可涉及將天然的胺基酸殘基用非天然的殘基取代而對該位置之胺基酸殘基的極性或電價不具效應。此外，多肽上任何天然的殘基亦可經丙胺酸取代，即先前已描述之"丙胺酸掃描誘變"。

所要的胺基酸取代(不論為保留性或非保留性)可經熟悉此技藝的專業人士在進行取代時決定。在某些具體實施例中，胺基酸取代可用以確認 α OPGL-1上的重要殘基，或增加或降低抗體對 OPGL 之親和力。

在某些具體實施例中，本發明抗體可用融合瘤細胞株以外的細胞株表現。在某些具體實施例中，編碼特定抗體的序列可轉形入適當的哺乳動物宿主細胞。依據某些具體實施例，轉形作用可用任何已知的方法將多核苷酸引入宿主細胞，包括(例如：)將多核苷酸包入病毒(或病毒性的載體)中並用病毒(或載體)轉導入宿主細胞，或經技藝上已知的轉染程序轉染入宿主細胞，例如美國專利第 4,399,216、4,912,040、4,740,461、及 4,959,455 號(全文在此併入參考文獻)。在某些具體實施例中，轉形步驟取決於轉形的宿主。將異性多核苷酸引入哺乳動物的細胞的方法為已知的技藝，包括(但非限於)：右旋聚醣-調節的轉染作用、磷酸鈣沉澱、聚本(polybrene)調節的轉染作用、原生質體融合、電穿透作用、封包多核苷酸之脂球體、及直接地顯微注射 DNA 進入細胞核。

可作為表現宿主之哺乳動物的細胞株為技藝上已知的細胞株，包括(但非限於)許多永生的細胞株，其可購自

(33)

American Type Culture Collection(ATCC)，包括(但非限於)：中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、HeLa 細胞、嬰兒倉鼠腎臟(BHK)細胞、猴子腎臟細胞(COS)、人類肝細胞的癌細胞(例如 Hep G2)、及許多其他細胞株。在某些具體實施例中，可選擇高表現量及產生具有組成性 OPGL 結合性質之抗體的細胞株。

依據某些具體實施例，本發明抗體可用於偵測生物樣品中的 OPGL。在某些具體實施例中，其能確認產生蛋白質之細胞或組織。在某些具體實施例中，結合於 OPGL 並阻塞與其它結合化合物交互作用之抗體具有調控破骨細胞分化及骨質重吸收之治療用途。在某些具體實施例中，OPGL 抗體可阻擾 OPGL 與 ODAR 結合，而阻擾訊息傳遞串聯反應並喪失經 NF- κ B 調節的轉錄活化。測量經 NF- κ B-調節的轉錄活化可使用，例如：虫螢光素酶報導測定法，其為熟悉此技藝的專業人士所熟知。

在某些具體實施例中，提供包含投用有效治療量 OPGL 抗體之治療骨病症的方法。在某些具體實施例中，提供包含投用有效治療量之 OPGL 抗體及另一治療劑以治療骨質病症的方法。在某些該具體實施例中，額外的投用有效治療量之治療劑。在某些具體實施例中，骨質病症之特徵在於骨骼淨流失，包括但非限於：骨質減少以及骨質溶解。在某些具體實施例中，用 OPGL 抗體治療係用以抑制骨質重吸收之速率。因此，在某些具體實施例中，當重吸收速率比正常高時，此治療可降低骨質重吸收之速率，

(34)

而當骨質形成低於正常值時，則可降低骨質重吸收以彌補。在某些具體實施例中，可在 OPG 存在或不存在下測試抗體與 OPGL 之結合並檢查其抑制 OPGL-調節的骨質形成及/或骨質重吸收之能力。

依據某些具體實施例可治療的症狀包括(但非限於)：

骨質疏鬆症，包括(但非限於)：原發性骨質疏鬆症、內分泌性骨質疏鬆症(包括，但非限於：甲狀腺機能亢進、副甲狀腺機能亢進、庫欣氏症、及肢端肥大症)、遺傳性及先天的骨質疏鬆症形式(包括，但非限於：成骨不全、高胱氨酸尿症、Menke 氏症候群、家族性自主神經機能異常)、及由於四肢不動造成之骨質疏鬆症；

成人及幼兒變形性骨炎(骨炎性變形)；

骨髓炎，即骨的感染性損害導致骨骼流失；

高鈣血症，包括(但非限於)：起因於固體腫瘤之高鈣血症(包括，但非限於：乳房、肺臟及腎臟)以及血癌(包括，但非限於：多發性骨髓瘤、淋巴癌及白血病)、原發的高鈣血症、及與甲狀腺機能亢進和腎功能病症相關的高鈣血症；

骨質減少，包括(但非限於)：外科手術後之骨質減少、因投用類固醇而誘發的骨質減少、相關於小腸及大腸病症之骨質減少、及相關於慢性肝臟及腎臟疾病之骨質減少；

骨壞死，即骨細胞死亡，包括(但非限於)：相關於創傷性損傷的骨壞死、相關於高雪氏病的骨壞死、相關於鐮

(35)

刀細胞貧血的骨壞死、相關於全身性紅斑狼瘡的骨壞死、相關於類風濕性關節炎的骨壞死、相關於牙週病的骨壞死、相關於溶骨的腫瘤移轉的骨壞死、及相關於其他疾病的骨壞死；以及相關於類風濕性關節炎的軟骨流失及關節腐蝕。

在某些具體實施例中、OPGL 抗體可單獨使用或與至少一個額外的治療劑共同使用以治療骨質病症。在某些具體實施例中，OPGL 抗體可合併使用有效治療量之額外治療劑。可與 OPGL 抗體共同投用的治療劑包括(但非限於)：骨形態發生因子，BMP-1至 BMP-12；轉形生長因子- β (TGF- β)以及 TGF- β 家族成員；第一型白細胞介素(IL-1)抑制劑，包括(但非限於)：IL-1ra 及其衍生物以及 KineretTM、anakinra；TNF α 抑制劑，包括(但非限於)：可溶解的 TNF α 受體、EnbrelTM、etanercept、抗-TNF α 抗體、RemicadeTM、infliximab、以及 D2E7抗體；副甲狀腺素及其類似物；與副甲狀腺相關的蛋白質及其類似物；E 系列之前列腺素；雙膦酸鹽(例如阿多那酸鹽(alendronate)以及其它)；提高骨質之礦物質，例如：氟化物及鈣；非類固醇的消炎藥物(NSAIDs)，包括(但非限於)：COX-2抑制劑，例如 CelebrexTM、celecoxib 以及 VioxxTM、rofecoxib；免疫抑制劑，例如：甲胺蝶呤或力夫諾賣(leflunomide)；絲胺酸蛋白酶抑制劑，包括(但非限於)：分泌型白血球蛋白酶抑制劑(SLPI)；IL-6抑制劑(包括，但非限於，IL-6 抗體)、IL-8抑制劑(包括，但非限於，IL-8 抗體)；IL-18

(36)

抑制劑(包括, 但非限於, IL-18結合蛋白質以及 IL-18抗體); 第一型白細胞介素轉換酵素(ICE)調節劑; 纖維母細胞生長因子 FGF-1至 FGF-10以及 FGF 調節劑; PAF拮抗劑; 角質細胞生長因子(KGF)、KGF-相關的分子、及 KGF調節劑; 基質金屬蛋白酶(MMP)調節劑; 一氧化氮合成酶(NOS)調節劑, 包括(但非限於)可誘發 NOS 的調節劑; 糖皮質激素受體調節劑; 麩胺酸鹽受體調節劑; 脂多糖(LPS)含量之調節劑; 以及去甲腎上腺素以及調節劑以及其模仿劑。

在某些具體實施例中, OPGL 抗體可與治療各種發炎症、自體免疫症狀、或其他與骨骼流失疾病的治療劑共同使用。在某些具體實施例中, 基於症狀及所要求的之治療水準, 可投用二種、三種或多種藥劑。在某些具體實施例中, 此藥劑可為相同調配物內之共同內含物。在某些具體實施例中, 此藥劑以及 OPGL 抗體可為同一調配物內之共同內含物。在某些具體實施例中, 此藥劑可為治療組套內之共同內含物。在某些具體實施例中, 此藥劑及 OPGL 抗體可為治療組套內之共同內含物。在某些具體實施例中, 此藥劑可分別提供。在某些具體實施例中, 在進行基因療法時, 編碼蛋白質藥劑及/或 OPGL 抗體之基因可包括在相同載體內。在某些具體實施例中, 編碼蛋白質藥劑及/或 OPGL 抗體的基因可用相同啓動子區域控制。在某些具體實施例中, 編碼蛋白質藥劑及/或 OPGL 抗體基因可位於不同的載體。

(37)

在某些具體實施例中，本發明係關於包含 OPGL 抗體以及至少一個第一型白細胞介素 (IL-1) 抑制劑之療法，以及使用該療法之治療方法。在某些具體實施例中，描述包含 OPG 抗體及 IL-1 抑制劑以及至少一個其它分子的治療。在某些具體實施例中，使用 IL-1 抑制劑及 / 或 TNF- α 抑制劑合併 OPGL 抗體之治療方法。在某些具體實施例中，可使用 OPGL 抗體結合 IL-1 抑制劑及 / 或 TNF- α 抑制劑治療症狀，例如：氣喘、類風濕性關節炎、及多發性硬化。

第一型白細胞介素 (IL-1) 是消炎性細胞激動素。在某些實例中，IL-1 為許多疾病及醫學症狀的中介物。在某些實例中，IL-1 由巨噬細胞 / 單核白血球細胞株製作。在某些實例中，IL-1 有二種形式：IL-1 α (IL-1 α) 以及 IL-1 β (IL-1 β)。

若自發性或實驗性疾病或醫學症狀係與體液或組織中 IL-1 含量升高相關及 / 或若身體細胞或組織在培養時 IL-1 的含量升高，即視其為 "經第一型白細胞介素調節的疾病" 之疾病或醫學症狀。在某些具體實施例中，該經第一型白細胞介素調節的疾病亦可由以下另外的二種症狀確認：(1) 在對動物投用 IL-1 或向上調節 IL-1 表現之模擬實驗中可發現與疾病或醫學症狀相關的病理現象及 / 或 (2) 在病理誘發的實驗動物模式中投用抑制 IL-1 作用之藥劑可抑制或終止疾病或醫學症狀。在某些具體實施例中，IL-1-調節的疾病有一種或多種上述之症狀。在某些具體實施例中，IL-1-調節的疾病有所有種症狀。

(38)

急性以及慢性經第一型白細胞介素(IL-1)-調節的疾病包括(但非限於)：急性胰腺炎；側索硬化性肌肉萎縮症(ALS，或 Lou Gehrig's 疾病)；阿茲海默氏症；惡病質/神經性厭食症，包括(但非限於)：因愛滋病-誘發的惡病質；氣喘以及其它肺部的疾病；動脈粥樣硬化；自體免疫脈管炎；慢性疲勞症候群；與梭菌屬相關的疾病，包括(但非限於)：與梭菌屬相關的腹瀉；冠狀動脈症狀以及適應症，包括(但非限於)：充血性心臟衰竭、冠狀動脈再狹窄症、心肌梗塞、心肌官能障礙(例如相關的敗毒病)、及冠狀動脈繞道移植；癌症，包括(但非限於)白血病，包括(但非限於)：多發性骨髓瘤白血病以及起自骨髓的骨髓瘤(例如：AML 以及 CIVIL)、及腫瘤移轉；糖尿病(包括，但非限於，胰島素-依存的糖尿病)；子宮內膜異位；發燒；纖維肌風濕病；腎小球性腎炎；移植之宿主疾病及/或移植排斥；出血性休克；痛覺過敏；發炎性腸道疾病；關節發炎病症，包括(但非限於)：骨關節炎、牛皮癬的關節炎、及類風濕性關節炎；發炎性眼睛疾病，包括(但非限於)與例如與角膜移植相關的疾病；局部缺血，包括(但非限於)：大腦局部缺血(包括，但非限於，腦損傷之結果，例如：創傷、癲癇、出血或中風、各可導致神經變性)；Kawasaki 氏疾病；學習受損；肺臟疾病(包括，但非限於，急性呼吸窘迫徵候群、或 ARDS)；多發性硬化；肌肉病(例如肌肉蛋白代謝病，包括(但非限於)敗毒病之肌肉蛋白代謝病)；神經毒性(包括，但非限於，人類免疫不全病

(39)

毒誘發的症狀)；骨質疏鬆症；疼痛，包括(但非限於)癌症相關的疼痛；帕金森氏病；牙週病；早產；牛皮癬；再灌注損傷；敗血性休克；輻射線治療之副作用；顱骨性頷骨的關節疾病；睡眠擾動；葡萄膜炎；以及起因於例如：拉傷、扭傷、軟骨損害、創傷、整形外科、感染、其它疾病之發炎性症狀。

在某些具體實施例中，IL-1抑制劑可為能特別預防細胞受體經IL-1活化(其可起因於任何機制)之任何蛋白質或分子。典型的機制包括(但非限於)：向下調控IL-1產生、結合自由之IL-1、干擾IL-1結合至其受體、干擾IL-1受體複合體之形成(即IL-1受體與IL-1受體附件蛋白質相聯)、及於結合至受體之後干擾IL-1的信號調控。

某些第一型白細胞介素抑制劑包括(但非限於)：IL-1受體拮抗劑，包括(但非限於)：KineretTM、anakinra、IL-1ra、IL-1ra變種、及IL-1ra衍生物，其通稱為"IL-1ra蛋白質；"抗-IL-1受體單株抗體(參閱例如EP 623674，全文在此并入參考文獻)；IL-1結合蛋白質，包括(但非限於)：可溶解的IL-1受體(參閱例如，美國專利第5,492,888號、美國專利第5,488,032號、及美國專利第5,464,937號、美國專利第5,319,071號、及美國專利第5,180,812號，全文在此并入參考文獻)；抗-IL-1單株抗體(參閱例如：WO9501997、WO9402627、WO9006371、美國專利第4,935,343號、EP364778、EP267611以及EP220063，全文在此并入參考文獻)；IL-1受體附件蛋白質以及其抗體(參

(40)

閱例如，WO96/23067以及WO99/37773，全文在此并入參考文獻)；第一型白細胞介素 β 轉換酵素(ICE)或卡斯酶(caspase)I抑制劑(參閱例如，WO99/46248、WO99/47545、及WO99/47154，全文在此并入參考文獻)，其可用以抑制IL-1 β 產生以及分泌；第一型白細胞介素 β 蛋白酶抑制劑；以及其它阻塞活體內合成或細胞外釋放IL-1之化合物以及蛋白質。

典型的IL-1抑制劑揭示於例如：美國專利第5,747,444；5,359,032；5,608,035；5,843,905；5,359,032；5,866,576；5,869,660；5,869,315；5,872,095；5,955,480；5,965,564號；國際(WO)專利申請案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；歐洲(EP)專利申請案534978以及894795；以及法國專利申請案FR2762514。所有揭示全文在此并入參考文獻。

第一型白細胞介素受體拮抗劑(IL-1ra)是人類蛋白質，其為第一型白細胞介素的天然抑制劑且為IL-1家族之一員，其係包括IL-1 α 及IL-1 β 。某些受體拮抗劑，包括IL-1ra以及其變種及衍生物，以及製作與使用彼之方法已描述於美國專利第5,075,222號；WO91/08285；WO91/17184；AU9173636；WO92/16221；WO93/21946；WO94/06457；WO94/21275；FR2706772；WO94/21235；

(41)

DE4219626, WO94/20517 ; WO96/22793 ; WO97/28828 ; 以及 WO99/36541 , 全文在此併入參考文獻。在某些具體實施例中 , IL-1受體拮抗劑可糖基化。在某些具體實施例中 , IL-1受體拮抗劑可為非糖基化。

美國專利第 5,075,222 ('222 專利) 號描述三種形式之 IL-1ra 及其變種。在 '222 專利中 , 第一種形式稱為 "IL-1i" , 其特徵在於 SIDS-PAGE 下 22-23kD 之分子 , 等電點接近 4.8 , 在 52 毫莫耳濃度 NaCl 之三羥甲基胺基甲烷緩衝液 , 酸鹼度 7.6 下溶析自 Mono Q FPLC 管柱。第二種形式 , IL-1ra β , 其特徵為 22-23kD 之蛋白質 , 在 48 毫莫耳濃度 NaCl 下溶析自 Mono Q 管柱。IL-1ra α 以及 IL-1ra β 均為糖基化。第三種形式 , IL-1rax , 其特徵為 20 kD 之蛋白質 , 在 48 毫莫耳濃度 NaCl 下溶析自 Mono Q 管柱並為非糖基化。'222 專利亦描述某些分離編碼抑制劑基因、選殖基因入適當的載體 , 轉形及轉染基因入某些細胞型態、及表現基因產生抑制劑之方法。

在某些具體實施例中 , 可在 IL-1ra 之胺基酸序列內進行刪除、插入、及 / 或取代 (個別地或統稱為 " 變種 ") 。在某些具體實施例中 , IL-1ra 變種具有生物活性 (例如具有抑制 IL-1 之能力) 。

在某些具體實施例中 , 本發明係關於包含 OPGL 抗體及至少一個 TNF α 抑制劑之療法 , 以及使用該療法治療之方法。在某些具體實施例中 , 包含 OPG 抗體以及 TNF α 抑制劑以及至少一個在此描述的額外分子進行治療。

(42)

經 TNF 調節的某些疾病及醫學病症可列入發炎病症的範疇。本文中"經 TNF-調節的疾病"包括(但並非限制於)：相關於體液或組織中 TNF 之含量升高及/或來自身體之細胞或組織在培養中 TNF 之含量升高的疾病或醫學症狀。在某些具體實施例中，若(1)在對動物投用或向上調節 TNF 表現之模仿實驗中可發現與疾病或醫學症狀相關的病理現象及/或(2)在病理誘發的實驗動物模式中投用抑制 TNF 作用之藥劑可抑制或終止疾病或醫學症狀，則該疾病是經 TNF-調節的疾病。

某些經 TNF-調節的急性以及慢性疾病，包括(但非限於)：惡病質以及神經性厭食症；癌症，包括(但非限於)：白血病；慢性疲勞症候群；冠狀動脈症狀及/或適應症，包括(但非限於)：充血性心臟衰竭、冠狀動脈再狹窄症、心肌梗塞、心肌的官能障礙(包括，但非限於，與敗毒病相關的症狀)、及冠狀動脈繞道移植；沮喪；糖尿病，包括(但非限於)：幼年型開始作用之第1型糖尿病、糖尿病、及胰島素抗性(包括，但非限於，與肥胖相關的胰島素抗性)；子宮內膜異位、子宮內膜炎、及相關的症狀；纖維肌風濕病以及痛覺缺失；移植物/宿主排斥；痛覺過敏；發炎性腸道疾病，包括(但非限於)：局部性迴腸炎以及與相關梭桿菌的難治腹瀉；局部缺血，包括(但非限於)：大腦局部缺血，包括(但非限於)：創傷造成之腦損傷、癲癇、出血、及/或中風；肺臟疾病，包括(但非限於)：成年人呼吸窘迫徵候群、氣喘、及肺部的纖維變性；多發性

(43)

硬化；神經發炎性的疾病；眼睛的疾病以及症狀，包括(但非限於)：角膜移植、眼睛退化及葡萄膜炎；疼痛，包括(但非限於)：與癌症相關的疼痛；胰腺炎；牙週病；蛇皮癬(PRP)；前列腺炎，包括細菌以及非細菌性前列腺炎、及相關症狀；牛皮癬及相關症狀；肺部纖維變性；再灌注損傷；風濕疾病，包括(但非限於)：類風濕性關節炎、骨關節炎、幼年型關節炎(包括(但非限於)：幼年類風濕性關節炎)、血清陰性的多發性關節炎、類風濕性脊椎炎、賴特爾綜合症以及反應性的關節炎、Still 氏疾病、牛皮癬性關節炎、小腸病性關節炎、多肌炎、皮膚肌炎、硬皮病、全身硬化、脈管炎(例如、Kawasaki 氏疾病)、大腦的脈管炎、萊姆關節炎、葡萄球菌誘發的("敗血症的")關節炎、Sjogren 氏症候群、風濕熱、多軟骨炎以及風濕性多肌痛以及巨細胞動脈炎)；敗血性休克；輻射線治療之副作用；全身性紅斑狼瘡(SLE)；顛骨頷骨的關節疾病；甲狀腺炎；以及組織移植及/或例如起因於拉傷、扭傷、軟骨損害、創傷、整形外科、感染(例如，人類免疫不全病毒、難治梭桿菌以及相關的物種)或其它疾病過程的發炎性症狀。

在某些具體實施例中，TNF 抑制劑至少可向下調控或抑制 TNF 產生、結合自由之 TNF、干擾 TNF 結合於其受體、及於結合至其受體之後干擾 TNF 信號之調控。本文之術語"TNF 抑制劑"，包括(但非限於)：溶解的 TNF 受體，包括(但非限於)：可溶解的腫瘤壞死因子受體型

(44)

I(sTNF-RI；亦稱為 p55受體)、可溶解的腫瘤壞死因子受體型 II(亦稱為 p75受體)、及 Enbrel™、etanercept；TNF 抗體，包括(但非限於)：Remicade™、infliximab 及 D2E7(參閱例如，美國專利第 6,090,382 及 6,258,562 號)；TNF 受體抗體；sTNF-RI(參閱例如，WO 98/24463)、etanercept、Enbrel™、Avakine™；TNF- α 轉換酵素(TACE)抑制劑；及其它影響 TNF 活性之分子。

典型的 TNF- α 抑制劑描述於例如，歐洲專利申請案 EP 308378；EP 422 339；EP 393 438；EP 398327；EP 412 486；EP 418014, EP 417 563, EP 433 900；EP 464 533；EP 512 528；EP 526 905；EP 568928；EP 607 776，其係描述使用力夫諾賣(leflunomide)抑制 TNF- α ；EP 663 210；EP 542 795；EP 818439；EP 664 128；EP 542 795；EP 741 707；EP 874 819；EP 882 714；EP 880 970；EP 648783；EP 731 791；EP 895 988；EP 550 376；EP 882 714；EP 853 083；EP 550 376；EP 943 616；EP 939 121；EP 614 984；EP 853 083；美國專利第 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

(45)

； 5,955,480 ； 5,955,476 ； 5,955,435 ； 5,994,351 ；
5,990,119 ； 5,952,320 ； 5,962,481 號 ； 國際性的專利申請
案 WO 90/13575 、 WO 91/03553 、 WO 92/01002 、 WO
92/13095 、 WO 92/16221 、 WO 93/07863 、 WO 93/21946 、
WO 93/19777 、 WO 95/34326 、 WO 96/28546 、 WO
98/27298 、 WO 98/30541 、 WO 96/38150 、 WO 96/38150 、
WO 97/18207 、 WO 97/15561 、 WO 97/12902 、 WO
96/25861 、 WO 96/12735 、 WO 96/11209 、 WO 98/39326 、
WO 98/39316 、 WO 98/38859 、 WO 98/39315 、 WO
98/42659 、 WO 98/39329 、 WO 98/43959 、 WO 98/45268 、
WO 98/47863 、 WO 96/33172 、 WO 96/20926 、 WO
97/37974 、 WO 97/37973 、 WO 97/47599 、 WO 96/35711 、
WO 98/51665 、 WO 98/43946 、 WO 95/04045 、 WO
98/56377 、 WO 97/12244 、 WO99/00364 、 WO99/00363 、
WO 98/57936 、 WO99/01449 、 WO99/01139 、 WO 98/56788
、 WO 98/56756 、 WO 98/53842 、 WO 98/52948 、 WO
98/52937 、 WO99/02510 、 WO 97/43250 、 WO99/06410 、
WO99/06042 、 WO99/09022 、 WO99/08688 、 WO99/07679
、 WO99/09965 、 WO99/07704 、 WO99/06041 、
WO99/37818 、 WO99/37625 、 WO 97/11668 、 WO99/50238
、 WO99/47672 、 WO99/48491 ； 日本專利申請案 10147531
、 10231285 、 10259140, 以及 10130149 、 10316570 、
11001481 、 及 127,800/1991 ； 德國申請案第 19731521 號 ；
以及英國申請案第 2 218101 、 2 326 881 、 2 246 569 號 。

(46)

上述參考文獻的所有揭示全文在此并入參考文獻。

EP 393 438以及 EP 422 339描述可溶解的第 I 型 TNF 受體(亦為習知的 sTNFR-I 或 30kDaTNF 抑制劑)以及可溶解的第 II 型 TNF 受體(亦為習知的 sTNFR-II 或 40kDaTNF 抑制劑), 統稱為"sTNFRs"之胺基酸及核酸序列。EP 393 438以及 EP 422 339亦描述 sTNFR-I 以及 sTNFR-II 經修飾之形式, 包括(但非限於)斷片、功能性衍生物、及變種。此外, EP 393 438以及 EP 422 339描述分離編碼抑制劑基因、選殖基因入適當的載體、轉形或轉染基因進入某些細胞類型、及表現基因產生抑制劑之方法。

sTNFR-I 及 sTNFR-II 為神經生長因子/TNF 受體超級受體家族之成員, 該家族包括神經生長因子受體(NGF)、B 細胞抗原 CD40、4-1 BB、老鼠 T-細胞抗原 MRC OX40、fps 抗原、及 CD27以及 CD30抗原(Smith et al.(1990) Science,248: 1019-1023)。該細胞表面受體之守恆特色為富含半胱胺酸之細胞外的配位體結合結構區, 其可分成四個約 40個胺基酸在守恆位置含有 4-6個半胱胺酸殘基之重覆基元(motif)(Smith et al.(1990),supra)。

EP 393 438中教示一個 40kDaTNF 抑制劑 Δ 51以及 40kDa 之 TNF 抑制劑 Δ 53, 其為全長重組型 40kDaTNF 抑制劑蛋白質之縮短版。 Δ 51以及 Δ 53分別有 51或 53個胺基酸, 自成熟的蛋白質的羧基端進行刪除。

PCT 申請案第 WO 98/01555號已發表描述縮短形式的 sTNFR-I 以及 sTNFR-II, 其係不含有第四個結構區

(47)

(sTNFR-I 之胺基酸殘基 Thr¹²⁷-Asn¹⁶¹， sTNFR-II 之胺基酸殘基 Pro¹⁴¹-Thr¹⁷⁹)；部份之第三結構區 (sTNFR-I 之胺基酸殘基 Asn¹¹¹-Cys¹²⁶， sTNFR-II 之胺基酸殘基 Pro¹²³-Lys¹⁴⁰)；以及，可視需要不含有部份之第一結構區 (TNFR-I 之胺基酸殘基 Asp¹-Cys¹⁹， sTNFR-II 之胺基酸殘基 Leu¹-Cys³²)。在某些具體實施例中，縮短的 sTNFRs 包括由式 R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ 以及 R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅ 代表之蛋白質。此類蛋白質分別是 sTNFR-I 以及 sTNFR-II 的縮短形式。

本文中 "R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂" 代表一種或多種蛋白質，其中 [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] 是 sTNFR-I 上 19 至 103 之殘基，如 WO 98/01555 中圖 1 提供之序列；其中 R₁ 代表 Cys¹⁹ 之甲硫(丁)胺醯化或非甲硫(丁)胺醯化之胺基團或一種或多種胺基端的胺基酸殘基，其係選自 Cys¹⁸ 至 Asp¹；以及其中 R₂ 代表 Cys¹⁰³ 之羧基團或一種或多種羧基端之胺基酸殘基，其係選自 Phe¹⁰⁴ 至 Leu¹¹⁰。

本發明典型的縮短的 sTNFR-I 包括(但非限於)：sTNFR-I 2.6D/C105、sTNFR-I 2.6D/C106、sTNFR-I 2.6D/N105、sTNFR-I 2.3D/d8、sTNFR-I 2.3D/d18、sTNFR-I 2.3D/d15，可為甲硫(丁)胺醯化或非甲硫(丁)胺醯化、及其變種及衍生物。某些典型的縮短的 sTNFR-I 描述於例如，發表的 PCT 申請案第 WO 98/01555 號。

本文之 "R₃-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₄" 代表一種或多種蛋白質，其中 [Cys³²-Cys¹¹⁵] 是 sTNFR-II 上之殘基 Cys³² 至

(48)

Cys¹¹⁵，參見 WO 98/01555圖 8提供之序列；其中 R₃代表 Cys³²上甲硫(丁)胺醯化或非甲硫(丁)胺醯化之胺基團或一種或多種胺基端之胺基酸殘基，其係選自 Cys³¹至 Leu¹；以及其中 R₄代表 Cys¹¹⁵之羧基團或一種或多種羧基端上之胺基酸殘基，其係選自 Ala¹¹⁶至 Arg¹²²。

在某些具體實施例中，本發明係關於包含 OPGL 抗體以及至少一個絲胺酸蛋白酶抑制劑療法，以及使用該療法之治療方法。在某些具體實施例中，包含 OPG 抗體以及絲胺酸蛋白酶抑制劑以及至少一個本文描述之額外分子進行治療。

內生性蛋白質分解酵素可降解入侵的生物體、抗原抗體複合物、以及某些不再必須或適用的組織蛋白。感染劑中可引進額外的蛋白質分解酵素進入生物體。蛋白酶抑制劑可調控內生性及入侵性之蛋白質分解酵素。

在某些具體實施例中，天然蛋白酶抑制劑可經限制其反應的空間及時間，控制內生性蛋白酶。在某些具體實施例中，蛋白酶抑制劑可抑制蛋白酶經感染劑引入身體。在某些實例中，尤其是易受蛋白質水解攻擊及感染的組織中均富含蛋白酶抑制劑，包括(但非限於)：呼吸道。

蛋白酶抑制劑包含大約 10% 之人類血漿蛋白。至少八種抑制劑已分離自此一來源，其特徵可參見文獻。此類抑制劑包括(但非限於)：α₂-巨球蛋白(α₂M)、α₁-蛋白酶抑制劑(α₁P1)、α₁-抗胰凝乳蛋白酶(α₁Achy)、α₁-抗膠原酶(α₁AC)、以及介-α-胰蛋白酶抑制因子(I-α-I)。

(49)

在某些實例中，干擾蛋白酶/蛋白酶抑制劑之平衡可導致受到蛋白酶調節的組織之破壞，而發生包括(但非限於)：肺氣腫、關節炎、腎小球性腎炎、牙周炎、肌肉萎縮、腫瘤侵入、及各種其它病理的狀況。在某些情況下，例如嚴重的病理狀況，例如敗毒病或急性的白血病，由於從分泌的細胞釋放酵素，自由的蛋白質分解酵素之含量可增加。

此外，在某些實例中，生物體中縮小調節抑制劑容量亦可引起蛋白酶/蛋白酶抑制劑平衡之改變。該縮小調節抑制劑容量之非限制實施例是缺乏 α 1-蛋白酶抑制劑，其與肺部肺氣腫的發展相關。

在某些實例中，除非控制蛋白質分解酵素之含量，否則該異常的症狀會對生物體產生嚴重損害。因此，蛋白酶抑制劑可投用於生物體內以控制蛋白質分解酵素。

白血球彈性蛋白酶、胰蛋白酶、組織蛋白酶 G，以及胰臟的彈性蛋白酶為習知的絲胺酸蛋白酶群之蛋白酶的非限制性實施例。

在某些實例中，當白血球彈性蛋白酶釋出細胞外後，可降解結締組織及其它有用的蛋白質。而進行正常功能之生物體可降解某些量的結締組織以及其它蛋白質，存在過度量的白血球彈性蛋白酶可與各種病理狀態相關，包括(但非限於)：肺氣腫以及類風濕性關節炎。在某些具體實施例中，當白血球彈性蛋白酶之含量高於正常量時，可用專一的白血球彈性蛋白酶抑制劑阻礙白血球彈性蛋白酶之

(50)

效應。若該蛋白酶抑制劑能分離或製備成純化的形式並有充分的含量，即可具有醫藥學用途。

某些白血球彈性蛋白酶抑制劑描述於例如，

Schiessler et al., "Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteases in Human Mucous Secretions: Biochemistry and Possible Biological Function", in Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leucocytes, Havemann et al.(eds), Urban and Schwarzenberg, Inc.(1978)、以及 Travis and Salvesen, Ann. Rev. Biochem. 52: 655-709(1983)。

在某些實例中，胰蛋白酶可啟動某些柔軟器官組織(例如胰臟組織)於各種急性症狀(包括(但非限於): 胰腺炎)期間之降解。若可分離及製備胰蛋白酶抑制因子純化的形式並有充分的含量，則可適用於醫藥學上的用途。

組織蛋白酶 G 是另一種存在於白血球之蛋白酶。在某些具體實施例中，組織蛋白酶 G 能在活體外降解各種蛋白質，包括補體路徑之蛋白質。胰臟的彈性蛋白酶是在胰腺炎中伴演一個角色的另一種蛋白酶。因此，抑制劑此類蛋白酶亦有醫藥學的價值。

在某些具體實施例中，不同的絲胺酸蛋白酶抑制劑其受質專一性以及敏感度據相信僅係起因於少數胺基酸殘基之改變。經由類比，在絲胺酸蛋白酶抑制劑中改變較少的胺基酸將會產生不同的抑制蛋白酶。在某些具體實施例中，此家族之成員可抑制每一個絲胺酸蛋白酶。

(51)

典型的絲胺酸蛋白酶抑制劑是分泌型白血球蛋白酶抑制劑 (SLPI) 以及斷片及其類似物。典型的絲胺酸蛋白酶抑制劑亦包括 (但非限於) : 抗白蛋白酶 (ALP)、黏液蛋白酶抑制劑 (MPI)、人類精液抑制劑 -I (HUSH)、支氣管的黏液抑制劑 (BMI)、及子宮頸的黏液抑制劑 (CUSI)。在某些具體實施例中，絲胺酸蛋白酶抑制劑亦可為 LPS 調節劑。參閱例如，Jin et al. (1997), Cell 88(3) : 417-26。在某些具體實施例中，此類分子適用於造成骨骼流失之症狀，因為彼可優先直接的作用在軟骨。

典型的絲胺酸蛋白酶抑制劑描述於例如，美國專利第 4,760,130 號；美國專利第 5,900,400 號；以及美國專利第 5,633,227 號；全文在此併入參考文獻。揭示於前述參考文獻的分子與其任何變種或類似物統稱為 "絲胺酸蛋白酶抑制劑"。

IL-18 為前-發炎性的細胞激動素，可誘發干擾素- γ ，先前稱為干擾素 γ 誘導因子 (IGIF)。在某些實例中，IL-1 可向上調控 IL-18 之產生，IL-18 可誘發許多前發炎性的細胞激動素之產生，包括 IL-6 以及 MMP-1。參閱例如，Dinarello et al. (1998), J. Leukoc a Biol. 63: 658-64。在某些實例中，卡斯酶 (caspase) I 對 IL-18 之產生亦很重要。實驗亦顯示 TNF- α 可調控 IL-18 產生，同時抑制 TNF- α 以及 IL-18 可保護肝臟對抗肝臟毒性。參閱例如，Faggioni et al. (2000), PNAS 97:2367-72。

活體內 IL-18 之作用可能係透過 IL-1 之系統。IL-18 可

(52)

與細胞表面受體 (IL-18R) 交互作用，其可與附件蛋白質 (IL-18RAcP) 交互作用。IL-18-調節的信號，其進行時形成 IL-18、IL-18R、以及 IL-18RAcP 複合體。IL-18 天然的抑制劑為 ILA 18bp。在某些具體實施例中，ILA 18bp 可作為 "誘餌受體"，其可結合於 IL-18 分子並預防彼與 IL18R 之交互作用。

在某些具體實施例中，本發明係關於包含 "OPGL 抗體以及至少一個 IL-18 抑制劑之療法，以及使用該療法之治療方法。在某些具體實施例中，包含 OPG 抗體以及 IL-18 抑制劑以及至少一個額外的描述於此之分子進行治療。依據某些具體實施例可治療的典型症狀，包括(但非限於)：發炎、自體免疫疾病、IL-1 調節的疾病、及 TNF-調節的疾病。據某些具體實施例，OPGL 抗體以及至少一個 IL-18 抑制劑可治療的典型的症狀，包括(但非限於)：關節炎、包括，但非限於：類風濕性關節炎；全身性紅斑狼瘡 (SLE)；移植對宿主之疾病 (GvHD)；肝炎；敗毒病；以及此類疾病伴隨的骨質及軟骨的流失。

典型的 IL-18 抑制劑，包括(但非限於)：結合於 IL-18 之抗體；結合於 IL-18R 之抗體；結合於 IL-18RAcP 之抗體；IL-18bp；IL-18R 斷片(例如，IL-18 受體溶解的細胞外結構區)；結合於 IL-18 並降低或預防與 IL-18R 交互作用之肽類；結合於 IL-18R 並降低或預防與 IL-18 或 IL-18RAcP 交互作用之肽類；結合於 IL-18RAcP 並降低或預防與 IL-18R 交互作用之肽類；以及降低或預防 IL-18 產

(53)

生或任何 IL-18、IL-18R、以及 IL18RAcP 之間交互作用的小分子。

某些 IL-18抑制劑描述於例如，美國專利第 5,912,324 號，頒佈日期 7月 14日,1994；EP 0 962 531，發表於 12月 8日,1999；EP 712 931，發表於 11月 15日,1994；美國專利第 5,914,253號，頒佈日期 7月 14日,1994；WO 97/24441日,發表於 7月 10日,1997；美國專利第 6,060,283號，頒佈日期 5月 9日,2000；EP 850 952，發表於 12月 26日,1996；EP 864 585，發表於 9月 16日,1998；WO 98/41232，發表於 9月 24日,1998；美國專利第 6,054,487號，頒佈日期 4月 25日,2000；WO99/09063號，發表 8月 14日,1997；WO99/22760，發表於 11月 3日,1997；WO99/37772，發表於 1月 23日,1998；WO99/37773，發表於 3月 20日,1998；EP 0 974 600，發表於 1月 26日,2000；WO 00/12555，發表於 3月 9日,2000；日本專利申請案 JP 111,399/94，發表於 10月 31日,1997；以色列專利申請案 IL 121554 A0，發表於 2月 8日,1998；全文在此併入參考文獻。

在某些具體實施例中，OPGL 抗體可至少與一個治療發炎的治療劑共同使用。在某些具體實施例中，OPGL 抗體可至少與一個治療免疫病症的治療劑共同使用。典型治療發炎及免疫病症的治療劑，包括(但非限於)：皮質類固醇，包括(但非限於)：脫氫皮(甾)醇；非類固醇的消炎的藥物(NSAIDs)，包括(但非限於)：環氧合酶第 1型(COX-1)以及環氧合酶第 2型(COX2)抑制劑；疾病修飾抗風濕藥物

(54)

(DMARDs), 包括(但非限於): 甲胺蝶呤、羥基氯奎寧、氯奎寧、環孢子菌素、金化合物(例如: 金諾芬、金硫蘋果酸鹽以及金硫葡萄糖)、及力夫諾賣(leflunomide); 第IV型磷酸雙酯酶抑制劑, 包括(但非限於): 羅力旁(rolipram)以及本西法林(pentoxifyline); 他克莫司(FK-506); Sirolimus(納巴黴素); 麥考酚酸; 5-脂肪加氧酶抑制劑, 包括(但非限於): 齊力同(zileuton); 介白素-6(IL-6)調節劑; 38kDa有絲分裂原-活化的蛋白質激酶(p38-MAPK)之小分子調節劑; 涉及發炎路徑之細胞內的分子的小分子調節劑, 其中該細胞內的分子包括(但非限於): jnk、IKK、NF-kB、ZAP70, 以及 Ick。某些治療發炎典型的治療劑描述於例如, C.A. Dinarello and L.L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians Third Edition(2001)Amgen Inc. Thousand Oaks, CA。某些治療發炎及自體免疫疾病典型的治療劑, 包括(但非限於): 干擾素- γ (干擾素- γ)調節劑; OX40/OX40L調節劑(包括OX40可溶解的形式); 4-1BB/4-1BB配位體調節劑(包括4-1BB可溶解的形式); 以及B-細胞-T-細胞共同刺激路徑之調節劑, 包括(但非限於): CD28/B7、CD40/CD40L、ICOS/B7RP1、及AGP-3/TACI/BAFFR(AGP-3可結合於TACT以及BAFFR受體)受體配位體對之調節劑。某些B-細胞-T-細胞共同刺激路徑典型的調節劑, 包括(但非限於): CD28、B7.1、及B7.2(包括B7.1或

(55)

B7.2可溶解的形式，以及 CTLA4可溶解的形式，二者均可為融合至異性的肽或蛋白質，經增加溶解度或循環的半生期以降低或防止降解及/或增加半生期、降低毒性、降低免疫產生性、或增加治療蛋白質的生物活性)之抑制劑；CD40及 CD40L(包括 CD40可溶解的形式，其可融合至異性的肽或蛋白質)抑制劑；ICOS 以及 B7RP1(包括 ICOS 可溶解的形式，其可融合至異性的肽或蛋白質)抑制劑、以及 AGP-3、TACT 及 BAFRR(包括 TACT 以及 BAFRR 可溶解的形式)抑制劑。ICOS、B7RP1以及其抑制劑描述於例如 WO00/46240。AGP-3、TACT 以及 BAFRR 以及其抑制劑，描述於例如，WO00/47740、W001/85872、W002/15273、W098/39361、以及 von Bulow and Bram(1997)Science 278:138140。

在某些具體實施例中，使用 OPGL 抗體治療之骨骼流失，包括(但非限於)：起因於惡性或遷移性的腫瘤骨引起的溶骨破壞之骨骼流失。在某些具體實施例中，可使用 OPGL 抗體治療與癌症相關的骨骼流失。典型的癌症，包括(但非限於)：乳房、前列腺、甲狀腺、腎臟、肺、食道、直腸、膀胱、子宮頸、卵巢、以及肝癌、與胃腸道癌症。在某些具體實施例中，OPGL 抗體可用於治療相關於，例如某些血液的惡性腫瘤，包括(但非限於)：多發性骨髓瘤及淋巴癌，包括何傑金病，之骨骼流失。

在某些具體實施例中，可單獨投用 OPGL 抗體。在某些具體實施例中，可投用 OPGL 抗體與至少一個其它的治

(56)

療劑，包括(但非限於)：至少一個其它癌症治療劑。典型的癌症治療劑包括(但非限於)：輻射線治療以及化學治療。在某些具體實施例中，化學治療可包含一種或多種以下之治療：蔥土黴素、紅豆杉醇、他莫息芬、14-羥柔紅霉素、5-氟尿嘧啶、及其它技藝上已知的藥物。在某些具體實施例中，癌症治療劑是促黃體生成激素-釋放荷爾蒙(LHRH)拮抗劑。在某些具體實施例中，LHRH拮抗劑是肽拮抗劑。

在某些具體實施例中，LHRH拮抗劑包含肽：

Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂(序列確認號碼：20)，其中 Nal 是 3-(2-萘基)丙胺醯基；4-Cl-Phe 是 (4'-氯苯基)丙胺醯基；Pal 是 3-(3'-吡啶基)丙胺醯基；以及 Lys(iPr) 是 N-ε-2 丙基-離胺醯基。

在某些具體實施例中，LHRH拮抗劑是 LHRH拮抗劑十肽。某些典型的十肽類描述於例如，美國專利第 5,843,901 號，全文在此併入參考文獻。

依據某些具體實施例，典型的治療抗體包括(但非限於)：老鼠、老鼠-人類嵌合的、CDR-接枝、人類化的以及完整的人類抗體、及合成的抗體，包括(但非限於)：篩選自抗體基因庫之選擇的抗體。典型的抗體包括(但非限於)：結合於細胞表面蛋白質 Her2、CDC20、CDC33、類黏蛋白糖蛋白質、及存在於腫瘤之細胞表皮生長因子受體(EGFR)、及在腫瘤細胞上顯示可視需要誘發抑制細胞的

(57)

及 / 或細胞毒性效應蛋白質之抗體。典型的抗體亦包括 HERCEPTIN™ (trastuzumab)，其可用以治療乳癌以及其它形式之癌症、及 RITUXAN™ (里突西馬 (rituximab))、ZEVALIN™ (ibritumomab tiuxetan)、及 LYMPHOCIDE™ (epratuzumab)，其可用以治療非郝氏 (Hodgkin's) 淋巴癌以及其它形式之癌症。某些抗體之實例亦包括 ERBITUX™ (IMCC225)、BEXXAR™ (碘 131 tositumomab)、及 Campath。

在某些具體實施例中，癌症治療藥劑為多胜肽，其可選擇性地誘發腫瘤細胞之細胞凋亡，包括 (但非限於)：與 TNF-相關的多肽 TRAIL。在某些具體實施例中，可在投用癌症治療藥劑之前、同時及之後投用 OPGL 抗體進行治療。在某些具體實施例中，可預防性的投用 OPGL 抗體以預防或減輕遷移性的癌症造成之骨骼流失的開始作用。在某些具體實施例中，可投用 OPGL 抗體治療由於腫瘤移轉而存在的骨骼流失症狀。

在某些具體實施例中，可使用 OPGL 抗體預防及 / 或治療相關於多發性骨髓瘤之骨骼流失及 / 或為預防及 / 或治療疾病本身。多發性骨髓瘤是源自 B 細胞的腫瘤，可導致顯著的發病率及 / 或死亡率。在某些實例中，多發性骨髓瘤的臨床表現形式為病灶性骨骼流失，其係起因於在病灶區域增加破骨細胞活化。許多骨髓癌病人具有輻射分析可見的骨頭損害以及經歷骨骼疼痛。在某些實例中，骨髓癌病人涉及的骨頭易患有自發性或由損傷引起之病理性骨折

(58)

。在某些實例中，發生於骨髓癌期間之骨骼(尤其是脊椎骨)損害不僅會導致骨折，且亦導致畸形狀態並偶爾會神經壓縮。在一些病患中，會發生病理性的血鈣增加(高鈣血症)，並可於疾病治療期間引起顯著的問題。在某些具體實施例中，可對病人投用 OPGL 抗體以降低或阻塞骨質重吸收並釋放鈣，其可降低骨折風險及脊髓的畸形狀態。

在某些實例中，骨髓癌細胞不會直接的破壞骨頭，但會產生細胞外的信號導致破骨細胞分化及活化。在某些實例中，破骨細胞會產生高含量之細胞激動素 IL-6，尤其是當彼被活化時。IL-6 為 B-細胞生長因子，並在活體外可促使鼠科動物以及人類骨髓癌細胞生長。骨髓癌細胞亦可直接或間接的產生 OPGL，其可導致骨髓細胞癌周圍包埋在骨髓空間的局部骨質溶解。在某些實例中，相鄰骨髓癌細胞的正常的破骨細胞可產生 IL-6，其可導致腫瘤細胞局部的擴張。骨髓癌細胞係以株系的方式擴張並可占領因不適當的骨質重吸收所產生的骨空間。

目前已觀察到對齧齒動物投用 OPG 破骨細胞族群可誘發快速死亡(參閱例如，Lacey et al.(2000)Am. J. Pathol. 157:435-448)。降低破骨細胞之數目可阻礙蝕骨細胞增加 IL-6 產生之效應，並可因此影響小樑骨內骨髓癌細胞之生長及倖存。因此，在某些具體實施例中，對骨髓癌病患投用 OPGL 抗體不僅可阻塞骨質過度之重吸收，且亦可影響腫瘤本身之擴張及倖存。

B-細胞可表現 OPGL、ODAR 受體。骨髓癌細胞亦可

(59)

表現 ODAR，並可產生 OPGL。在某些實例中，同時表現 OPGL 及 ODAR 的細胞族群可產生影響骨髓癌細胞倖存之自分泌刺激。因此，在某些具體實施例中，投用 OPGL 抗體可降低腫瘤細胞倖存，從而降低或排除骨髓癌病患之腫瘤。

在某些具體實施例中，本發明提供包含有效治療量之 OPGL 抗體與醫藥學上可接受的稀釋劑、載體、溶解劑、乳化劑、防腐劑及/或佐劑之藥學組成物。

在某些具體實施例中，本發明提供包含有效治療量之 OPGL 抗體以及有效治療量之至少一個額外的治療劑，與醫藥學上可接受的稀釋劑、載體、溶解劑、乳化劑、防腐劑及/或佐劑之藥學組成物。在某些具體實施例中，至少一個額外的治療劑，其係選自：骨形態發生因子稱為 BMP-1 至 BMP-12；轉形生長因子- β (TGF- β) 以及 TGF- β 家族成員；第一型白細胞介素 (IL-1) 抑制劑，包括(但非限於)：IL-1ra 及其衍生物以及 KineretTM、anakinra；TNF α 抑制劑，包括(但非限於)：可溶解的 TNF α 受體、EnbrelTM、etanercept、抗 TNF α 抗體、RemicadeTM、infliximab、及 D2E7 抗體；副甲狀腺素及其類似物、副甲狀腺相關的蛋白質及其類似物；E 系列之前列腺素；雙膦酸鹽(例如阿多那酸鹽(alendronate)等)；提高骨質之礦物質，例如：氟化物以及鈣；非類固醇的消炎的藥物(NSAIDs)，包括 COX-2 抑制劑，例如：CelebrexTM、celecoxib 以及 VioxxTM、rofecoxib；免疫抑制劑，例如：

(60)

甲胺蝶呤或力夫諾賣 (leflunomide)；絲胺酸蛋白酶抑制劑，例如：分泌型白血球蛋白酶抑制劑 (SLPI)；IL-6抑制劑 (例如 IL-6抗體)，IL-8抑制劑 (例如 IL-8抗體)；IL-18抑制劑 (例如：IL-18結合蛋白質或 IL-18抗體)；第一型白細胞介素轉換成酵素 (ICE)調節劑；纖維母細胞生長因子 FGF-1至 FGF-10以及 FGF 調節劑；PAF拮抗劑；角質細胞生長因子 (KGF)，KGF 相關的分子、或 KGF 調節劑；基質金屬蛋白酶 (MMP)調節劑；一氧化氮合成酶 (NOS)調節劑，包括誘發性 NOS 的調節劑；糖皮質激素受體調節劑；麩胺酸鹽受體調節劑；脂多糖 (LPS)含量之調節劑；以及去甲腎上腺素以及調節劑以及其模仿劑。

在某些具體實施例中，可接受的調配物材料較佳者為在使用劑量及濃度下無毒性的接受者。

在某些具體實施例中，藥學組成物可含有修飾、維持或防腐之調配物材料，例如：酸鹼度、體積莫耳滲透濃度、黏度、透明、著色、等張性、氣味、殺菌、穩定、溶解或釋放速率、組成物吸附或穿透劑。在某些具體實施例中，適用之調配物材料，包括 (但非限於)：胺基酸 (例如：甘胺酸、麩胺醯胺酸、天門冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸)；抗菌劑；抗氧化劑 (例如：抗壞血酸、硫酸氫鈉或氫-亞硫酸鈉)；緩衝溶液 (例如：硼酸鹽、重碳酸鹽、Tris-HCl、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其它有機酸)；膨脹劑 (例如：甘露糖醇或甘胺酸)；螯合劑 (例如：乙二胺四乙酸 (EDTA))；複合劑 (例如：咖啡因、聚乙烯基吡咯烷酮、 β -環糊精或

(61)

羥基丙基- β -環糊精)；填充劑；單糖；雙糖類；以及其它
 碳水化合物(例如：葡萄糖、甘露糖或糊精)；蛋白質(例
 如：血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白)；著色劑、矯味劑
 以及稀釋藥劑；乳化劑；親水性的聚合物(例如聚乙烯基
 吡咯烷酮)；低分子量多肽；形成鹽之反離子(例如鈉)
 ；防腐劑(例如：氯化苄烷銨、苯甲酸、水楊酸、局部抗
 菌劑、苯乙醇、仲班烯、仲班烯、氯己定、己二烯酸或過
 氧化氫)；溶劑(例如：甘油、丙二醇或聚乙二醇)；糖醇
 類(例如：甘露糖醇或山梨糖醇)；懸浮劑；表面活性劑或
 溼化劑(例如：聚醣醛酸、PEG、山梨糖醇酐酯類、聚山
 梨酸酯，例如：聚山梨酸酯20、聚山梨酸酯80、(表面活
 化劑，商品名、多米胺(tromethamine)、卵磷脂、膽固醇
 、tyloxapal)；穩定性促進劑(例如：蔗糖或山梨糖醇)；
 張力促進劑(例如：鹼金屬鹵化物，較佳者為氯化鈉或氯
 化鉀，甘露糖醇山梨糖醇)；傳遞載劑；稀釋劑；賦形劑
 及/或醫藥學的佐劑。Remington's Pharmaceutical
 Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing
 Company(1990)。

在某些具體實施例中，OPGL抗體及/或治療分子可聯
 結於技藝上已知的半生期延續載劑。該載劑包括(但非限
 於)：Fc結構區、聚乙二醇、及右旋聚醣。該載劑描述於
 例如，美國申請案序號09/428,082以及發表的PCT申請案
 WO 99/25044，全文在此并入參考文獻。

在某些具體實施例中，取決於例如，預期的投藥路徑

(62)

、傳遞形式及所要求的劑量，熟悉此技藝的專業人士可測定最理想的藥學組成物。參閱例如，Remington's *Pharmaceutical Sciences, supra*。在某些具體實施例中，該組成物可影響本發明抗體之物理狀態、穩定性、活體內釋放速率及活體內清除率速率。

在某些具體實施例中，藥學組成物中之一級載劑或載體可具有水溶性或非水溶性之本質。例如，在某些具體實施例中，適當的載劑或載體可為注射用水、生理鹽水溶液或人造的腦脊髓液，可能在組成物中補充不經腸道的給藥方法之其它共同的材料。在某些具體實施例中，混合血清白蛋白之中性緩衝的生理食鹽水或生理食鹽水是進一步典型的載劑。在某些具體實施例中，藥學組成物包含三羥甲基胺基甲烷緩衝液(酸鹼度約7.0-8.5)，或乙酸鹽緩衝液(酸鹼度約4.0-5.5)，可進一步的包括山梨糖醇或其適當的取代物。在某些具體實施例中，包含 OPGL 抗體、含或不合至少一個額外治療劑之組成物，可經攪拌具有所要求之純度的選擇組成物與選擇性的調配物藥劑(Remington's *Pharmaceutical Sciences, supra*)以冷凍乾燥的糕餅或水溶液的形式加以製備貯藏。此外，在某些具體實施例中，包含 OPGL 抗體、含或不合至少一個額外治療劑的組成物，可使用適當的賦形劑，例如蔗糖，調製成冷凍乾燥物。

在某些具體實施例中，本發明藥學組成物可選擇性的進行非經腸的傳遞。在某些具體實施例中，組成物可選擇性的進行吸氣傳遞或經由消化道例如口服地傳遞。製備該

(63)

醫藥學上可接受的組成物為熟知的技藝。

在某些具體實施例中，調配物成份是以投藥位點可接受的濃縮形式存在。在某些具體實施例中，緩衝溶液係用於使組成物維持在生理的酸鹼度之下(或稍低的酸鹼度)，典型地酸鹼度範圍約5至8。

在某些具體實施例中，當考慮不經腸道的方法給藥時，治療的組成物可為不含熱原、包含所要求的 OPGL 抗體(含或不含額外的治療劑)非經腸地可接受的水溶液、內含醫藥學上可接受的載劑形式。在某些具體實施例中，非經腸注射的載劑為滅菌之蒸餾水，其中 OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)係調製成滅菌、等張、適於保存之溶液。在某些具體實施例中，製劑可包含所要求的分子調配物與藥劑，例如：注射微球體、生物腐蝕性顆粒、聚合的化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、圓珠或脂球體，其可於儲藏處注射運送後控制產物釋放或延釋。在某些具體實施例中，亦可用玻尿酸，以及延長循環中之效應。在某些具體實施例中，可使用可植入的藥物傳遞裝置引進所要求的分子。

在某些具體實施例中，藥學組成物可調製成吸入形式。在某些具體實施例中，OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)可調製成進行吸氣之乾燥粉末。在某些具體實施例中，包含 OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)之吸氣溶液可與進行氣溶膠傳遞之推進劑共同調製。在某些具體實施例中，溶液可為霧化的溶液，肺部的投

(64)

藥進一步的描述於 PCT 申請案 PCT/US94/001875，該案描述經化學修飾之蛋白質的肺部傳遞。

在某些具體實施例中，調配物可口服投用。在某些具體實施例中，用此方式投用的 OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)，可與或不與慣常用於固體劑量形式(例如藥片及膠囊)之配料載體調製。在某些具體實施例中，膠囊可設計成在生物效性最適化及前全身性降解最小化之胃腸道釋放活性部份的調配物。在某些具體實施例中，至少一個額外的藥劑可包括增進 OPGL 抗體吸收及/或任何額外的治療劑。在某些具體實施例中，亦可使用稀釋劑、調味劑、低熔點蠟、植物油、潤滑劑、懸浮劑、藥片崩解劑及結合劑。

在某些具體實施例中，包含有效量的 OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)之藥學組成物，可混合適用於藥片製作之無毒的賦形劑。在某些具體實施例中，將藥片溶解於滅菌水，或另一適當的載劑，可製備單位-劑量形式之溶液。在某些具體實施例中，適當的賦形劑包括(但非限於)：惰性稀釋劑，例如：碳酸鈣、碳酸鈉或重碳酸鹽、乳糖、或磷酸鈣；或黏結劑，例如：澱粉、明膠、或阿拉伯膠；或潤滑的藥劑，例如：硬脂酸鎂、硬脂酸、或滑石粉。

額外的藥學組成物則為熟悉此技藝的專業人士所熟知，包含 OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)之調配物內可包括長效-或控制傳遞之調配物。在某些具體實

(65)

施例中，調製各種其它長效-或控制-傳遞裝置，例如脂球體載體、生物腐蝕性的微顆粒或多孔的圓珠以及儲藏處注射劑之技藝亦為熟悉此技藝的專業人士習知的技藝。參閱例如，PCT 申請案 PCT/US93/00829，其係描述以多孔的聚合微顆粒控制釋放藥學組成物之傳遞。在某些具體實施例中，長效-釋放製劑可包括使物品定形之半滲透聚合物基質，例如膜、或微膠囊。延釋基質可包括：聚酯、水凝膠、聚丙內酯(美國專利 3,773,919及 EP 058,481)、L-麩胺酸以及 γ -乙基-L 麩胺酸鹽共聚物(Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556(1983))、聚(2-羥基乙基異丁烯酸酯)(Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277(1981)及 Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105(1982))、乙基醋酸乙基酯(Langer et al., *supra*)或聚-D(-)-3-羥基丁酸(EP 133,988)。在某些具體實施例中，延釋組成物亦可包括脂球體，其可用任何技藝上已知的方法製備。參閱例如，Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046以及 EP 143,949。

活體內投藥的藥學組成物一般為滅菌之藥學組成物。在某些具體實施例中，此可經滅菌之過濾膜過濾完成。在某些具體實施例中，組成物可為冷凍乾燥之組成物，使用此方法之滅菌可在冷凍乾燥法及重新調製之前或之後進行。在某些具體實施例中，不經腸道的給藥方法的組成物可以冷凍乾燥或溶液的形式儲存。在某些具體實施例中，非經腸組成物一般係置於具有滅菌入口之容器，例如：具有

(66)

皮下注射針可穿刺的塞子之靜脈溶液袋或管形瓶。

在某些具體實施例中，一旦調製藥學組成物，彼可為溶液、懸浮液、凝膠、乳劑、固體、或作為脫水或冷凍乾燥的粉末儲存於滅菌之管形瓶。在某些具體實施例中，該調配物可儲存成即用形式或在投藥之前重組的形式(例如：冷凍乾燥的形式)。

在某些具體實施例中，本發明係關產生單一劑量投藥單位之組套。在某些具體實施例中，組套可各自含有具有乾燥蛋白質之第一容器及具有水溶性調配物之第二容器。在本發明某些具體實施例中，組套中可包含內含單一及多室的預裝入注射器(例如，液體注射器及乾粉注射器)。

在某些具體實施例中，包含 OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)之藥學組成物，其治療上之有效量視治療的內容及目標而定。熟悉此技藝的專業人士將認知依據某些具體實施例治療的適當劑量，將(部份地)視運送的分子、OPGL 抗體(含或不含至少一個額外的治療劑)治療的適應症、投藥路徑、及病患之大小(體重、身體表面或器官之大小)及/或條件(年齡及一般的健康狀況)而變化。在某些具體實施例中，醫師可效價劑量及修飾投藥路徑以取得最理想的治療效果。在某些具體實施例中，取決於上述的因子，有代表性的劑量介於約 0.1 微克/公斤至約 100 毫克/公斤或更多。在某些具體實施例中，劑量可介於 0.1 微克/公斤至約 100 毫克/公斤；或 1 微克/公斤至約 100 毫克/公斤；或 5 微克/公斤至約 100 毫克/公斤。

(67)

在某些具體實施例中，投服頻率將視調配物中 OPGL 抗體及 / 或任何額外的治療劑之藥物動力學參數而定。在某些具體實施例中，醫師將可操作組成物直到劑量達成所要求的效應。在某些具體實施例中，組成物可在一段時間內以單一劑量，或兩種或多種劑量的形式投用 (可含或不含有相同量的所要求的分子) ，或經植入裝置或導管連續灌入。熟悉此技藝的專業人士可例行的進一步的定義適當的劑量，且此為其工作之範圍。在某些具體實施例中，經由使用適當的劑量反應數據可確定適當的劑量。

在某些具體實施例中，藥學組成物之投藥路徑可依據已知方法，例如口服、經由靜脈內的、腹腔內的、大腦內的 (薄壁組織內的) 、腦室內的、肌肉內的、眼睛內的、動脈內的、門靜脈內的、或損害內的路徑注射；經延釋系統或經植入裝置投用。在某些具體實施例中，組成物可經大量注射或連續地灌入、或植入裝置投用。

在某些具體實施例中，組成物可經已吸收或封包所要求的分子植入膜、海綿或另一適當的材料局部的投用。在某些具體實施例中，使用植入裝置時，裝置可植入任何適當的組織或器官，並經擴散、時間性的釋放團塊、或連續投藥，以傳遞所要求的分子。

在某些具體實施例中，可為令人滿意的以體外的方法使用包含 OPGL 抗體 (含或不合至少一個額外的治療劑) 之藥學組成物。在該實例中，從病患移除之細胞、組織及 / 或器官可暴露至包含 OPGL 抗體 (含或不合至少一個額外的

(68)

治療劑)之藥學組成物，之後將細胞,組織及/或器官植回病患。

在某些具體實施例中，OPGL 抗體及/或任何額外的治療劑可植入某些使用本文描述之方法遺傳工程構建的表現及分泌多胜肽之細胞，加以運送。在某些具體實施例中，該細胞可為動物或人類細胞，以及可為自體移植的,異性的,或異種的細胞。在某些具體實施例中，細胞可為永生的細胞。在某些具體實施例中，為了降低偶然性免疫反應的機會，可封包細胞避免其滲入周圍的組織。在某些具體實施例中，封包材料一般為允許蛋白質產物釋放，但可預防病人的免疫系統或周圍組織的其它有害因子破壞細胞之生物相容的，半滲透的聚合性外膜或膜。

【實施方式】

下列實施例，包括進行之實驗以及結果係用以說明而非限制本發明。

實施例 1 選殖 α OPGL-1重鏈及輕鏈

用表現全長人類 OPGL 互補型 DNA 之 CHO 細胞來對內含人類免疫球蛋白基因之導入外來基因的老鼠進行免疫。將免疫老鼠的淋巴結與鼠科動物骨髓瘤細胞融合產生融合瘤。將融合瘤細胞株之懸浮液進行酵素聯結免疫抗體檢測法，測定可與人類 OPGL 反應之抗體。表現抗-OPGL 抗體之融合瘤細胞株 AMG6.5、AMG6.4、及 AMG6.1可表現

(69)

高親和性之抗 OPGL 抗體 (Kd's 分別為 0.28 毫微莫耳濃度、0.29 毫微莫耳濃度、以及 0.23 毫微莫耳濃度)，選擇 AMG6.5 進行選殖。AMG6.5 及 AMG6.4 選殖之重鏈及輕鏈互補型 DNA 俱為相同，用 AMG6.5 選殖 α OPGL-1 輕鏈互補型 DNA，而用 AMG6.4 選殖 α OPGL-1 重鏈互補型 DNA。

選殖 α OPGL-1 輕鏈

使用 PCR 放大方法，從 AMG6.5 之總 RNA 製備的第一股互補型 DNA 得到 α OPGL-1 κ 輕鏈變異區。使用具有延伸的 5'-接合器之隨機引子 (5'-GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT-3' (序列確認號碼：15)) 以及 Gibco SuperScript II™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis kit (cat. no. 18089-011) 提供之材料及方法，從 AMG6.5 之總 RNA 製備第一股互補型 DNA。PCR 係使用以下之寡核苷酸：

5' κ RACE 引子：

5'-GAT GAC CCA GTC TCC AGC CAC CCT G-3' (序列確認號碼：5)

3' κ RACE 引子：

5'-AAG GGT CAG AGG CCA AAG GAT GG-3' (序列確認號碼：6)

將放大的 DNA 選殖入 pCRII-TOPO (Invitrogen)，並對產生的質體進行定序。使用 κ 鏈之保留性序列設計引子進行 PCR，放大全長之 α OPGL-1 κ 鏈。在 5' α OPGL-1 κ

(70)

引子上加上 XbaI 位點 (TCTAGA) 以進行選殖以及在起始子 Met 密碼子之前加上一個 "CCACC" Kozak 序列。在 3' αOPGL-1 κ 引子上之終止密碼子之後加上一個 Sa/I 位點 (GTCTGAC) 以進行選殖。

5' αOPGL-1 κ 引子：

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

XbaI 位點 Kozak M E T P A (SEQ ID NO: 16)

3' αOPGL-1 κ 引子：

5'-TTT GAC GTC GAC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA G -3' (SEQ ID NO: 8)

SaI 位點 * * C E G R N F (SEQ ID NO: 17)

使用 AMG6.5 第一股互補型 DNA 依上述之說明，用 5' 及 3' αOPGL-1 κ 引子進行 PCR 放大，得到全長 αOPGL-1 κ 鏈互補型 DNA 之選殖株。PCR 反應產生編碼 αOPGL-1 κ 鏈之 235 個胺基酸殘基 (包括 20 個胺基酸之 κ 鏈信號序列) 之 738 個鹼基對的斷片 (圖 4，序列確認號碼：4)。使用 QIAquick PCR Purification kit (Qiagen cat. no. 28104) 純化後，用此斷片建築 κ 輕鏈表現載體。

將上述產生之 738 個鹼基對的全長 κ 斷片用 XbaI 及 Sa/I 水解，使用 Promega Wizard DNA Clean-Up System (Promega cat. no. A7100) 純化，一併選殖入 pDSRα19 產生質體 αOPGL-1-κ/pDSRα19 (圖 5)。pDSRα19 已描述於前 (參閱 WO 90/14363，全文在此併入參考文獻，(參閱例如圖 12))。簡言之，爲了製作 pDSRα19，先將 pDSRα2 以下方式修飾：將 FSH poly A 縮短約 1400 鹼基對至 885 鹼基對，並終止於 NdeI 位點；將雙氫葉酸還原酶 (DHFR) 啓動子從 5' 端

(71)

縮短約 1 仟鹼基至 209 鹼基對；並從 DHFRpoly A 序列刪除大約 550 鹼基對之 BglIII 斷片。

定序以證實表現 α OPGL-1 κ 輕鏈之選殖菌落與 AMG6.5 融合瘤編碼相同的肽。最終表現載體 (α OPGL-1- κ /pDSR α 19) 具有 5476 個鹼基對，並含有 7 個功能的區域，如表 2。

(72)

表 2： α OPGL-1-1 κ /pDSR α 19之特色
體之鹼基對數

2至 881	來自牛腦下垂體糖蛋白質激素 α -次單體 (α -FSH)之轉錄終止/聚腺苷酸化作用信號 (Goodwin, et al, Nucleic Acids Res. 1983 11: 6873-82; Genbank 寄存編號 X00004)
882至 2027	內含內生性老鼠 DHFR 啟動子、互補型 DNA 編碼序列、及 DHFR 轉錄終止/聚腺苷酸化作用信號 (Gasser et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 79:6522-6.; Nunberg et al, Cell 1980 19:355-64; Setzer et al, J Biol Chem. 1982 257: 5143-7; McGrogan et al, J Biol Chem. 1985 260: 2307-14)之老鼠雙氫葉酸還原酶 (DHFR)迷你基因。
2031至 3947	內含抗氨比西林標識基因以及大腸桿菌質體複製起點之 pBR322序列 (Genbank 寄存編號 J01749)
3949至 4292	SV40早期啟動子、強化子以及複製起始點 (Takebe et al, Mol Cell Biol. 1988: 466-72, Genbank 寄存編號 J02400)。
4299至 4565	來自人類促 T 淋巴球增生病毒-1 LTR 結構區的轉譯強化子元件 (Seiki et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 80: 3618-22, Genbank 寄存編號 J02029)
4574至 4730	來自 SV40 16S 之內子，19S 接合供體/受體信號 (Okayama and Berg, Mol Cell Biol. 1983 3: 280-9, Genbank 寄存編號 J02400)
4750至 5476	介於 XbaI 以及 Sa/I 位點間之 α OPGL-1 K 輕鏈互補型 DNA

(73)

圓形的質體圖譜載體展示於圖 5.。

選殖 α OPGL-1 重鏈

用取自 Clontech MarathonTM cDNA Amplification Kit(cat. no. K1802-1)製作之 AMG 6.4 融合瘤雙股互補型 DNA 選殖 α OPGL-1 IgG2 重鏈。用互補型 DNA 端 5' 及 3' 快速放大技藝 (RACE)、人類生殖株 IgG2 重鏈恆定區專一的引子 (展示於下) 以及 RACE 引子以及其它材料以及 MarathonTM 互補型 DNA 放大組套提供之方法，放大 AMG 6.4 之重鏈互補型 DNA。

5' IgG2 RACE 引子

5'-GGC ACG GTC ACC ACG CTG CTG AG -3' (序列確認號碼：9)

3' IgG2 RACE 引子

5'-CCT CCA CCA AGG GCC CAT CGG TCT-3' (序列確認號碼：10)

將 600 個鹼基對之 5' RACE 產物以及 1200 個鹼基對之 3' RACE 產物選殖入 pCR2.1 (Invitrogen) 及定序。此序列資料可用以設計選殖 α OPGL-1 重鏈全長序列的專一性引子。重鏈之 5' 引子 (5' α OPGL-1 IgG2 引子) 為同義股並具有 Hind/II 位點，並在天然的起始位點之前有一致性的 Kozak 序列。重鏈之 3' 引子 (3' α OPGL-1 IgG2 引子) 是反股引子，含有 Sa/I 位點並在重鏈 IgG2 序列的最後一個胺基

(74)

酸之後含有終止密碼子。

5' α OPGL-1 IgG2引子：

5'-CAGAAGCTTGACCACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GC -3'

(SEQ ID NO: 11)

*Hind*III Kozak M E F G L S W L F L V A

(SEQ ID NO: 18)

3' α OPGL-1 IgG2引子：

5'-GCA TGTCGCAC TTA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG -3' (SEQ ID NO: 12)

*Sa*I * * K G P S L S L (SEQ ID NO: 19)

用上述雙股的互補型 DNA，以 5'-以及 3'- α OPGL-1 IgG2引子經 PCR 放大產生全長重鏈互補型 DNA。PCR 產生一個編碼 α OPGL-1 IgG2重鏈蛋白質 467個胺基酸殘基(包括 19個胺基酸之 IgG 信號序列)(圖 2，序列確認號碼：2)之 1433個鹼基對的斷片。使用 QIAquickPCRPurification kit(Qiagen cat. no.28104)純化後，用此斷片建築以下之重鏈表現載體。

將上述產生之編碼全長 IgG2重鏈之 DNA 斷片用 *Hind*/II 以及 *Sa*/I 水解，使用 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen cat.no.28704)純化，並將此斷片選殖入 pDSR α 19。產生的表現質體名稱爲 α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19(圖 6)。除了 α OPGL-1 IgG2重鏈互補型 DNA 在 *Xba*I 及 *Sa*/I 位點之間代替 α OPGL-1 κ 輕鏈互補型 DNA 之外，所有載體之成份與 α OPGL-1- κ /pDSR α 19載體相同。將 α OPGL-1 IgG2重鏈表現選殖菌落株系定序，證實與 AMG6.4融合瘤編碼

(75)

的多肽相同。

實施例 2 於 CHO 細胞中表現 α OPGL-1

將 α OPGL-1- κ /pDSR α 19 及 α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19 質體共同轉染入缺乏雙氫葉酸還原酶 (DHFR) 的中國倉鼠卵巢細胞 (CHOAM-1/D, 美國專利第 6,210,924 號), 分離及測試各個菌落後, 穩定的表現 α OPGL-1 抗體。

在轉染之前(第 0 天), 將 100 毫米之組織培養盤中種植入 1.5×10^6 之 AM-1/D 細胞, 並生長於 CHOd 培養液 (DMEM-高葡萄糖、10%胎牛血清、1%青黴素/鏈黴素/麩胺醯胺酸、1X 丙酮酸鈉、1%非必需胺基酸 (NEAA))(Gibco®) 以及 1% ht 補充劑 (Gibco®)。於第一天, 將 400 微升不含血清的 RPMI 1640 培養液 (Gibco®) 等量分裝於 12x75 毫米之聚丙烯管。在培養液中逐滴加入 24 微升之 TransIT®-LT1 試劑 (Mirus Corporation), 混合物在室溫下反應 10 分鐘。在混合物中逐滴加入總共 15 微克之線性化質體 DNA (7.5 微克之 α OPGL1- κ /pDSR α 19 以及 7.5 微克之 α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19, PvuI 水解), 在室溫下反應 10 分鐘。

移除 CHOd 培養液, 將細胞用 10 毫升 Dulbecco's 磷酸鹽緩衝的生理食鹽水 (Gibco®) 清洗。細胞培養液中加入 6 毫升不含血清補充 HT、L-glu、NEAA、以及丙酮酸鈉 (Gibco®) 的 MEM 培養液。平板中逐滴加入 DNA/LT1 複合物, 前後輕柔的搖動以均勻地分散細胞上之 DNA。置於

(76)

組織培養培養箱6小時之後，培養液用新鮮的 CHOd 培養液取代。58小時後，將細胞分入十個內含 CHO 選擇培養液 (DMEM 高葡萄糖，10%透析的胎牛血清 (FIBS)，1%青黴素/鏈黴素/麩胺醯胺酸，1%非必需胺基酸及1X 丙酮酸鈉)(Gibco®)之100毫米培養盤。每週更換培養液兩次，直到出現株系為止。

於10-14天之後，使用浸泡1x 胰蛋白酶-EDTA(Gibco®)之5毫米之選殖盤(Labcore®)挑選株系並用內含CHO選擇培養液之24孔組織培養板培養。當細胞長滿後，加入不含血清的培養液(不含FBS之CHO選擇培養液)，於48小時後收集。用西方轉漬法以辣根過氧化酶(HRP)-共軛結合的山羊抗-人類IgG Fc抗體(Pierce,Rockford, IL)分析此類條件化的培養液中抗體之表現，偵測 α OPGL-1重鏈、及山羊抗-人類 κ 鏈抗體(Pierce,Rockford,IL)，接著用HRP-共軛結合的兔子抗-山羊免疫球蛋白克(H+L)抗體(Pierce,Rockford,IL)偵測 α OPGL-1輕鏈。挑出表現最高的株系進行生長及及儲存於液態氮。

實施例 3產生 α OPGL-1

製備及創造細胞株125Q

在96孔測試盤中於不含血清的條件下，經二次限制稀釋，選殖產生 α OPGL-1之CHO細胞。株系的選擇係基於彼可各種懸浮容器中生產及生長之特性。進行EIA以選擇 α OPGL-1產量最高之株系。然後將株系生長在100毫升、

(77)

250毫升、500毫升、1升、及3升旋轉燒瓶、與3升 Aplikon 生物反應器中，測量生長特性，包括倍增時間及密度。選擇加倍時間最快到達最高密度之株系，稱為細胞株 125Q。當株系擴增至產生足以將大約 1×10^7 細胞/毫升之數目的細胞冷凍於360個注射液瓶之數目時，將細胞再懸浮於冷凍劑、不含血清的培養液(90%VM 大豆批次培養液(參閱表3)，補充10毫升/升非必需胺基酸及10毫升/升 L-麩胺醯胺酸(Gibco/LTI/Invitrogen)，及10%二甲(基)亞砷(JT Baker))並加以冷凍。將注射液瓶授權使用之設備中並浸在內含液態氮之液態氮杜瓦瓶。

以小量旋轉瓶及大量生物反應器中之生長及產量為計，選擇細胞株 125Q 製造 α OPGL-1。

細胞培養

用細胞株 125Q(從質體 α OPGL1- κ /pDSR α 19 及 α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19表現 α OPGL-1之 CHO 細胞株系)表現及製作 α OPGL-1。製作 α OPGL-1之細胞培養方法展示於圖 19。每次生產時將來自管形瓶之細胞株 125Q 在 100rpm 下先於內含補充10毫升/升非必需胺基酸及10毫升/升 L-麩胺醯胺酸(Gibco/LTI/Invitrogen)(VM 大豆 Supp)的50毫升 VM 大豆批次培養液(組成物參閱表3)之125毫升歐尼麥爾搖動器中生長5天。然後將全部的培養細胞種入內含 VM 大豆 Supp 之500毫升旋轉燒瓶(3×10^5 活細胞/毫升(3E5 vc/毫升))，在70rpm 旋轉下生長3-4天。然後將500毫

(78)

升旋轉燒瓶內全部的培養細胞種入內含 VM 大豆 Supp 之 3L 旋轉燒瓶 (3E5 vc/毫升)，在 70rpm 旋轉下生長 3-4 天。

然後將 3L 旋轉燒瓶內之培養細胞，分裝到兩個內含 VM 大豆 Supp(不含酚紅)之 3 升旋轉燒瓶 (3E5 vc/毫升)，在相同的條件下生長。然後將此類旋轉燒瓶之培養細胞種入內含 VM 大豆 Supp(不含酚紅)之四個額外的旋轉燒瓶 (3E5vc/毫升)，在相同的條件下生長。將從 4 個 3L 旋轉燒瓶得到的 4 公升培養細胞種入內含 10 升 VM 大豆 Supp(不含酚紅)之 20 升的生物反應器，生物反應器以進料-批次模式運轉 7-10 天。在進料-批次模式中，加入內含濃縮培養液成份之營養素進料("進料"如以下之表 3)以維持細胞生長及培養細胞之存活力。

然後將 20 升生物反應器中全部的培養細胞種入內含 70 升 VM 大豆 Supp(不含酚紅)之 150 升生物反應器，生物反應器以進料-批次模式運轉 9-10 天。最後，將 150 升生物反應器中全部的培養細胞種入內含大約 880 升 VM 大豆 Supp(不含酚紅)之 2000 升生物反應器，生物反應器以進料-批次模式運轉。進料-批次模式期間進料之速率由各生物反應器中葡萄糖含量是否維持 0.6 克/升加以測定。每日測量細胞密度及葡萄糖濃度，並據此調整進料速率。

2000 升生物反應器中生產 α OPGL-1 進行時間約二週，其間細胞組成地製作 α OPGL-1 並分泌至細胞培養液。

設定酸鹼度、溫度、及溶氧量控制生產反應器：酸鹼度為 7.0 並用加入二氧化碳氣體及碳酸鈉控制；溶氧為 120

(79)

毫米汞柱並用通入空氣、氮、及氧氣加以控制。細胞全程維持在 37°C。所有氣體均用孔隙度 0.22 微米或更低之濾膜過濾。

生產結束時，將細胞液體培養液送入圓錠堆疊離心機，分離細胞與上清液。離心物進一步的用 Cuno 90SP 深濾器、0.2 微米之 Posidyne 濾器 (Pall Co.) 過濾。然後將澄清的條件化培養液使用 50kD NMWL 細胞膜 (Millipore Biomax 50) 之正切的流動超過濾 (UF) 濃縮。條件化的培養液可濃縮 15 至 30 倍。然後產生的條件化的培養液濃縮物 (CCM) 可純化加工或冷凍後在以後純化。生產的過程總結於圖 19。

細胞培養液

整個細胞培養過程使用的細胞培養液是以 Dulbecco's 經修飾之 Eagle's 培養液 / Ham's 營養素 F12 (DMEM/F12, 1:1) 為主，並含有補充量之胺基酸、額外的營養物以及鹽類、大豆水解產物以及重組人類胰島素 (Nucellin® Zn, Eli Lilly)。成份列於表 3。此培養液稱為 VM-大豆。培養液在使用之前經 0.2 微米孔隙度之濾膜過濾。

(80)

表 3. 細胞培養液之成份

基本培養液及 FEEDS 之成份

成份	VM 大豆批次培養液 (毫克/升)	FEED (毫克/升)
DMEM/F12 成份		
無機 鹽類		
CaCl ₂ (無水)	116.60	233.2
CUSO ₄ .5H ₂ O	0.0026	0.0052
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.1000	0.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.8340	1.668
KCl	311.80	623.6
MgCl ₂ (無水)	57.280	114.56
MgSO ₄ (無水)	97.680	195.36
NaCl	905.990	1811.98
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125.00	250
Na ₂ HPO ₄	142.040	284.08
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.8640	1.728
其它成份		
D-葡萄糖	3151.00	12302
次黃嘌呤鈉	5.40	10.8
亞麻油酸	0.090	0.18
硫辛酸	0.2060	0.412
酚紅	8.10	16.2
腐胺 .2HCl	0.1620	0.324

(81)

丙酮酸鈉	110.00	220
胺基酸		
L-丙胺酸	26.70	53.4
L-精胺酸 HCl	295.00	590
L-天門冬醯胺酸.H ₂ O	45.00	90
L-天門冬胺酸	39.90	79.8
L-半胱胺酸.HCl.H ₂ O	35.120	70.24
L-胱胺酸.2HCl	62.580	125.16
L-麩胺酸	44.10	88.2
L-麩胺醯胺酸	657.00	1314
甘胺酸	52.50	105
L-組織胺酸.HCl.H ₂ O	62.950	125.9
L-異白胺酸	108.940	217.88
L-白胺酸	118.10	236.2
L-離胺酸 HCl	182.50	365
L-甲硫胺酸	34.480	68.96
L-苯丙胺酸	70.960	141.92
L-脯胺酸	57.50	115
L-絲胺酸	73.50	147
L-蘇胺酸	106.90	213.8
L-色胺酸	18.040	36.08
L-酪胺酸.2Na.H ₂ O	111.580	223.16
L-纈胺酸	105.70	211.4
維生素		

(82)

生物素	0.0073	0.0146
D-泛酸鈣	4.480	8.96
膽鹼氯化物	17.960	35.92
葉酸	5.30	10.6
異-肌醇	25.20	50.4
菸醯胺	4.040	8.08
吡多醛 HCl	4.00	8
吡多醇 HCl	0.0620	0.124
核黃素	0.4380	0.876
噻胺鹽酸鹽	4.340	8.68
胸腺嘧啶	0.3635	0.727
維生素 B12	1.360	2.72
額外的成份		
Nucellin Zn,(rhu 胰島素)	5.00	15
亞硒酸	0.0050	0.015
乙醇胺	0.0012	0.0037
三碘甲狀腺胺酸	0.000040	0.00012
氫皮質酮	0.020	0.06
三價鐵檸檬酸鹽	122.450	122.450
聚醣醛酸 F-68	1000.00	500
大豆水解產物	6000.00	6000.00
NaHCO ₃	3000.00	3000.00
NaCl	3500.00	

(83)

純化方法

CHO 細胞表現的 α OPGL-1 係分泌至細胞外的培養液。可使用一系列純化步驟產生純物質。使用之方法為厭水性的電價誘發、陽離子交換、及忌水性交互作用色層分析法與低酸鹼度溶析之步驟以及病毒性的濾器。此類程序描述如下。

A. 厭水性的電價誘發色層分析法 (HCIC)

此色層分析法步驟可移除大多數的宿主細胞蛋白質及 DNA。將濃縮條件化的培養液 (CCM) 經由 Cuno 30SP 濾器、Cuno VR07 帶電價的纖維素濾器過濾，然後載入 MEP HyperCel 樹脂。於荷載之後，管柱用平衡緩衝液 (20 毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷，酸鹼度 7.2) 清洗。使用低酸鹼度緩衝液 (20 毫莫耳濃度乙酸鈉，酸鹼度 5.0) 從樹脂溶析抗體。從管柱溶析後，以 280 毫微米吸光度為基礎收集管柱排放之產物。

B. 病毒性的去活化

集中 MEP 溶析物，滴定至酸鹼度 3.7 並保持大約 60 分鐘去活化可能之反轉錄病毒。此步驟之後將酸鹼度調回至大約 6.0。

C. 病毒性的過濾

將調回酸鹼度之產物經由 Millipore Viresolve NFR 濾

(84)

器或當量的材料過濾。濾除抗體溶液中可能地 >50 毫微米之病毒。

D. 陽離子交換色層分析法 (CEX)

抗體可進一步的使用 SP 瓊脂糖 HP (Amersham Pharmacia) 或相當的材料以陽離子交換色層分析法純化。陽離子交換色層分析法步驟可移除額外的 CHO 細胞蛋白質、DNA、較低的分子量蛋白質、及聚集形式的 α OPGL-1。將集中的病毒過濾液裝入陽離子交換樹脂。於載入之後，管柱用平衡緩衝液 (20 毫莫耳濃度 NaMES，酸鹼度 6.2) 清洗。然後抗體用線性梯度增加的鹽溶液 (20 毫莫耳濃度 NaMES，酸鹼度 6.2，0 莫耳濃度 NaCl 至 20 毫莫耳濃度 NaMES，酸鹼度 6.2，0.3 莫耳濃度 NaCl) 溶析。自管柱溶析後，以 280 毫微米吸光度為基礎收集管柱排放之產物。

E. 忌水性交互作用色層分析法 (HIC)

抗體進一步的使用苯基 Toyopearl 650S (Tosoh Biosep) 或相當的材料以忌水性交互作用色層分析法純化。忌水性交互作用色層分析法步驟是精鍊的步驟並可移除額外的 CHO 細胞蛋白質、DNA、較低的分子量蛋白質、以及聚集形式之 α OPGL-1。荷載入管柱前，在集中的陽離子交換之溶析物中於 15-25°C 下、加入硫酸銨使傳導度 >105 mS/公分條件化。於荷載之後用平衡緩衝液 (1 莫耳濃度磷酸鉀，酸鹼度 8) 清洗管柱。然後用線性的梯度降低鹽濃度

(85)

(1莫耳濃度磷酸鉀，0毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷，酸鹼度8至0莫耳濃度磷酸鉀，20毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷，酸鹼度8)溶析抗體。自管柱溶析後，以280毫微米吸光度為基礎收集管柱排放之產物。

F. 濃縮及透析過濾

將集中的 HIC 管柱溶析物使用50kD NMWL 細胞膜 (Millipore Biomax 50)經正切的流動超過濾濃縮及透析過濾成調配緩衝液。調配緩衝液包括10毫莫耳濃度乙酸鹽、5%山梨糖醇、酸鹼度5.2以及 α OPGL-1為30毫克/毫升。

最終之過濾及貯藏

純化的產物通過0.22微米之 PVDF 濾器 (Millipore)，採樣並儲存於大約 -30°C 下之安全的冰箱內。

實施例 4 α OPGL-1之結合特異性

轉染實施例1及2的二種表現載體之 CHO 細胞製作之抗體，可用於以下之實施例4、5及6。

人類 OPG 可結合及中和大白鼠、小鼠及獼猴、與人類的 OPGL。 α OPGL-1可高親和性的結合人類 OPGL，但不會顯著的結合鼠科動物之 OPGL(表4)。

(86)

表 4： α OPGL-1 對人類獼猴、或老鼠序列表現的細胞膜 OPGL 之親和力。

OPGL 品系	α OPGL-ED50 毫微克 / 毫升
人類	16
獼猴	19
老鼠	無特定的結合

CHO 細胞表現的此類 OPGL 為全長、膜結合的蛋白質。 α OPGL-1 結合至表現在細胞表面的 OPGL 係用 FACS 分析評估，其係將細胞與 α OPGL-1 及 FITC-標記的對抗人類 IgG2 之二次抗體反應。 α OPGL-1 可結合至人類以及獼猴之 OPGL，但結合至老鼠 OPGL 則具專一性。

此外，人類 OPG 與腫瘤壞死因子相關的細胞凋亡誘導配位體 (TRAIL，相關於 TNF 家族的一員) 有弱的結合 (Truneh et al, 2000) 已報導，顯示其 DNA 及胺基酸序列與 OPGL 有同源現象 (Lacey et al., 1998)。然而，OPG 無法結合至其它 TNF-相關的蛋白質，例如 $TNF\alpha$ 、 $TNF\beta$ 、或 CD40 配位體。

α OPGL-1 可專一結合於 EIA 板上之 OPGL (圖 7)。將重組可溶解的 OPGL (2 微克 / 毫升) 在室溫下塗覆在 96 孔之 EIA 板，16 至 24 小時。於 1% BSA 之 PBS 阻塞之後，各孔中加入以 1% BSA / PBS 稀釋之各種濃度的 α OPGL-1 (大約 2 毫微克 / 毫升至 1000 毫微克 / 毫升)，平板在室溫下反應約 2 小時。結合的抗體用山羊抗 - 人類 IgG (Fab') - HRP 以

(87)

TMB-H₂O₂(四甲基聯苯胺及過氧化氫)受質混合物偵測。在450毫微米以及650毫微米之吸光度下記讀。

α OPGL-1專一的結合於表現在轉染細胞表面之 OPGL(圖8)。將 FACS 緩衝液(PBS、0.1%BSA、0.01%疊氮化鈉)稀釋的 α OPGL-1(100毫微克/毫升)與各種濃度之 OPGL、TNF α 、TNF β 、TRAIL、或 CD40配位體(大約0.1毫微克/毫升至1000毫微克/毫升)預反應，然後加入大約200、000個 CHOREN 218-9細胞，其為細胞表面上穩定表現膜結合的 OPGL 之 CHO 細胞，在2-8℃下、1小時之後，離心移除未結合的抗體並清洗。然後細胞在2-8℃下與 FITC-標記的 F(ab')₂山羊抗-人類 IgG(具 Fcy 斷片專一性)反應30分鐘。於離心及清洗之後，使用流式細胞儀測量細胞表面螢光。圖8顯示 α OPGL-1專一的結合於 CHOREN 218-9細胞，加入可溶解的 OPGL 可競爭性的降低結合，但加入 TNF α 、TNF β 、TRAIL、或 CD40配位體則不會。

在競爭實驗中，加入外生性 OPGL 會抑制 α OPGL-1結合於 EIA 板上之 OPGL(圖9)，但加入 TNF α 、TNF β 、TRAIL 或 CD40配位體則不會(圖10)。進行此程序，除了固定濃度的 α OPGL-1(100毫微克/毫升)在加入塗覆 OPGL 之平板之前與各種濃度之可溶解的 OPGL 或其它配位體(各大約1毫微克/毫升至1000毫微克/毫升)預反應之外，實質上與上述 α OPGL-1結合於 EIA 板上 OPG 之方法相同。

實施例 5 α OPGL-1之中和活性

(88)

抑制破骨細胞形成

RAW 264.7(ATCC No. TIB-71, Manassas, VA)是源自 Abelson 鼠科動物白血病病毒誘發的腫瘤之鼠科動物巨噬細胞細胞株。在 OPGL 存在下，RAW 264.7細胞可分化成類破骨細胞。在 OPGL 存在下，從培養 RAW 細胞產生破骨細胞之基本測定已詳細描述於 Simonet et al(1997)Cell 89 p. 309、以及 Lacey et al(1998)Cell 93 p. 165，全文在此併入參考文獻。

用配位體刺激 RAW 細胞使其分化成類破骨細胞，並用 TRAP 活性(破骨細胞之性質)測量分化狀況。因此，可測量 α OPGL-1對破骨細胞生成之效應。

於細胞培養液(DMEM、10%FBS、0.292毫克/毫升 L-Glut、100單位/毫升青黴素克、100微克/毫升鏈黴素硫酸鹽)中，在固定量的 OPGL(40毫微克/毫升)以及變化量之 α OPGL-1(6.3毫微克/毫升至200毫微克/毫升)存在下，將 RAW 細胞反應4天。4天後將細胞通透及酸化以進行抗酒石酸鹽酸性磷酯酶活性之染色，接著用對-硝基苯基磷酸鹽反應5分鐘。簡言之，從細胞中吸出培養液，在各孔中加入100微升之檸檬酸鹽緩衝液(410毫升0.1莫耳濃度檸檬酸、590毫升0.1莫耳濃度檸檬酸三鈉、1毫升 triton X-100)，將平板在室溫下反應3至5分鐘。然後加入10微升之 PNPP 溶液(157.8毫克 酸性磷酯酶試劑(Sigma 104100)、7.2毫升酒石酸鹽溶液(Sigma cat.No.387-3)、及22.8毫升檸檬酸鹽緩衝液)，平板在室溫下反應3至5分鐘。加入50

(89)

微升之 0.5 莫耳濃度 NaOH 溶液終止反應。

TRAP 可將對-硝基苯基磷酸鹽轉化成對硝基酚，其可在 405 毫微米下測量光密度定量的。TRAP 活性(破骨細胞發生的替代標識)與 405 毫微米下之光密度相關。將光密度對 α OPGL-1 濃度作圖示於圖 11，此測定顯示 α OPGL-1 可抑制破骨細胞形成。

● 抑制 OPGL 結合至其受體

α OPGL-1 藥效說明其能阻塞 OPG 配位體結合於其同源的受體，破骨細胞分化以及活化受體(ODAR，亦為習知的 RANK)。此測定使用均質的時間解析螢光共振(HTRF)偵測 α OPGL-1 結合於鎔-共軛結合的護骨素配位體(Eu-OPGL)。若 α OPGL-1 抑制 Eu-OPGL 結合於 ODAR，則螢光輸出將降低，且 α OPGL-1 之存在量將與螢光量成反比。

● 將 OPGL 用鎔標記，於 337 毫微米激發下會在 620 毫微米下發出放射光。將 ODAR 融合標誌及 Fc，再將此 Fc-ODAR-標誌-融合型蛋白用聯結別藻青色素(APC，在 620 毫微米激發下會在 665 毫微米下發出放射光)之抗-標誌抗體標記。因此，當 Eu-標記的 OPG 配位體結合於 Fc-ODAR-標誌/抗-標誌-APC 複合體時，當在 337 毫微米激發下會在 665 毫微米下發出放射光。

將 0.05 毫微克/毫升 Eu-OPGL 與各種濃度(0.1 至 150 毫微克/毫升)之 α OPGL-1 在測定緩衝液(50 毫莫耳濃度三羥甲基胺基甲烷，酸鹼度 8、100 毫莫耳濃度 NaCl、

(90)

0.05% NaN₃、0.1% BSA、以及 0.05% Tween 20)、室溫下預反應約一小時(預反應混合物)。亦用測定緩衝液製備 Fc-ODAR-標誌(1微克/毫升)以及抗-標誌-APC(2.5微克/毫升)之混合物，在室溫下反應一小時(氟鉻混合物)。然後合併等體積之預反應混合物及氟鉻混合物，在室溫下反應3小時。用微板分析器 Packard Discovery HTRF 計讀平板在 337毫微米下激發測量 665毫微米下發出之螢光。

當 α OPGL-1 與 Eu-OPG 配位體預反應後與 Fc-ODAR-標誌/抗-標誌-APC 混合，665毫微米之螢光強度會以劑量依存的方法減低，如圖 12，展現 α OPGL162 可有效地抑制 OPGL 結合於 ODAR。

實施例 6 獼猴之藥物動力學

將六隻雄性以及六隻雌性獼猴，年齡不大於 4.5 歲，體重 2 至 4 公斤分成 4 個劑量組。第 1 組由 3 隻雄性以及 3 隻雌性組成。第 2、3、及 4 組各自由 1 隻雄性以及 1 隻雌性組成。對第 1 組動物投用單一 SC 劑量的 1 毫克/公斤 α OPGL-1，而對第 2、3 以及 4 組動物分別投用單一 IV 劑量的 0.1、1.0、或 10.0 毫克/公斤 α OPGL-1。

動物投用的 α OPGL-1 係由轉染的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞所表現。採取血清樣品測定 α OPGL-1 之含量、抗體分析、及分析骨轉換率標識：血清 N-端肽(血清 N-Tx)、鹼性磷酸酶(ALP)、及血鈣(血 Ca)。亦收集尿液分析 N-端肽(尿液 N-Tx)及肌酸酐。

(91)

IV 投藥後血清之濃度-時間分佈圖，其特徵為三相分佈(圖 13)。最初，是快速分佈相，接著是顯著較低的濃度依存之平台相。最後觀察到快速除去的第三相。

完整的血清濃度-時間分佈圖之非隔間性分析係使用 WinNonlin 專業版(v1.5)，數據的指數分析則多至測試物品投藥後 14 天，猴子之藥物動力學研究則使用 10,000 毫微克/毫升以上之 α OPGL-1 並利用 SAAM II(v1.1.2) 分析。所有 IV 投藥之起始體積分佈平均為 28.9 毫升/公斤，與血漿體積相似。所有 IV 投藥之恆定狀態體積(V_{ss})分佈為平均 39 毫升/公斤。指數分析顯示 α OPGL-1 之平均分佈半生期($t_{1/2\alpha}$)為 6.02 小時，延伸的二級相之半生期($t_{1/2\beta}$)從劑量為 0.1 毫克/公斤時的 86.9 小時增加到劑量 10.0 毫克/公斤下的極大值 444 小時。所有 IV 投藥組之末端除去半生期($t_{1/2\alpha}$)估計的非隔間性平均為 31 小時。 α OPGL-1 之清除率(CL, CL/F)為非線性之清除率，動物接受 10 毫克/公斤 IV 劑量時之平均清除率(0.120 毫升/小時/公斤)比接受 0.1 毫克/公斤(0.401 毫升/小時/公斤)時低 3.3 倍。

於皮下投用之後，吸收緩慢，在 132 hr 之平均尖峰濃度(C_{max})為 11,600 毫微克/毫升。於 SC 投藥之後有高變異性之暴露，造成平均清除率為 $0.387+0.281$ 毫升/小/公斤，平均駐留時間為 $202+80.1$ 小時。平均生物效性為 89%。

以上的數據總結於表 5。

表 5：對獼猴 IV 及 SC 投用單一劑量之 α OPGL-1 後，平均 (\pm SD) 非隔間性藥物動力學參數 a。

(92)

參數	單位	非隔間性參數估計量					
		1.0 毫克 / 公斤	0.1 毫克 / 公斤	1.0 毫克 / 公斤	10 毫克 / 公斤	1.0 毫克 / 公斤	10 毫克 / 公斤
T_{max}	小時	SC (n=6)	IV (n=2)	IV (n=2)	IV (n=2)	IV (n=2)	
		平均	SD	平均	平均	平均	
		132	60.2	0	0	0	
C_{max}	毫微克 / 毫升	11600	3410	4330	38200	326000	
$t_{1/2z}$	小時	34.9	11.1	30.7	31.4	NDb	
$AUC_{(0-\infty)}$	微克 * 小時 / 毫升	3520	1750	253	3950	99900	
CL, CL/F	毫升 / 小時 / 公斤	0.387	0.281	0.401	0.256	0.120	
MRT	小時	202	80.1	84.8	124	519	
V_{ss}	毫升 / 公斤	N/Ac	N/A	33.7	31.7	55.9	

a 報導於 3 個有效數圖之數值

b 未測定，PK 樣品終止於平台期間 (β) 相，因此未觀察到末端相

c 未施用

(93)

α OPGL-1可在投用後24小時內導致血清 N-Tx 之含量快速降低(圖14)。從0.1至10毫克/公斤增加劑量之IV投用後，觀察到極大效應之平均時間介於12小時至7天之間，SC投用1.0毫克/公斤至動物後極大效應之平均時間介於12小時至11天。劑量範圍0.1至1毫克/公斤時，極大值效應隨劑量增加大約80至91%。然而在較高的劑量下無進一步的抑制，觀察到之極大抑制為91%。於IV投用0.1毫克/公斤之後28天，血清 N-Tx 之平均含量回復基線，於SC投用1毫克/公斤之後70天，血清 N-Tx 之平均含量回復基線。除了所有組在研究之第105天回復基線值之外，尿液之N-Tx與血清 N-Tx 顯示相似的趨勢(圖15)。

IV投藥10.0毫克/公斤之後平均七天，抑制血Ca隨劑量增加至平均谷底之基線下31.6%。所有其它劑量組血Ca之平均減低少於基線平均之26.4%。第17天所有處理動物的血Ca含量回復至其基線平均的10%之內(圖20)。

骨質重吸收以及形成係緊密地聯結，改變骨質形成標識(ALP)時亦可觀察到ALP之含量緩慢的下降，且比形成標識(N-Tx)的抑制長(圖21)。投服 α OPGL-1後觀察到骨質重吸收標識的降低係在骨質形成標識(ALP)的降低之前，因此證實 α OPGL-1為骨頭之抗重吸收劑。

多數的動物(12隻中之9隻)發展出 α OPGL-1抗體。發展出 α OPGL-1抗體之發生率與劑量或路徑無關。當劑量在0.1毫克/公斤以上，不可能評估 α OPGL-1抗體對 α OPGL-1之藥物動力學效應，因為無任何劑量組中有抗體陰的及陽

五、中文發明摘要

發明之名稱：護骨素(osteoprotegerin)配位體之抗體

本發明係關於與護骨素配位體(OPGL)交互作用之抗體。本發明係關於以投用醫藥學上有效量之 OPGL 抗體來治療骨質病症的方法。本發明係關於使用 OPGL 抗體偵測樣品中 OPGL 含量之方法。

六、英文發明摘要

發明之名稱：**ANTIBODIES TO OPGL**

ABSTRACT

Antibodies that interact with osteoprotegerin ligand (OPGL) are described. Methods of treating osteopenic disorders by administering a pharmaceutically effective amount of antibodies to OPGL are described. Methods of detecting the amount of OPGL in a sample using antibodies to OPGL are described.

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(2、4)圖

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

第 915.05 頁
日修(更)正替換頁

838646-1

發明專利說明書

公告本

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95103780

※申請日期：91年06月26日

※IPC分類：C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

一、發明名稱：

(中) 護骨素 (osteoprotgerin) 配位體之抗體

(英) Antibodies to OPGL

二、申請人：(共 2 人)

1. 姓名：(中) 艾恩傑夫利蒙股份有限公司
(英) AMGEN FREMONT INC.

代表人：(中) 1. 史都華 華特
(英) 1. WATT, STUART L.

地址：(中) 美國加州夫利蒙凱瑟大道六七〇一號
(英) 6701 Kaiser Drive, Fremont, CA 94555, U.S.A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

2. 姓名：(中) 艾恩傑股份有限公司
(英) AMGEN INC.

代表人：(中) 1. 史都特 瓦特
(英) 1. WATT, STUART L.

地址：(中) 美國加州千橡樹艾恩傑大道一號
(英) One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799, U. S. A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

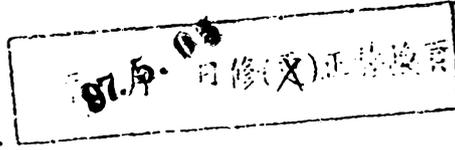
三、發明人：(共 4 人)

1. 姓名：(中) 威廉 波利
(英) BOYLE, WILLIAM J.

國籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

2. 姓名：(中) 法蘭西斯 馬丁
(英) MARTIN, FRANCIS H.

國籍：(中) 美國
(英) U.S.A.



3. 姓名：(中) 喬斯 卡芬蘭
(英) CORVALAN, JOSE R.
國籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

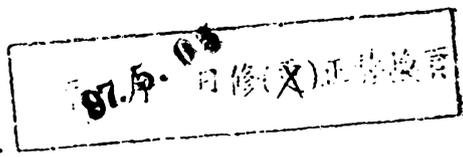
4. 姓名：(中) 克 戴維斯
(英) DAVIS, C. GEOFFREY
國籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2001/06/26 ; 60/301,172 有主張優先權



3. 姓名：(中) 喬斯 卡芬蘭
(英) CORVALAN, JOSE R.
國籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

4. 姓名：(中) 克 戴維斯
(英) DAVIS, C. GEOFFREY
國籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2001/06/26 ; 60/301,172 有主張優先權

性的動物。在 0.1 毫克/公斤 IV 時，多數的 α OPGL1 在發展出抗體之前已被清除，因此無法觀察到 α OPGL-1 堆積之效應 (圖 16)。

【圖式簡單說明】

圖 1 為編碼 α OPGL-1 抗體重鏈之互補型 DNA 序列 (序列確認號碼：1) 自 Hind/III 位點至 Sall 位點之重鏈表現質體的 DNA 序列。起始密碼子始於 nt14，終止密碼子始於 nt1415。

圖 2 為 α OPGL-1 抗體重鏈之胺基酸序列 (序列確認號碼：2) 劃線部份為 IgG2 信號肽，變異區用大寫字型表示且未在下面劃線，恆定區用小寫字型表示。

圖 3 為編碼 α OPGL-1 抗體輕鏈之互補型 DNA 序列 (序列確認號碼：3) 自 XbaI 位點至 Sall 位點之 κ 鏈表現質體的 DNA 序列。起始密碼子始於 nt12；終止密碼子始於 nt717。

圖 4 為 α OPGL-1 抗體輕鏈之胺基酸序列 (序列確認號碼：4) 劃線部份為 κ 信號肽，變異區用大寫字型表示且未在下面劃線，恆定區用小寫字型表示。

圖 5 為 α OPGL-1 Kappa 輕鏈表現質體 α OPGL-1-Kappa/pDSR α 19 的圖式。

圖 6 為 α OPGL-1 IgG2 重鏈表現質體 α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19 的圖式。

圖 7 顯示 α OPGL-1 劑量依存的結合至塗覆 OPGL 的

(95)

98年3月4日修正替換頁

EIA 平板將 96 孔之 EIA 板塗覆上重組型可溶解的 OPGL。於各孔中添加各種濃度 α OPGL-1，在室溫下反應約 2 小時。用山羊抗-人類 IgG(Fab')₂-辣根過氧化酶偵測結合的抗體。在 450 毫微米以及 650 毫微米下讀取吸光度。

圖 8 顯示 α OPGL-1 專一結合於與膜結合的 OPGL α OPGL-1 以劑量依存的方式結合經轉染的 CHO REN 218-9 細胞之細胞表面上表現的 OPGL。此結合會與外生性加入的人類 OPGL 競爭，但不會與 TNF- α 、TNF- γ 、TRAIL 或 CD40 配位體競爭。將 α OPGL-1 (100 毫微克/毫升) 與各種濃度之可溶解的 OPGL 或其他配位體預反應，然後與細胞表面上表現 OPGL 之 CHO REN 218-9 細胞反應。然後細胞在 2-8 °C 下與 FITC-標記的 F(ab')₂ 山羊抗-人類 IgG(Fc γ 專一片段) 反應 30 分鐘。於離心及清洗細胞表面之後，使用流式細胞儀測量螢光。

圖 9 顯示可溶解的 OPGL 抑制 α OPGL-1 結合於塗覆 OPGL 的 EIA 平板以外生性加入的可溶解性 OPGL 競爭性地降低 α OPGL-1 結合 EIA 板上之 OPGL。

圖 10 顯示 α OPGL-1 專一的結合於塗覆 OPGL 的 EIA 板外生性地加入 TNF- α 、TNF- β 、TRAIL 或 CD40 配位體並不會降低 α OPGL-1 結合 EIA 板上之 OPGL。

圖 11 顯示 α OPGL-1 劑量依存的抑制破骨細胞形成 α OPGL-1 劑量依存的抑制 RAW 264.7 細胞中經 OPGL-誘發的 TRAP 活性。

圖 12 顯示 α OPGL-1 劑量依存的抑制 OPGL 結合於

(96)

98年3月4日修正替換頁

ODA α OPGL-1 劑量依存的抑制以銻-標記的 OPGL 結合 ODAR-標誌 / 抗-標誌-APC。

圖 13 為對獼猴投用單一劑量 α OPGL-1 之後，平均血清濃度對時間之分佈圖靜脈內投遞劑量 0.1、1 及 10.0 毫克 / 公斤 (n=2 / 劑量) 及皮下投遞劑量 1.0 毫克 / 公斤 (n=6 / 劑量)。

圖 14 為對獼猴投用單一劑量 α OPGL-1 之後，血清中 N-Tx 濃度改變之平均百分比靜脈內投遞劑量 0.1、1 及 10.0 毫克 / 公斤 (n=2 / 劑量) 及皮下投遞劑量 1.0 毫克 / 公斤 (n=6)。

圖 15 為對獼猴投用單一劑量 α OPGL-1 之後，尿液中 N-Tx 濃度改變之平均百分比靜脈內投遞劑量 0.1、1 及 10.0 毫克 / 公斤 (n=2 / 劑量) 及皮下投遞劑量 1.0 毫克 / 公斤 (n=6 / 劑量)。

圖 16 為對獼猴投用單一劑量 α OPGL-1 之後，抗體陽性 (中空點) 及陰性 (實心點) 的血清濃度對時間之分佈圖。

圖 17 為 α OPGL-1 抗體重鏈變異區之胺基酸序列 (序列確認號碼：13)。

圖 18 為 α OPGL-1 抗體輕鏈變異區之胺基酸序列 (序列確認號碼：14)。

圖 19 為產生 α OPGL-1 之細胞培養方法。

圖 20 為對獼猴投用單一劑量 α OPGL-1 之後，血清鈣自基礎值之變化百分比。

圖 21 為對獼猴投用單一劑量 α OPGL-1 之後，血清中鹼

I326285

附件 3A : 第 95103780 號專利申請案

中文說明書替換頁

民國 98 年 3 月 4 日修正

(97)

98年3月4日修正替換頁

性磷酸酶自基礎值之平均變化百分比。

序列表

98年3月4日修正本

<110>艾恩傑夫利蒙股份有限公司

<120>護骨素(osteoprotegerin)配位體之抗體

<140>095103780

<141>2002-06-26

<150>60/301,172

<151>2001-06-26

<160>20

<170>PatentIn 版本 3.1

<210>1

<211>1426

<212>DNA

<213>家鼠

<400>1

```

aagcttgacc accatggagt ttgggctgag ctggcttttt cttgtggcta ttttaaaagg      60
tgtccagtgt gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc      120
cctgagaactc tctgtgagc cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt      180
ccgccaggct ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcaggt attactggga gtggtggtag      240
tacatactac gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa      300
cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc      360
gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttggttcgac cctgggggcc agggaaccct      420
ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc      480
caggagcacc tccgagagca cagcggcctt gggctgcctg gtcaaggact acttccccga      540
accggtgacg gtgtcgtgga actcagggcg tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc      600
tgtctacag tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa      660

```

cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga 720
 caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc 780
 aggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac 840
 ccctgaggtc acgtgctgtg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa 900
 ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt 960
 caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg 1020
 caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gcccctatcg agaaaacat 1080
 ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1140
 ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga 1200
 catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc 1260
 catgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 1320
 gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 1380
 cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgataa gtcgac 1426

<210>2

<211>1467

<212>DNA

<213>家鼠

<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
 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 Gln 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

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>家鼠

<400> 3
 tctagaccac catgaaacc ccagcgcagc ttctcttctt cctgctactc tggctcccag 60
 ataccaccgg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg 120
 aaagagccac cctctcctgt agggccagtc agagtgttcg cggcaggtac ttagcctggt 180
 accagcagaa acctggccag gctcccaggc tctcatcta tggatgatcc agcagggcca 240
 ctggcatccc agacagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcaccatca 300
 gcagactgga gcctgaagat tttgcagtggt tttactgtca gcagtatggt agttcacctc 360
 ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct 420
 tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgctctgtgt gtgtgcctgc 480
 tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat 540
 cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca 600
 gcagaccctt gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag 660
 tcaccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat 720
 aagtcgac 728

<210>4

<211>235

<212>PRT

<213>家鼠

<400>4

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 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

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>人造序列

<220>

<223>5' κRACE 引子

<400>5

gatgaccag tctccagcca ccctg

25

<210>6

<211>23

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>3' κRACE 引子

<400>6

aagggtcaga ggccaaagga tgg

23

<210>7

<211>30

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>5'抗-OPGL-1 κ 引子

<400>7

caactctaga ccaccatgga aaccccagcg

30

<210>8

<211>37

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>3'抗-OPGL-1 κ 引子

<400>8

tttgacgtcg acttatcaac actctcccct gttgaag

37

<210>9

<211>23

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>5' IgG2RACE 引子

<400>9

ggcacggtca ccacgctgct gag

23

<210>10

<211>24

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>3' IgG2RACE 引子

<400>10

cctccaccaa gggcccatcg gtct

24

<210>11

<211>51

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>5'抗-OPGL-1 IgG2引子

<400>11

cagaagcttg accaccatgg agtttgggct gagctggctt tttcttgtgg c

51

<210>12

<211>37

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>3'抗-OPGL-1 IgG2引子

<400>12

gcatgtcgac ttatcattta cccggagaca gggagag

37

<210>13

<211>122

<212>PRT

<213>家鼠

<400>13

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

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>家鼠

<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

<212>PRT

<213>人造序列

<220>

<223>轉譯一部份3'抗-OPGL-1 κ引子

<400>17

Cys Glu Gly Arg Asn Phe
1 5

<210>18

<211>12

<212>PRT

<213>人造序列

<220>

<223>轉譯一部份5'抗-OPGL-1 IgG2引子

<400>18

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

<210>19

<211>7

<212>PRT

<213>人造序列

<220>

<223>轉譯一部份3'抗-OPGL-1 IgG2引子

<400>19

Lys Gly Pro Ser Leu Ser Leu
1 5

<210>20

<211>10

<212>PRT

<213>人造序列

<220>

<223>LHRH 拮抗劑肽

<220>

<221>MISC_特色

<222>(1)…(1)

<223>Xaa 爲 Ac-D-Nal，其中 Nal 爲 3-(2-萘基)丙胺醯基

<220>

<221>MISC 特色

<222>(2)…(2)

<223>Xaa 爲 (4'-氯苯基)丙胺醯基

<220>

<221>MISC 特色

<222>(3)…(3)

<223>Xaa 爲 D-Pal，其中 Pal 爲 3-(3'-吡啶基)丙胺醯基

<220>

<221>MISC 特色

<222>(5)…(5)

<223>Xaa 爲 N-甲基酪胺酸

<220>

<221>MISC 特色

<222>(6)…(6)

<223>Xaa 爲 D-天門冬醯胺酸

<220>

<221>MISC 特色

<222>(8)···(8)

<223>Xaa 爲 N-ε-2-丙基-離胺醯基

<220>

<221>MISC 特色

<222>(10)···(10)

<223>Xaa 爲 D-丙胺酸-NH₂

<400>20

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

十、申請專利範圍

99年3月(6日修(美)正本

公告本

附件 3A :

第 95103780 號 專利 申請 案

中文 申請 專利 範圍 替換 本

民國 99 年 3 月 16 日 修正

1. 一種組成物，其包含第一多核苷酸和第二多核苷酸，其中該第一多核苷酸編碼重鏈且該第二多核苷酸編碼輕鏈，其中

a) 該重鏈包含

1) SEQ ID NO: 2 所示之胺基酸序列；或

2) SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列；且

b) 該輕鏈包含

1) SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列；或

2) SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列；且

其中包含該重鏈和輕鏈之抗體與護骨素配位體(OPGL)交互作用。

2. 如請求項 1 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈且該第二多核苷酸編碼輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 所示之胺基酸序列且該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列。

3. 如請求項 1 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈且該第二多核苷酸編碼輕鏈，該重鏈係由 SEQ ID NO: 2 所示之胺基酸序列所構成且該輕鏈係由 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列所構成。

4.如請求項 1 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈且該第二多核苷酸編碼輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列且該輕鏈包含 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列。

5.如請求項 4 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 自殘基 20 至殘基 467 所示之胺基酸序列。

6.如請求項 4 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈，該重鏈係由 SEQ ID NO: 2 自殘基 20 至殘基 467 所示之胺基酸序列所構成。

7.如請求項 4 之組成物，其中該第二多核苷酸編碼輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列。

8.如請求項 6 之組成物，其中該第二多核苷酸編碼輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列。

9.如請求項 4 之組成物，其中該第二多核苷酸編碼輕鏈，該輕鏈係由 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列所構成。

10.如請求項 5 之組成物，其中該第二多核苷酸編碼輕鏈，該輕鏈係由 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列所構成。

11.如請求項 4 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈且該第二多核苷酸編碼輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID

NO: 2 自殘基 20 至殘基 467 所示之胺基酸序列且該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列。

12. 如請求項 4 之組成物，其中該第一多核苷酸編碼重鏈且該第二多核苷酸編碼輕鏈，該重鏈係由 SEQ ID NO: 2 自殘基 20 至殘基 467 所示之胺基酸序列所構成且該輕鏈係由 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列所構成。

13. 如請求項 1 之組成物，其中該第一多核苷酸包含 SEQ ID NO: 1 所示之核苷酸序列且該第二多核苷酸包含 SEQ ID NO: 3 所示之核苷酸序列。

14. 如請求項 1 之組成物，其中該重鏈和輕鏈形成單鏈抗體。

15. 如請求項 11 之組成物，其中該重鏈和輕鏈形成單鏈抗體。

16. 如請求項 14 之組成物，其中該重鏈和輕鏈形成單鏈 Fv 抗體。

17. 如請求項 15 之組成物，其中該重鏈和輕鏈形成單鏈 Fv 抗體。

18. 如請求項 1 之組成物，其中該重鏈和輕鏈形成 Fab 抗體、Fab' 抗體或 (Fab')₂ 抗體。

19. 如請求項 1 至 18 中任一項之組成物，其中該重鏈和輕鏈形成全長人抗體。

20. 如請求項 1 至 18 中任一項之組成物，其中該重鏈

和輕鏈形成抗體，該抗體抑制護骨素配位體(OPGL)與破骨細胞之分化及活化受體(ODAR)結合。

21.如請求項 1 至 18 中任一項之組成物，其中該第一和第二多核苷酸係為相同核酸分子之部分。

22.如請求項 1 至 18 中任一項之組成物，其中該第一和第二多核苷酸係為個別核酸分子之部分。

23.如請求項 21 之組成物，其中該核酸分子係載體。

24.如請求項 22 之組成物，其中該第一多核苷酸係第一載體之部分且該第二多核苷酸係第二載體之部分。

25.如請求項 23 之組成物，其中該載體係病毒載體。

26.如請求項 24 之組成物，其中該第一載體和第二載體中至少一者係病毒載體。

27.一種宿主細胞，其包含如請求項 1 至 18 中任一項之組成物。

28.一種宿主細胞，其包含如請求項 21 之組成物。

29.一種宿主細胞，其包含如請求項 22 之組成物。

30.如請求項 27 之宿主細胞，其係為原核宿主細胞或真核宿主細胞。

31.如請求項 30 之宿主細胞，其係為哺乳動物宿主細胞。

32.如請求項 31 之宿主細胞，其中該宿主細胞選自中國倉鼠卵巢細胞、HeLa 細胞、幼倉鼠腎臟細胞、猴腎臟細胞或人肝癌細胞。

33.如請求項 28 之宿主細胞，其係為原核宿主細胞或

真核宿主細胞。

34.如請求項 33 之宿主細胞，其係為哺乳動物宿主細胞。

35.如請求項 34 之宿主細胞，其中該宿主細胞選自中國倉鼠卵巢細胞、HeLa 細胞、幼倉鼠腎臟細胞、猴腎臟細胞或人肝癌細胞。

36.如請求項 29 之宿主細胞，其係為原核宿主細胞或真核宿主細胞。

37.如請求項 36 之宿主細胞，其係為哺乳動物宿主細胞。

38.如請求項 37 之宿主細胞，其中該宿主細胞選自中國倉鼠卵巢細胞、HeLa 細胞、幼倉鼠腎臟細胞、猴腎臟細胞或人肝癌細胞。

39.一種產製與護骨素配位體(OPGL)交互作用的抗體之方法，其包含培養如請求項 27 至 38 中任一項之宿主細胞。

40.一種多核苷酸，其編碼輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列，其中包含該輕鏈和一重鏈之抗體與人護骨素配位體(OPGL)交互作用，該重鏈包含 SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列。

41.如請求項 40 之多核苷酸，其編碼輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 所示之胺基酸序列。

42.如請求項 40 之多核苷酸，其編碼輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列。

43.如請求項 40 之多核苷酸，其編碼輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列。

44.如請求項 40 之多核苷酸，其編碼輕鏈，該輕鏈係由 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列所構成。

45.一種載體，其包含如請求項 40 至 44 中任一項之多核苷酸。

46.如請求項 45 之載體，其係為病毒載體或反轉錄病毒載體。

47.一種經分離之抗體，其包含

a)重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 自殘基 20 至殘基 467 所示之胺基酸序列；及

b)輕鏈，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列。

48.如請求項 47 之抗體，其包含重鏈和輕鏈，該重鏈係由 SEQ ID NO: 2 自殘基 20 至殘基 467 所示之胺基酸序列所構成且該輕鏈係由 SEQ ID NO: 4 自殘基 21 至殘基 235 所示之胺基酸序列所構成。

圖 1

98年3月4日(實)正本

公告本

1 AAGCTTGACC ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTTT CTTGTGGCTA TTTTAAAAGG
 61 TGTCCAGTGT 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 GTGTGCTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCCTGCACA CCTTCCCAGC
 601 TGTCCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCCTGC CCTCCAGCAA
 661 CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
 721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC
 781 AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCEAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
 841 CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
 901 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
 961 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG
 1021 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT
 1081 CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA
 1141 GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
 1201 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
 1261 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG CTCACCCTGG ACAAGAGCAG
 1321 GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
 1381 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGATAA GTCGAC (SEQ ID NO: 1)

圖 2

1 MEFGLSWLFL VAILKGVQCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
61 GKGLEWVSGI TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
121 TTVIMSWFDP WGQGLVTVS sastkgpsvf plapcsrsts estaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsgaltsg vhtfpavlsq sglyslssv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkve
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
301 gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkglpa piektisktk
361 gqprepvyt lppsreemtk nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmlds
421 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk (SEQ ID NO: 2)

圖 3

1 TCTAGACCAC CATGGAAACC CCAGCGCAGC TTCTCTTCCT CCTGCTACTC TGGCTCCCAG
61 ATACCACCGG AGAAATTGTG TTGACGCAGT CTCCAGGCAC CCTGTCTTTG TCTCCAGGGG
121 AAAGAGCCAC CCTCTCCTGT AGGGCCAGTC AGAGTGTTTCG CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGGTGCATCC AGCAGGGCCA
241 CTGGCATCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTCACCTC
361 GGACGTTCGG 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 GCAGCACCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
661 TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTGAT
721 AAGTCGAC (SEQ ID NO: 3)

圖 4

1 METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
51 GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
101 PEDFAVFYQC QYGSSPRTFG QGTKVEIKrt vaapsvfifp psdeqlksgt
151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdsd dstyslsstl
201 tlskadyekh kvyacevthq glsspvtksf nrgcc (SEQ ID NO: 4)

圖 5

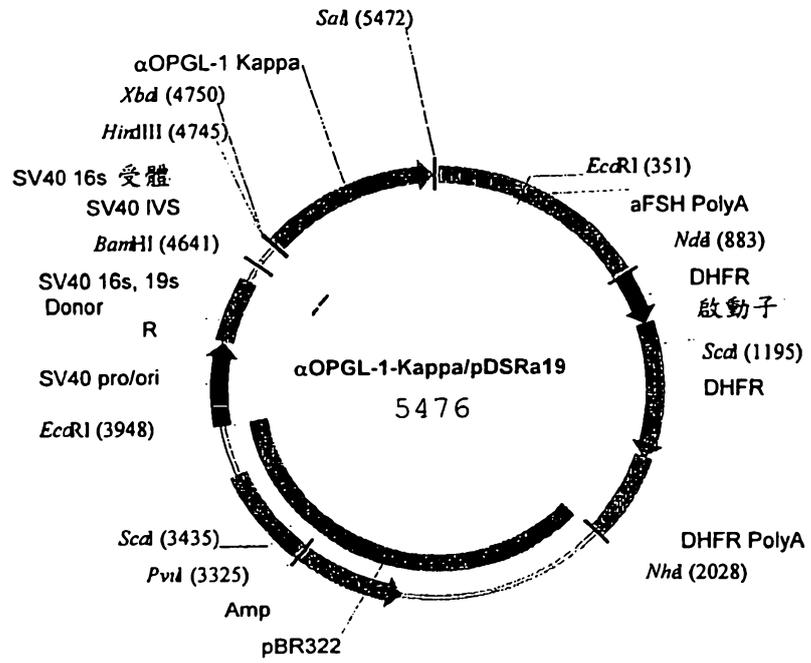


圖 6

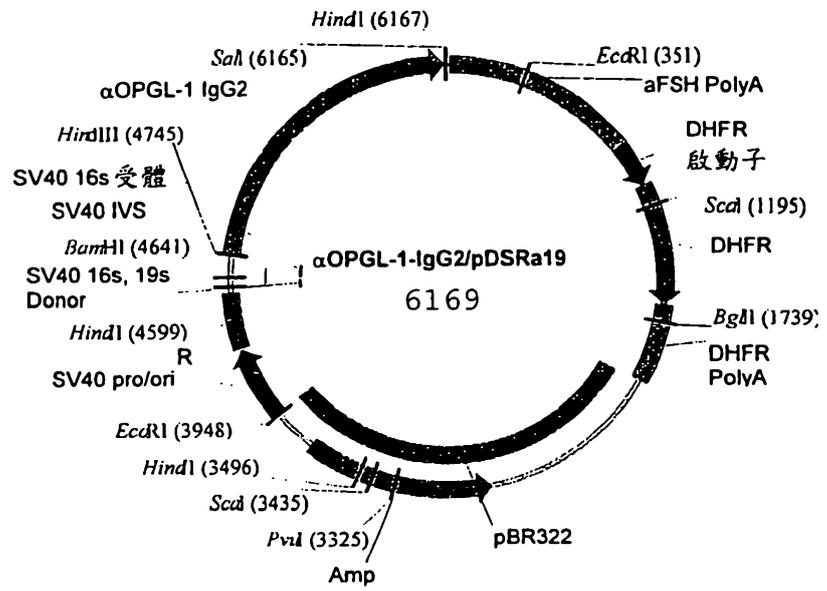


圖 7

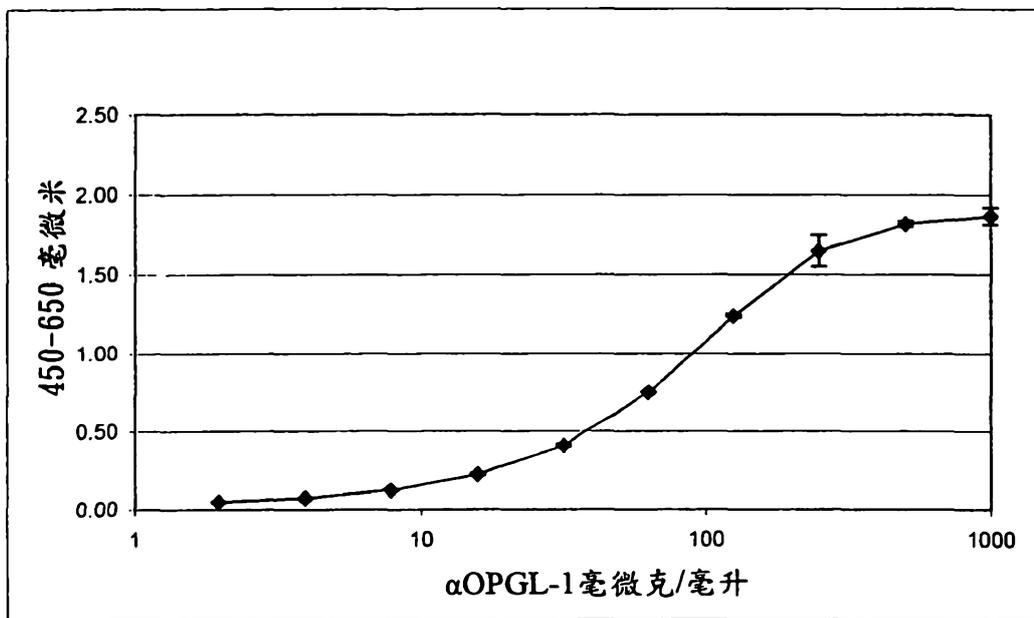


圖 8

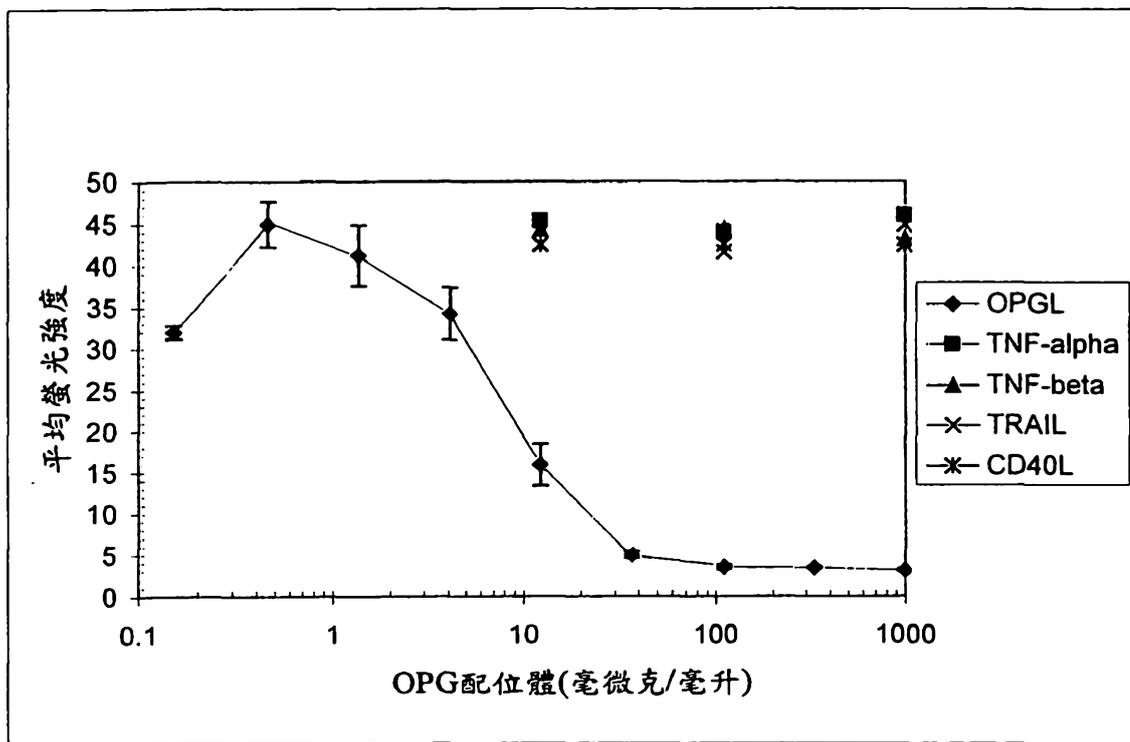


圖 9

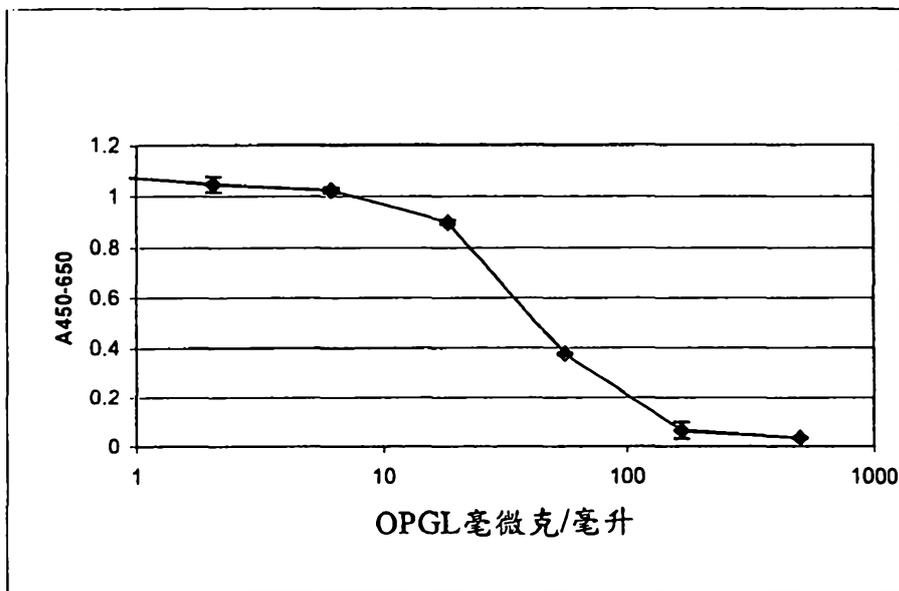


圖 10

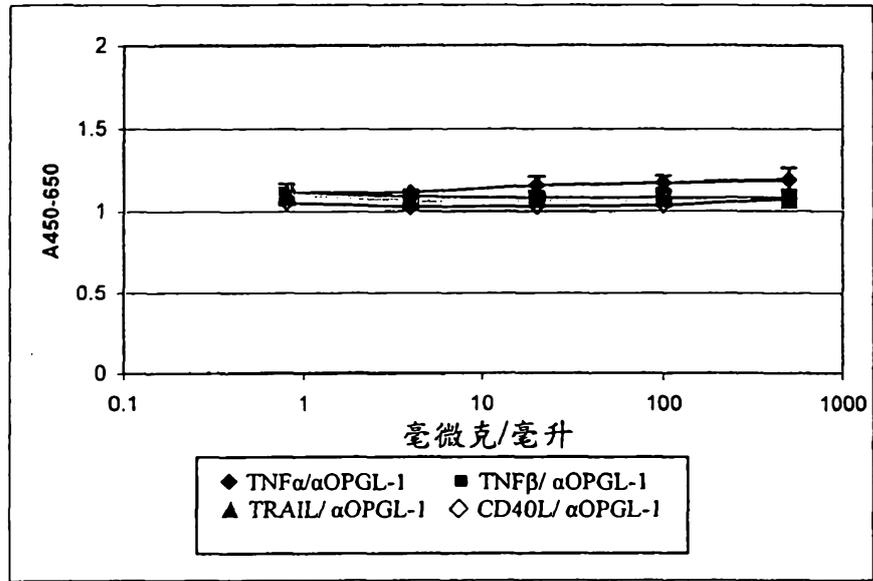


圖 11

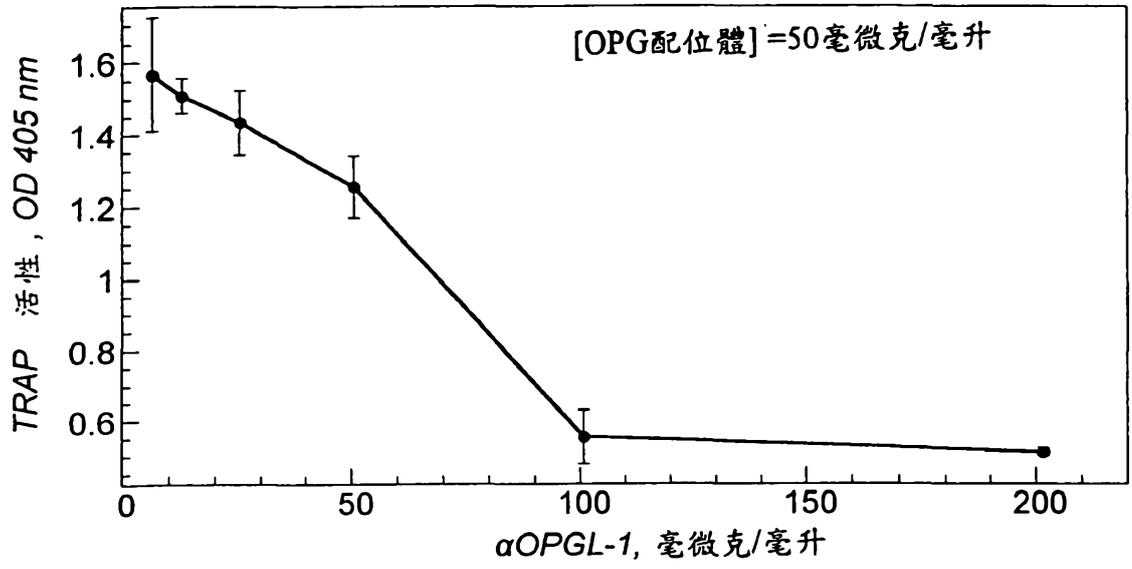


圖 12

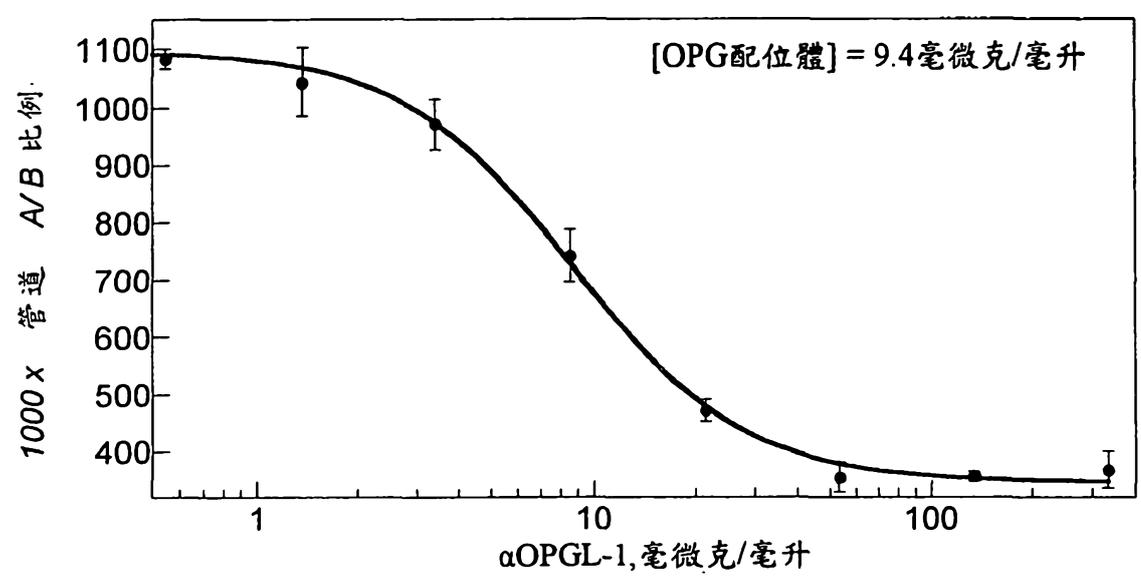


圖 13

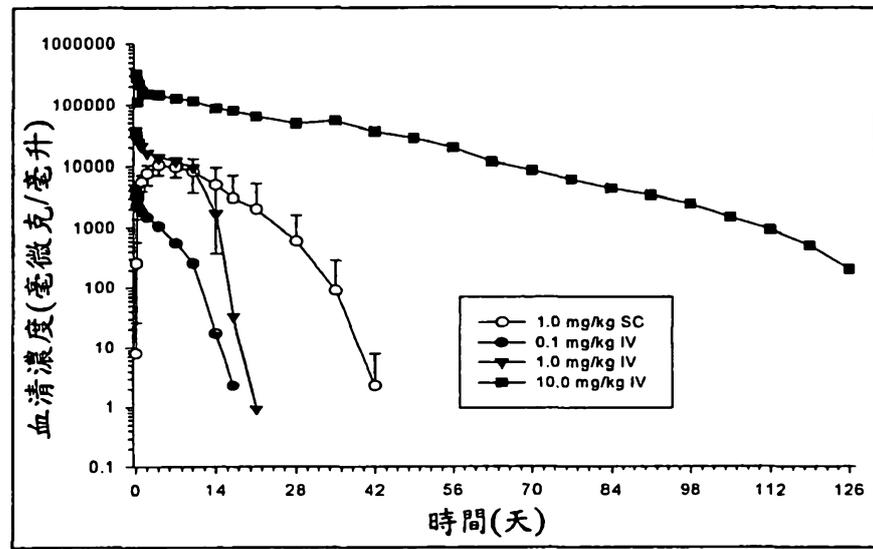


圖 14

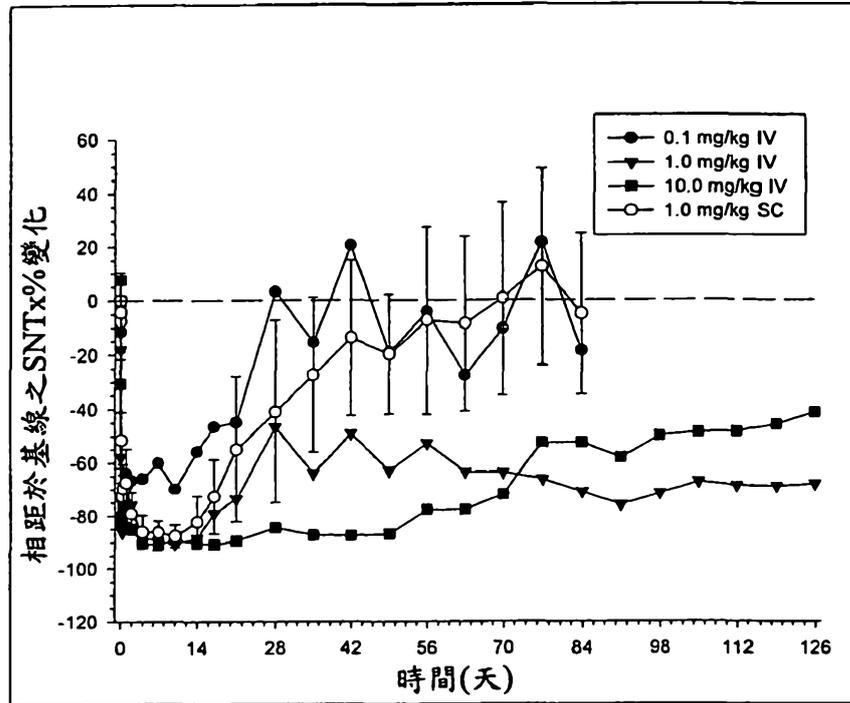


圖 15

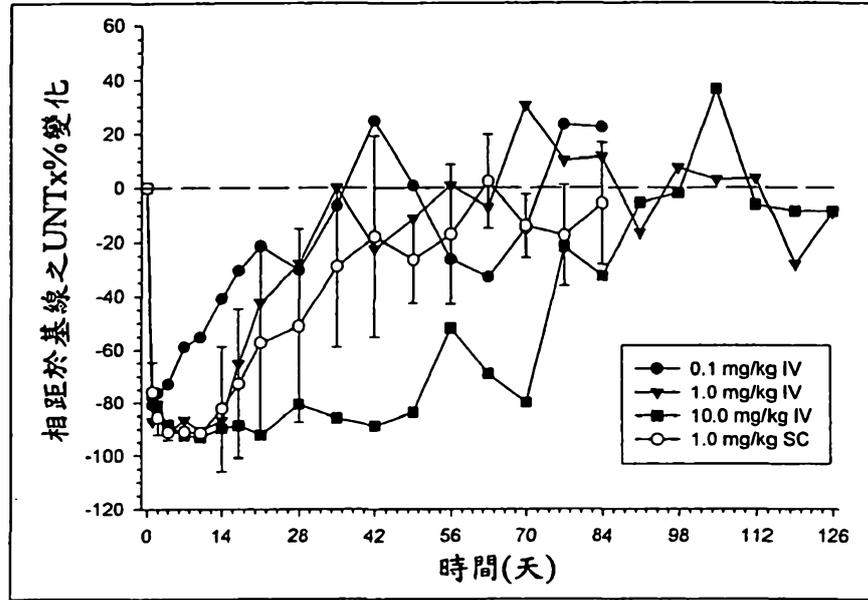


圖 16

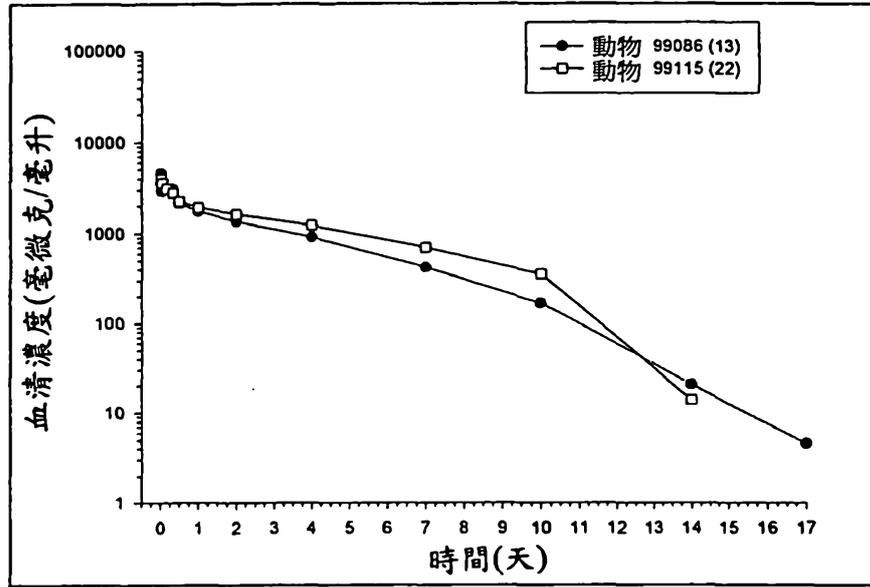


圖 17

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA
41 PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
81 LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGTLVTV
121 SS (SEQ ID NO: 13)

圖 18

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

圖 19

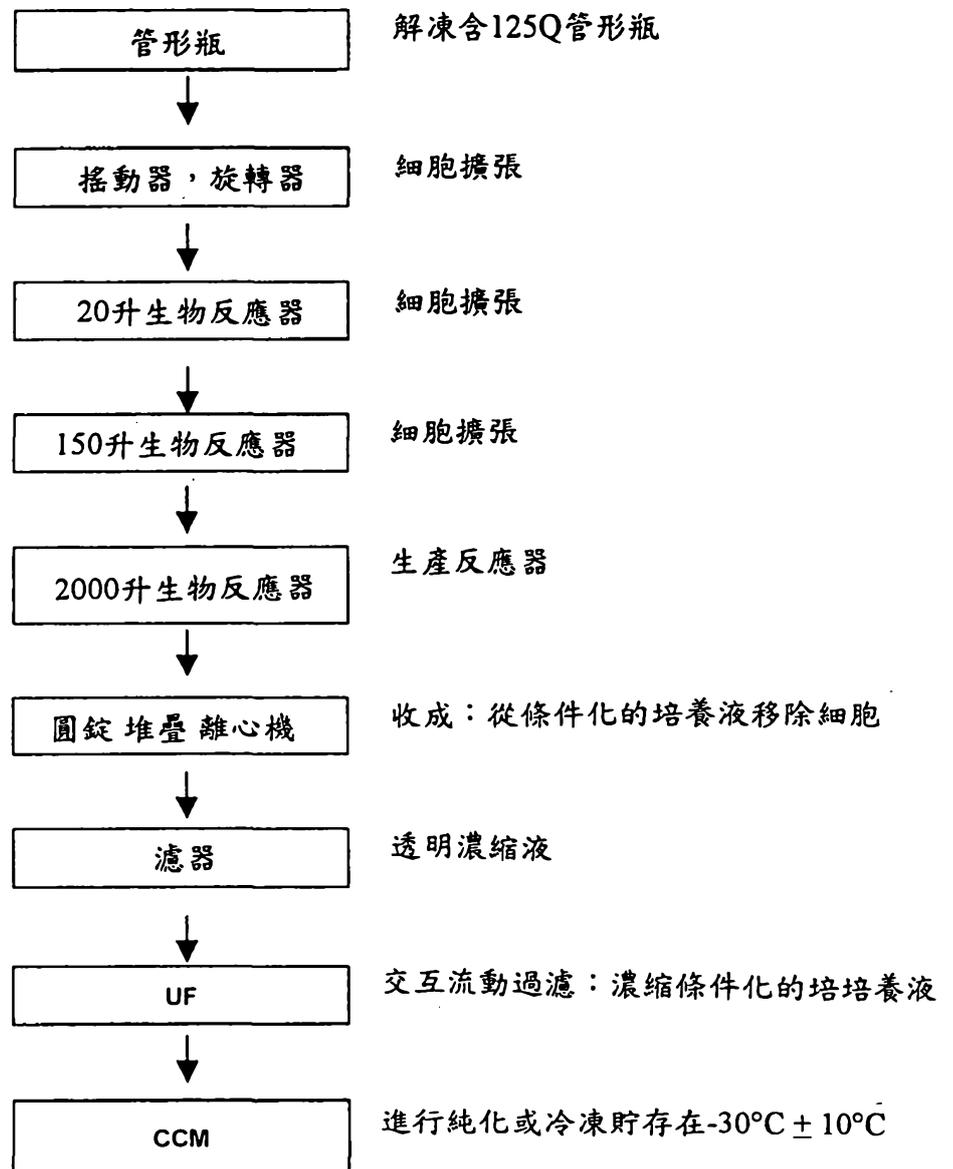


圖 20

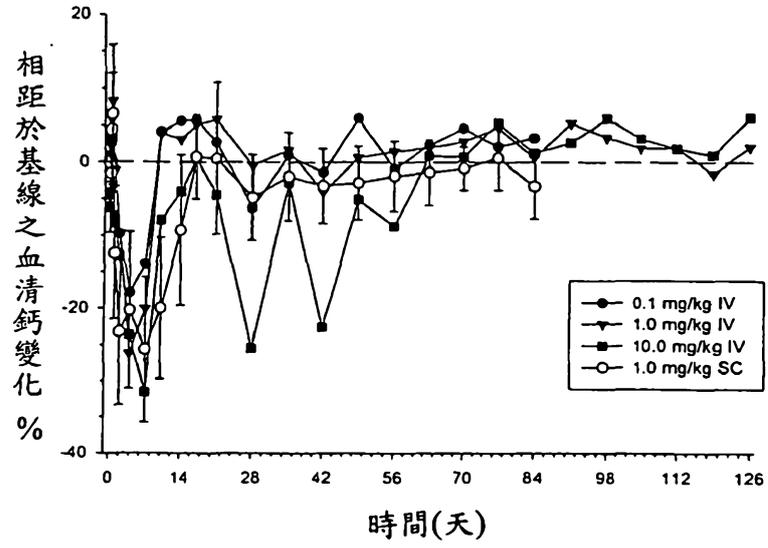


圖 21

