



(10) 授权公告号 CN 112166120 B

(45) 授权公告日 2024.09.10

(21) 申请号 201980035260.3

(22) 申请日 2019.03.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112166120 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(30) 优先权数据  
62/650,762 2018.03.30 US  
62/812,741 2019.03.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.11.25

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/024739 2019.03.29

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/191534 EN 2019.10.03

(73) 专利权人 安姆根有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 黄浙 J·L·史蒂文斯 G·弗林  
S·弗多尔 M·达理斯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038  
专利代理师 李程达

(51) Int.Cl.  
C07K 16/00 (2006.01)  
C07K 16/22 (2006.01)  
A61P 19/10 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2009039175 A2, 2009.03.26  
WO 2011143307 A1, 2011.11.17  
WO 2014159579 A1, 2014.10.02  
审查员 姚进孝

权利要求书1页 说明书22页  
序列表12页 附图3页

(54) 发明名称

C末端抗体变体

(57) 摘要

本发明总体上涉及具有C末端修饰的抗硬骨素抗体、以及包含此类抗体的组合物。

1. 一种抗体,该抗体与SEQ ID NO: 1所示的硬骨素特异性结合并且包含SEQ ID NO: 2-7中所示的六个CDR,其中该抗体包含重链,该重链包含在该重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8)或Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO: 11),并且该抗体包含SEQ ID NO: 12中所示的轻链和SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO:14中所示的重链。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中该重链的C末端被酰胺化。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中两条重链的C末端均包含氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8)。

4. 如权利要求3所述的抗体,其中两条重链的C末端均被酰胺化。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体,该抗体包含SEQ ID NO: 12中所示的轻链、和SEQ ID NO: 13中所示的重链。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体,该抗体包含SEQ ID NO: 12中所示的轻链、和SEQ ID NO: 14中所示的重链。

7. 一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1-6中任一项所述的抗体的群体、和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中该抗体的群体的全部或部分包含重链,该重链包含被酰胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8)序列。

9. 如权利要求8所述的药物组合物,其中该抗体的群体的小于35%是单酰胺化的。

10. 如权利要求7所述的药物组合物,其中该抗体的群体的全部或部分在两条重链中均包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8)序列。

11. 如权利要求10所述的药物组合物,其中该抗体的群体的全部或部分包含两条重链,该两条重链在两条重链上均包含被酰胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO: 8)序列。

12. 如权利要求11所述的药物组合物,其中该抗体的群体的小于35%在两条重链上均被酰胺化。

13. 如权利要求7-12中任一项所述的药物组合物,其中该抗体的群体的小于35%包含未被酰胺化的重链。

14. 如权利要求7-12中任一项所述的药物组合物,其中该抗体的群体的33%未被酰胺化、该抗体的群体的33%包含一条酰胺化的重链、并且该抗体的群体的33%包含两条酰胺化的重链。

15. 如权利要求7-12中任一项所述的药物组合物,该药物组合物进一步包含钙盐、乙酸盐缓冲液、多元醇、和表面活性剂。

16. 如权利要求15所述的药物组合物,其中该钙盐包含乙酸钙。

17. 如权利要求15所述的药物组合物,其中该乙酸盐缓冲液包含乙酸钠。

18. 如权利要求15所述的药物组合物,其中该多元醇包含蔗糖。

19. 如权利要求15所述的药物组合物,其中该表面活性剂包含聚山梨醇酯20。

20. 如权利要求7-12中任一项权利要求所述的药物组合物,该药物组合物进一步包含55 mM乙酸盐、13 mm钙、6.0%w/v蔗糖、0.006%w/v聚山梨醇酯20,pH 5.2。

21. 权利要求7-12中任一项所述的组合物在制备用于增加受试者中骨矿物质密度的试剂中的用途。

## C末端抗体变体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年3月30日提交的美国临时申请号62/650,762和于2019年3月1日提交的美国临时申请号62/812,741的优先权权益,这些披露的每者的内容通过引用以其整体结合在此。

### 技术领域

[0003] 本发明总体上涉及具有至少一个C末端修饰的抗硬骨素抗体、以及包含此类抗体的组合物。

[0004] 通过引用结合以电子方式提交的材料

[0005] 通过引用以其整体结合在此的是计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表,该核苷酸/氨基酸序列表与本文同时提交并如下定义:创建于2019年3月21日的ASCII(文本)文件名称“52080\_SeqListing.txt”,21,006字节。

[0006] 通过引用结合

[0007] 以下申请通过引用以其整体结合在此:于2012年8月2日提交的国际专利公开号PCT/US2012/049331,其要求于2011年8月4日提交的美国临时专利申请号61/515,191的权益;于2006年4月25日提交的美国专利申请号11/410,540,其要求于2006年4月17日提交的美国临时专利申请号60/792,645、于2006年3月13日提交的美国临时专利申请号60/782,244、于2006年2月24日提交的美国临时专利申请号60/776,847、和于2005年5月3日提交的美国临时专利申请号60/677,583的权益;以及于2006年4月25日提交的美国专利申请号11/411,003(以美国专利号7,592,429发布),其要求于2006年4月17日提交的美国临时专利申请号60/792,645、于2006年3月13日提交的美国临时专利申请号60/782,244、于2006年2月24日提交的美国临时专利申请号60/776,847、和于2005年5月3日提交的美国临时专利申请号60/677,583的权益。以下申请也通过引用结合在此:于2008年9月17日提交的美国专利申请号12/212,327,其要求于2007年9月17日提交的美国临时专利申请号60/973,024的权益;以及于2010年6月29日提交的美国专利申请号12/811,171,其是依照于2008年12月15日提交的国际专利申请号PCT/US08/86864的35U.S.C. §371的美国国家阶段申请,其要求于2007年12月14日提交的美国临时专利申请号61/013,917的权益。

### 背景技术

[0008] 骨矿物质含量的损失可以由多种条件引起,并可能导致严重的医学问题。例如,骨质疏松症是人类中的使人衰弱的疾病,并且特征在于骨骼骨质量和矿物质密度显著下降、骨骼结构恶化(包括骨微结构的退化和骨脆性的相应增加(即,骨强度降低))、以及患病个体易骨折。尽管骨质疏松症被认为是由于骨量减少导致骨折的风险增加,但目前可用的骨骼障碍治疗方法很少能增加成人的骨密度,并且目前大多数治疗方法主要通过抑制进一步骨再吸收而不是刺激新骨形成发挥作用。目前实行开具雌激素处方以延缓骨质流失。然而,关于患者是否获得任何长期益处,并且雌激素是否对75岁以上的患者有任何影响存在争

议。此外,据信使用雌激素会增加患乳腺癌和子宫内膜癌的风险。对绝经后妇女还建议使用降钙素,添加维生素K、或高剂量膳食钙、添加或不添加维生素D的骨钙素。然而,高剂量的钙通常具有不希望的胃肠道副作用,并且必须连续监测血清和尿钙水平(例如,Khosla和Riggs,Mayo Clin.Proc.[梅奥诊所的程序]70:978982,1995)。目前其他治疗骨质疏松症的方法包括二膦酸盐(例如,Fosamax<sup>TM</sup>、Actonel<sup>TM</sup>、Bonviva<sup>TM</sup>、Zometa<sup>TM</sup>、奥帕膦酸盐(olpadronate)、奈立膦酸盐(neridronate)、替鲁膦酸盐(skelid)、骨膦(bonefos))、甲状旁腺激素、解钙药(calcilytic)、拟钙剂(calcimimetic)(例如,西那卡塞)、他汀类、合成代谢类固醇、镧和锆盐、以及氟化钠。然而,这些治疗剂通常与不希望的副作用有关(参见Khosla和Riggs,同上)。

[0009] 硬骨素(SOST基因的产物)在硬化性骨化病(特征在于骨骼过度生长和强密度骨的骨骼疾病)中是不存在的(Brunkow等人,Am.J.Hum.Genet.[美国人类遗传学杂志],68:577-589,2001;Balemans等人,Hum.Mol.Genet.[人类分子遗传学],10:537-543,2001)。人类硬骨素的氨基酸序列由Brunkow等人(如上)报道,并且在本文中披露为SEQ ID NO:1。硬骨素是介导骨密度增加的有价值的靶。

### 发明内容

[0010] 在一方面,本文描述的是与SEQ ID NO:1的硬骨素特异性结合、并且包含SEQ ID NO:2-7中所示的六个CDR的组的抗体,其中该抗体包含重链,该重链包含在重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)。在一些实施例中,抗体包含轻链可变区和重链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,该重链可变区包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体包含在重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO:11)。在一些实施例中,抗体包含第一重链和第二重链,该第一重链包含在第一重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8),该第二重链包含野生型重链氨基酸序列(即,缺乏C末端Pro-Ala-Arg-Gly)。在一些实施例中,抗体包含SEQ ID NO:12中所示的轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:13中所示的重链氨基酸序列。在一些实施例中,抗体包含在重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly-Lys(SEQ ID NO:11)。在一些实施例中,抗体包含SEQ ID NO:12中所示的轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:14中所示的重链氨基酸序列。

[0011] 在一些实施例中,抗体的重链之一的C末端被酰胺化(即,抗体是单酰胺化的)。在一些实施例中,抗体的两条重链的C末端被酰胺化(即,抗体是双重酰胺化的)。

[0012] 本披露还提供了包含本文描述的抗体的群体、和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施例中,药物组合物包含与SEQ ID NO:1的硬骨素特异性结合的抗体的混合物和药学上可接受的载体,其中该抗体的混合物包含抗体的群体,该抗体的群体包含在重链的C末端具有氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)的重链。在一些实施例中,组合物中约3%-5%的抗体是包含重链的抗体的群体,该重链在重链的C末端具有氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)。在一些方面,抗体的群体的小于70%在一条或两条重链上被酰胺化。在一些方面,抗体的群体的全部或部分包含单个重链,该单个重链包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)序列,该单个重链任选地被酰胺化。在一些方面,抗体的群体的全部或部分在两个重链中包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)序列,并且两个重链

任选地被酰胺化。任选地,抗体的群体的小于约35%是单酰胺化的、和/或抗体的群体的小于约35%在两条重链上被酰胺化、和/或抗体的群体的小于约35%包含未被酰胺化的重链。在这一点上,在多个方面,抗体的群体的约33%未被酰胺化、抗体的群体的约33%包含一条酰胺化的重链、并且抗体的群体的约33%包含两条酰胺化的重链。

[0013] 在一些实施例中,组合物进一步包含钙盐、乙酸盐缓冲液、多元醇、和表面活性剂。在一些实施例中,乙酸盐包含乙酸钙,乙酸盐缓冲液包含乙酸钠,多元醇包含蔗糖,并且表面活性剂包含聚山梨醇酯20。在一些实施例中,组合物包含55mM乙酸盐、13mm钙、6.0% (w/v) 蔗糖、和0.006% (w/v) 聚山梨醇酯20, pH 5.2。

[0014] 本披露还提供了增加有需要的受试者中骨矿物质密度的方法,该方法包括以有效增加受试者中骨矿物质密度的量向受试者给予本文描述的组合物。

### 附图说明

[0015] 图1提供了编码野生型洛莫索珠单抗 (romosozumab) 的C末端的部分的核酸序列。

[0016] 图2提供了编码洛莫索珠单抗C末端变体 (PARG变体) 的C末端的部分的核酸序列。

[0017] 图3是显示野生型洛莫索珠单抗 (虚线)、与用Lys-C消化并通过LC/MS肽作图分析的洛莫索珠单抗PARG变体 (实线) 的放大的UV谱的叠加图。

[0018] 图4是显示经羧肽酶处理的洛莫索珠单抗PARG变体 (虚线)、与未经处理的洛莫索珠单抗PARG变体 (实线) 的阳离子交换 (CEX) 谱的叠加图。

[0019] 图5是显示皮下注射的剪刀模型 (Scissor model) 的恢复百分比随时间变化的图。对于模拟注射部位,野生型洛莫索珠单抗 (圆圈) 和PARG c末端变体洛莫索珠单抗以不同的速率扩散。

[0020] 图6是显示野生型洛莫索珠单抗与PARG C末端变体洛莫索珠单抗两者相似地结合FcRn,并且FcRn结合不被PARG突变所影响的图。

[0021] 图7是显示PARG C末端变体洛莫索珠单抗与Fc  $\gamma$  RIIa (131H) 的相对结合远高于野生型洛莫索珠单抗的图。

### 具体实施方式

[0022] 本披露提供了与硬骨素特异性结合的抗体,其中该抗体包含重链,该重链在重链的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体包含第一重链和第二重链,该第一重链在重链的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列,该第二重链包含野生型重链氨基酸序列。在一些实施例中,抗体在重链的C末端包含含有Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列。还提供了包含抗体 (或抗体的混合物) 的药物组合物、以及使用该抗体的方法。

[0023] “抗硬骨素抗体”或“与硬骨素结合的抗体”是与SEQ ID NO:1的硬骨素结合的抗体或其部分。重组人类硬骨素/SOST可从例如,R&D系统公司 (R&D Systems) (明尼阿波里斯市,明尼苏达州,美国;2006目录号1406-ST-025) 商购。美国专利号6,395,511和6,803,453、以及美国专利公开号2004/0009535和2005/0106683通常是指抗硬骨素抗体。适用于本发明上下文的硬骨素抗体的实例也描述在美国专利公开号2007/0110747和2007/0072797中,将其通过引用结合在此。关于产生硬骨素抗体的材料和方法的其他信息可以在美国专利公开号

20040158045 (通过引用结合在此) 中找到。

[0024] 术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白分子 (包括具有全长重链和/或轻链的多克隆、单克隆、嵌合、人源化、和/或人类形式)。

[0025] 如本文所用,“特异性结合”意指抗体优先结合抗原而不是其他蛋白质。在一些实施例中,“特异性结合”意指抗体对抗原的亲合力高于对其他蛋白质的亲合力。特异性结合抗原的抗体对于抗原可具有以下结合亲合力:小于或等于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $3 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $4 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $6 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $7 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $8 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $9 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $4 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $6 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $7 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $8 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $9 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $4 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $6 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $7 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $8 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $9 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $3 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $4 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $7 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $8 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $9 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $2 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $3 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $4 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $6 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $7 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $8 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $9 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $2 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $3 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $4 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $6 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $7 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于或等于 $8 \times 10^{-12} \text{M}$ 、或小于或等于 $9 \times 10^{-12} \text{M}$ 。

[0026] 在一些或任何实施例中,抗体与SEQ ID NO:1的硬骨素、或其天然存在的变体以小于或等于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于或等于 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 、或小于或等于 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 的亲合力(Kd)进行结合。使用多种技术确定亲合力,其中一个实例是亲合力ELISA测定。在多种实施例中,通过BIAcore测定确定亲合力。在多种实施例中,通过动力学方法确定亲合力。在多种实施例中,通过平衡/溶液方法确定亲合力。美国专利公开号2007/0110747 (其披露通过引用结合在此) 含有适用于测定抗体对硬骨素的亲合力(Kd)的亲合力测定的其他描述。

[0027] 在一些或任何实施例中,抗体(其抗体片段)与包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的硬骨素多肽结合,并且结合包含SEQ ID NO:5的序列的硬骨素的区域(CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC;对应于SEQ ID NO:1的氨基酸86-111)。此区域在本文中也称为硬骨素的“环2”区域。环2区域外的硬骨素区域在本文中定义为“非环2区域”。可替代地或此外,抗硬骨素抗体与包含SEQ ID NO:1的氨基酸57-146的硬骨素多肽结合。可替代地或此外,抗硬骨素抗体与包含SEQ ID NO:1的氨基酸89-103和/或SEQ ID NO:1的氨基酸137-151的硬骨素多肽结合。在一些或任何实施例中,作为全长硬骨素的片段的硬骨素多肽保留了SEQ ID NO:1的人类硬骨素的对应多肽区域的三级结构。

[0028] 在一些或任何实施例中,本文描述的抗硬骨素抗体优选地在美国专利公开号2007/0110747中描述的基于细胞的测定和/或美国专利公开号20070110747中描述的体内测定中调节硬骨素功能、和/或与美国专利公开号2007/0110747中描述的一个或多个表位结合、和/或交叉阻断美国专利公开号2007/0110747中描述的抗体之一的结合、和/或被美国专利公开号2007/0110747中描述的抗体之一与硬骨素的结合而交叉阻断(以其整体结合

在此,以及针对用于表征抗硬骨素抗体的测定的描述)。

[0029] “CDR”是指在抗体可变序列内的互补决定区。对于每个可变区,在重链和轻链的每个可变区中存在三个CDR,其被称为CDR1、CDR2和CDR3。如本文所用,术语“六个CDR的组”是指在轻链可变区和重链可变区中出现的能够结合抗原的三个CDR的组。根据不同的系统,CDR的确切边界已被不同地定义。由Kabat (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* [目的免疫球蛋白的序列] National Institutes of Health [国立卫生研究院], 贝塞斯达软件公司 (Bethesda), 马里兰州 (1987) 和 (1991)) 描述的系统不仅提供了适用于抗体的任何可变区的精确的残基编号系统,但也提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以被称为Kabat CDR。Chothia和同事 (Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 196:901-917 (1987) 以及Chothia等人, *Nature* [自然] 342:877-883 (1989)) 发现Kabat CDR内的某些子部分采用几乎相同肽骨架构象,尽管在氨基酸序列水平上具有很大的多样性。这些子部分被指定为L1、L2和L3或H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别表示轻链区域和重链区域。这些区域可以称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。由Padlan (FASEB J. [美国实验生物学会联合会期刊] 9:133-139 (1995)) 和MacCallum (*J Mol Biol* [分子生物学杂志] 262 (5):73245 (1996)) 描述了定义与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界。其他CDR边界定义可以不严格遵循上述系统之一,但仍将会与Kabat CDR重叠,尽管根据特定残基或残基组或甚至整个CDR的预测或实验结果,它们可能会被缩短或延长而不显著影响抗原结合。本文使用的方法可以利用根据任何这些系统定义的CDR,但优选的实施例使用Kabat或Chothia定义的CDR。

[0030] 通过例如构建编码目的CDR的多核苷酸来获得CDR。例如,通过使用聚合酶链反应、使用产生抗体的细胞的mRNA作为模板合成可变区来制备此类多核苷酸(参见,例如, Larrick等人, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* [方法:酶学方法指南], 2:106 (1991); Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies [单克隆抗体的遗传操作],” 在 *Monoclonal Antibodies Production* [单克隆抗体制备] 中, Engineering and Clinical Application [工程及临床应用], Ritter等人 (编), 第166页, 剑桥大学出版社 (Cambridge University Press) (1995); 以及Ward等人, “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies [抗体的遗传操作和表达],” 在 *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* [单克隆抗体:原理与应用], Birch等人, (编), 第137页, 威利利出版公司 (Wiley-Liss, Inc.) (1995))。

[0031] 在多个方面,抗体包含与选自CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、和CDR-L3的CDR具有至少75%同一性(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的至少一个CDR序列,其中CDR-H1具有SEQ ID NO:2中给出的序列,CDR-H2具有SEQ ID NO:3中给出的序列,CDR-H3具有SEQ ID NO:4中给出的序列,CDR-L1具有SEQ ID NO:5中给出的序列,CDR-L2具有SEQ ID NO:6中给出的序列,并且CDR-L3具有SEQ ID NO:7中给出的序列。在多个方面,抗硬骨素抗体包含两个CDR或六个CDR。

[0032] 在优选的实施例中,抗硬骨素抗体包含如下六个CDR的组:SEQ ID NO:2的CDR-H1、SEQ ID NO:3的CDR-H2、SEQ ID NO:4的CDR-H3、SEQ ID NO:5的CDR-L1、SEQ ID NO:6的CDR-L2、和SEQ ID NO:7的CDR-L3。

[0033] 在一些或任何实施例中,抗体包含轻链可变区和重链可变区,该轻链可变区包含

与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少75%同一性(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的氨基酸序列,该重链可变区包含与SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列具有至少75%同一性(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的氨基酸序列。在多个方面,与SEQ ID NO:9或10相比,序列的差异位于对应序列中的CDR区域之外。在一些或任何实施例中,抗体包含轻链可变区和重链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,该重链可变区包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。

[0034] 在一些或任何实施例中,抗硬骨素抗体包含重链(例如,两条重链)的全部或部分和轻链(例如,两条轻链)的全部或部分,该重链包含与SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列具有至少75%同一性(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的氨基酸序列,该轻链包含与SEQ ID NO 12中所示的氨基酸序列具有至少75%同一性(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性)的氨基酸序列。

[0035] 抗体包含重链,该重链包含在重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8)。在一些实施例中,抗体的两条重链的C末端包含氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8)。在一些实施例中,抗体包含第一重链和第二重链,该第一重链包含氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8),该第二重链包含野生型氨基酸序列。在多个方面,抗体包含SEQ ID NO:12中所示的轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:13中所示的重链氨基酸序列。

[0036] 可替代地,在一些或任何实施例中,抗体在重链的C末端(任选地在两条重链的C末端)包含含有Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体包含第一重链和第二重链,该第一重链包含氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO:11),该第二重链包含野生型氨基酸序列(即,没有C末端Pro-Ala-Arg-Gly-Lys (SEQ ID NO:11))。在多个方面,抗体包含SEQ ID NO:12中所示的轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:14中所示的重链氨基酸序列。

[0037] 其他抗硬骨素抗体的实例包括但不限于披露于国际专利公开号WO 2008/092894、WO 2008/115732、WO 2009/056634、WO 2009/047356、WO 2010/100200、WO 2010/100179、WO 2010/115932、和WO 2010/130830(其每个通过引用以其整体结合在此)中的抗硬骨素抗体。

[0038] 本领域技术人员将理解,一些蛋白质(如抗体)可以经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度通常取决于用于表达蛋白质的宿主细胞系以及培养条件。此类修饰可包括糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化、和天冬酰胺脱酰胺的变化。频繁的修饰是由于羧肽酶的作用而丧失羧基末端碱性残基(例如赖氨酸或精氨酸)(如描述在Harris,RJ. *Journal of Chromatography* [色谱学杂志] 705:129-134,1995中)。

[0039] 其他修饰包括对脯氨酸和赖氨酸的羟基化、对丝氨酸或苏氨酸残基的羟基基团的磷酸化、对赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基基团的甲基化(T.E.Creighton, *Proteins:Structure and Molecular Properties* [蛋白质:结构和分子特性], W.H.Freeman&Co. [W.H.弗里曼公司], San Francisco [旧金山], 第79-86页 [1983], 通过引用整体结合)、对N末端胺的乙酰化、和对任何C末端羧基基团的酰胺化。

[0040] 在一些或任何实施例中,抗体(包含氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8))的重链的C末端被酰胺化。在一些或任何实施例中,抗体的两条重链包含氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8),并且两条重链均被酰胺化。在一些实施例中,甘氨酸被酰胺化。例如,可以如Prigg,S.T.等人,“New insights into copper monooxygenases and

peptide amidation:structure,mechanism and function[对铜单加氧酶和肽酰胺化的新见解:结构、机理和功能]”,Cell.Mol.Life Sci.[细胞分子生命科学]57(2000)1236-1259描述的发生酰胺化。酶肽基甘氨酸 $\alpha$ -酰胺化单加氧酶(PAM)可以催化甘氨酸的酰胺化。PAM具有两个活性结构域,肽基甘氨酸 $\alpha$ -羟基化单加氧酶(PHM)和肽基- $\alpha$ -羟基甘氨酸 $\alpha$ -酰胺化裂解酶(PAL)。PHM催化肽基甘氨酸(与抗坏血酸盐和氧一起)转化为肽基 $\alpha$ -羟基甘氨酸(与半脱氢抗坏血酸盐(semidehydrogenascorbate)和水一起)。反过来,PAL催化肽基 $\alpha$ -羟基甘氨酸转化为酰胺化肽(和乙醛酸)。

[0041] 可以通过在细胞培养过程中改变某些条件来控制抗体的酰胺化。例如,铜(例如,在柠檬酸铁铵中)和/或氧水平可用于影响酰胺化水平。预期增加铜浓度(例如,在培养基中)或氧可用性(例如,在培养期间)可通过影响酶(如PHM)的活性来增加酰胺化。

[0042] 药物组合物

[0043] 本披露提供包含本文描述的抗体的群体与药学上有效的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂、和/或佐剂一起的药物组合物。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

[0044] 本披露还提供药物组合物,该药物组合物包含与SEQ ID NO:1的硬骨素特异性结合的抗体的混合物和药学上可接受的载体,其中组合物中约3%-5%的抗体是本文描述的抗体的群体(例如,包含SEQ ID NO:2-7中所示的六个CDR的组并具有一条重链(或两条重链)的抗体,该重链包含在一条或两条重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8))。本披露还涵盖组合物,该组合物包含可替代的量(例如,5%-10%、1%-3%、3%-15%、2%-10%、4%-20%、1%-5%)的本文描述的抗体的群体(例如,包含SEQ ID NO:2-7中所示的六个CDR的组并具有一条重链(或两条重链)的抗体,该重链包含在一条或两条重链的C末端的氨基酸序列Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8))。

[0045] 在一些实施例中,抗体的群体的小于70%(例如,约69%、约68%、约67%、约66%、约65%、约64%、约63%、约62%、约61%、约60%、约59%、约58%、约57%、约56%、约55%、约54%、约53%、约52%、约51%、约50%、约49%、约48%、约47%、约46%、约45%、约44%、约43%、约42%、约41%、约40%、约39%、约38%、约37%、约36%、约35%、约34%、约33%、约32%、约31%、约30%、约29%、约28%、约27%、约26%、约25%、约24%、约23%、约22%、约21%、约20%、约19%、约18%、约17%、约16%、约15%、约14%、约13%、约12%、约11%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或更少)包含含有C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)序列的重链,其任选地被酰胺化。在一些实施例中,抗体的群体的小于35%(例如,约34%、约33%、约32%、约31%、约30%、约29%、约28%、约27%、约26%、约25%、约24%、约23%、约22%、约21%、约20%、约19%、约18%、约17%、约16%、约15%、约14%、约13%、约12%、约11%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或更少)在两条重链上包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)序列,其中两条重链被任选地酰胺化。还预期两条重链包含C末端Pro-Ala-Arg-Gly(SEQ ID NO:8)序列,但是仅一条链被酰胺化。在一些实施例中,组合物中小于35%(例如,约34%、约33%、约32%、约31%、约30%、约29%、约28%、约27%、约26%、约25%、约24%、约23%、约22%、约21%、约20%、约19%、约18%、约17%、约16%、约15%、约14%、约13%、约12%、约11%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或更

少)的抗体包含未被酰胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8) 序列。在一些实施例中,抗体的群体的约33%包含被酰胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8) 序列,抗体的群体的约33%在两条重链上包含均被酰胺化的C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8) 序列,并且抗体的群体的约33%包含具有C末端Pro-Ala-Arg-Gly (SEQ ID NO:8) 序列的一条或两条重链(但其未被酰胺化)。

[0046] 在一些实施例中,药物组合物含有用于修饰、维持、或保持组合物的例如,pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的配制品材料。在此类实施例中,合适的配制品材料包括但不限于氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、脯氨酸、或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠、或亚硫酸氢钠);缓冲液(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨胀剂(如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 $\beta$ -环糊精或羟丙基- $\beta$ -环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖、或糊精);蛋白质(如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白);着色剂、调味剂、和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(如钠);防腐剂(苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸、或过氧化氢);溶剂(如甘油、丙二醇、或聚乙二醇);糖醇(如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(如普朗尼克(pluronic)、PEG、脱水山梨聚糖、聚山梨醇酯(如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯)、氟核、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙星(tyloxapal));稳定性增强剂(如蔗糖或山梨醇);张力增强剂(如碱金属卤化物(优选地是氯化钠或氯化钾)、甘露醇、山梨醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。参见,REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明登氏药学全书],第18版(A.R.Genrmo编),1990,马克出版公司(Mack Publishing Company)。

[0047] 本文描述的特定配制品材料的选择可以通过例如预期的给药途径、递送形式和所需剂量来驱动。参见,例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明登氏药学全书],同上。药物组合物中的主要媒介物或载体可以是水性或非水性的。例如,合适的媒介物或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或人造脑脊液,可能补充有用于肠胃外给予的组合物中常见的其他物质。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是另外的示例性媒介物。在具体的实施例中,药物组合物包含pH约7.0-8.5的Tris缓冲液、或pH约4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,并且可以进一步包括山梨醇或其适合的替代物。在某些实施例中,组合物可以通过将具有所希望纯度的选择成分与任选配制剂(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明登氏药学全书],同上)以冻干饼或水性溶液的形式混合来制备用于储存。此外,在一些实施例中,可以使用合适的赋形剂(如蔗糖)将抗体或片段配制成冻干物。

[0048] 可以选择本发明的药物组合物用于肠胃外递送。可替代地,可以选择组合物用于吸入或通过消化道递送,例如口服。此类药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的技术范围内。配制品组分优选地以给药部位可接受的浓度存在。在某些实施例中,使用缓冲液将组合物维持在生理pH或略低的pH,通常在从约5至约8的pH范围内。

[0049] 当考虑肠胃外给予时,用于本发明的治疗组合物可以以无热原的、肠胃外可接受的水性溶液的形式提供,该水性溶液包含在药学上可接受的媒介物中的所希望的抗体或片段。用于肠胃外注射的特别合适的媒介物是无菌蒸馏水,其中将抗体或片段配制成适当保

存的无菌等渗溶液。在某些实施例中,可植入药物递送装置可用于引入所希望的抗体或片段。

[0050] 在一些或任何实施例中,本文描述的药物组合物包含钙盐、乙酸盐缓冲液、多元醇、和表面活性剂。示例性钙盐包括但不限于乙酸钙、碳酸钙、和氯化钙。在一些实施例中,钙盐的浓度是至少0.5mM、至少1mM、至少2mM、至少3mM、至少4mM、至少5mM、至少6mM、至少7mM、至少8mM、至少9mM或至少10mM。在某些实施例中,钙盐的浓度不大于11mM、不大于12mM、不大于13mM、不大于14mM、不大于15mM、不大于16mM、不大于17mM、不大于18mM、不大于19mM、不大于20mM、不大于21mM、不大于22mM、不大于23mM、不大于24mM、或不大于25mM。考虑了具有前述终点的组合的任何范围,该范围包括但不限于从约0.5mM至约10mM、约5mM至约10mM、或约5mM至约15mM。

[0051] 在一些实施例中,药物组合物包含具有从约0.1mM至约1000mM (1M) 的浓度范围的乙酸盐缓冲液(例如,乙酸钠)。在一些实施例中,乙酸盐缓冲液的浓度是至少5mM、至少6mM、至少7mM、至少8mM、至少9mM、至少10mM、至少15mM、至少60mM、至少70mM、至少80mM、至少90mM、至少100mM、至少200mM、至少500mM、至少700mM、或至少900mM。在一些实施例中,乙酸盐缓冲液的浓度不大于10mM、不大于15mM、不大于20mM、不大于25mM、不大于30mM、不大于35mM、不大于40mM、不大于45mM、不大于50mM、不大于55mM、不大于60mM、不大于65mM、不大于70mM、不大于75mM、不大于80mM、不大于85mM、不大于90mM、不大于95mM、或不大于100mM。考虑了具有前述终点的组合的任何范围,该范围包括但不限于从约5mM至约15mM、或从约5mM至约10mM或从约10mM至约25mM。优选地将缓冲液添加至pH保持在约5-6或5-5.5或4.5-5.5的浓度。在一些实施例中,当配制品的钙盐是乙酸钙时,乙酸盐的总浓度是约10mM至约55mM、或约20mM至约40mM。

[0052] 在一些方面,药物组合物包含总浓度为至少约10mM、至少约15mM、至少约20mM、至少约25mM、至少约30mM、至少约35mM、至少约40mM、45mM、或50mM的乙酸盐。在一些实施例中,乙酸盐的浓度不大于约30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、或90mM。考虑了具有前述终点的组合的任何范围,该范围包括但不限于:约10mM至约50mM、约20mM至约50mM、约20mM至约40mM、约30mM至约50mM、或约30mM至约75mM。在一些实施例中,钙盐是乙酸钙,并且乙酸盐缓冲液是乙酸钠。通过非限制性实例的方式,含有10mM乙酸钙的溶液将具有20mM乙酸盐阴离子和10mM的钙阳离子(因为钙阳离子具有二价的性质),而含有10mM乙酸钠的溶液将具有10mM钠阳离子和10mM乙酸盐阴离子。

[0053] 在一些实施例中,溶液中离子(阳离子和阴离子)的总浓度是至少10mM、至少约15mM、至少约20mM、至少约25mM、至少约30mM、至少约35mM、至少约40mM、至少约45mM、至少约50mM、至少约55mM、至少约60mM、至少约65mM、至少约70mM、至少约75mM、至少约80mM、或至少约85mM。在一些实施例中,离子的总浓度不大于约30mM、不大于约35mM、不大于约40mM、不大于约45mM、不大于约50mM、不大于约55mM、不大于约60mM、不大于约65mM、不大于约70mM、不大于约75mM、不大于约80mM、不大于约85mM、不大于约90mM、不大于约95mM、不大于约100mM、不大于约110mM、不大于约120mM、不大于约130mM、不大于约140mM、不大于约150mM、不大于约160mM、不大于约170mM、不大于约180mM、不大于约190mM、或不大于约200mM。考虑了具有前述终点的组合的任何范围,该范围包括但不限于:约30mM至约60mM、或约30mM至约70mM、或约30mM至约80mM、或约40mM至约150mM、或约50mM至约150mM。通过非限制性实例的方式,

10mM乙酸钙的溶液将具有30mM总浓度的离子(10mM阳离子和20mM阴离子)。

[0054] 在一些或任何实施例中,药物组合物包含多元醇。多元醇涵盖一类赋形剂,其包括糖(例如甘露糖醇、蔗糖、山梨醇)和其他多元醇(例如甘油和丙二醇)。示例性多元醇包括但不限于丙二醇、甘油(丙三醇)、苏糖、苏糖醇、赤藓糖、赤藓糖醇、核糖、阿拉伯糖、阿拉伯糖醇、来苏糖、麦芽糖醇、山梨醇、山梨糖、葡萄糖、甘露糖、甘露糖醇、左旋糖、右旋糖、麦芽糖、海藻糖、果糖、木糖醇、肌醇、半乳糖、木糖、果糖、蔗糖、1,2,6-己三醇等。高级糖包括但不限于葡聚糖、丙二醇或聚乙二醇。与非还原糖相比,还原糖,例如果糖、麦芽糖或半乳糖更容易氧化。糖醇的另外的实例是葡糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇或异麦芽酮糖。另外的示例性冻干保护剂包括甘油和明胶,以及蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖和水苏糖。还原糖的实例包括葡萄糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖和乳果糖。非还原糖的实例包括选自糖醇和其他直链多元醇的多羟基化合物的非还原糖苷。单糖苷包括通过还原二糖(例如乳糖、麦芽糖、乳果糖和麦芽酮糖)而获得的化合物。

[0055] 在一些或任何实施例中,药物组合物包含浓度范围从约0%至约40%w/v的多元醇。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为至少0.5、至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少30、或至少40%w/v的多元醇。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约1、2、3、4、5、6、7、8、9%至约10%w/v的多元醇。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约2%至约6%w/v的多元醇。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约4%w/v的多元醇。在一些或任何实施例中,组合物包含在约6%w/v的多元醇。

[0056] 在一些或任何实施例中,药物组合物包含表面活性剂。示例性表面活性剂包括但不限于阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、和两性表面活性剂,包括衍生自天然存在的氨基酸的表面活性剂。阴离子表面活性剂包括但不限于十二烷基硫酸钠、丁二酸二辛基磺酸钠和二辛基磺酸钠、鹅去氧胆酸、N-月桂酰肌氨酸钠盐、十二烷基硫酸锂、1-辛烷磺酸钠盐、胆酸钠水合物、脱氧胆酸钠、和甘氨酸脱氧胆酸钠盐。阳离子表面活性剂包括但不限于苯扎氯铵或苜索氯铵、氯化十六烷基吡啶一水合物和溴化十六烷基三甲铵。两性离子表面活性剂包括但不限于CHAPS、CHAPSO、SB3-10、和SB3-12。非离子表面活性剂包括但不限于毛地黄皂苷、曲拉通(Triton)X-100、曲拉通X-114、吐温(TWEEN)20和吐温80。在另一个实施例中,表面活性剂包括但不限于聚桂醇400,硬脂酸酯聚羟氧40酯,聚氧乙烯氢化蓖麻油10、40、50和60,单硬脂酸甘油酯,聚山梨醇酯20,聚山梨醇酯40,聚山梨醇酯60,聚山梨醇酯65和聚山梨醇酯80,大豆卵磷脂和其他磷脂质(如DOPC、DMPG、DMPC、和DOPG);蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素、和羧甲基纤维素。在一些或任何实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0057] 表面活性剂可以单独或以不同比例的混合物包含在组合物中。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约0%至约5%w/v(例如,约0.001、约0.002、约0.005、约0.007、约0.01、约0.05、约0.1、约0.2、约0.3、约0.4、约0.5、约0.6、约0.7、约0.8、约0.9、约1.0、约1.5、约2.0、约2.5、约3.0、约3.5、约4.0、或约4.5%w/v)的表面活性剂。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约0.001%至约0.5%w/v的表面活性剂。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约0.004、约0.005、约0.007、约0.01、约0.05、或约0.1%w/v至约0.2%w/v的表面活性剂。在一些或任何实施例中,组合物包含浓度为约0.01%至约0.1%w/v的表面

活性剂。

[0058] 在一些或任何实施例中,药物组合物包含55mM乙酸盐、13mm钙、6.0% (w/v)蔗糖、0.006% (w/v)聚山梨醇酯20,pH 5.2。

[0059] 另外的药物组合物对于本领域技术人员将是显而易见的,包括在持续或控制递送配制品中涉及抗原结合蛋白的配制品。用于配制各种其他持续或控制递送方式的技术(诸如脂质体载剂、生物可侵蚀微粒或多孔珠粒和储库注射)也是本领域技术人员已知的。参见,例如国际专利申请号PCT/US93/00829,其通过引用结合在此并描述了用于递送药物组合物的多孔聚合物微粒的控制释放。持续释放制剂可以包括呈成型制品(例如膜或微胶囊)形式的半透性聚合物基质。持续释放基质可以包括聚酯、水凝胶、聚丙烯交酯(如美国专利号3773919和欧洲专利申请公开号EP 058481中所披露,其每个通过引用结合在此)、L-谷氨酸和 $\gamma$ -L-谷氨酸乙酯的共聚物(Sidman等人,1983,Biopolymers[生物聚合物]2:547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人,1981,J.Biomed.Mater.Res.[生物医学材料研究杂志]15:167-277和Langer,1982,Chem.Tech.[化学技术]12:98-105)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人,1981,同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(欧洲专利申请公开号EP133988)。持续释放组合物还可以包括可以通过本领域中已知的若干种方法中的任一种制备的脂质体。参见,例如Eppstein等人,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]82:3688-3692;欧洲专利申请号EP036676;EP088046和EP143949,通过引用结合。

[0060] 用于体内给予的药物组合物典型地作为无菌制剂提供。灭菌可以通过无菌滤膜过滤完成。当组合物冻干时,可以在冻干和重新配制之前或之后进行使用该方法的灭菌。用于肠胃外给予的组合物可以以冻干形式或于溶液中储存。通常将肠胃外组合物置入具有无菌输液港的容器(例如具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)中。

[0061] 根据本发明的多种实施例,游离氨基酸可用于抗体或片段配制品中以作为增积剂、稳定剂和抗氧化剂以及其他标准用途。赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸可用于稳定配制品中的蛋白质。甘氨酸可用于冻干以确保正确的饼结构和特性。在液体配制品和冻干配制品两者中,精氨酸均可用于抑制蛋白质聚集。甲硫氨酸可用作抗氧化剂。

[0062] 抗体配制品的实施例可以进一步包含一种或多种抗氧化剂。通过保持适当水平的环境氧气和温度并避免暴露于光下,可以在某种程度上防止药物配制品中蛋白质的有害氧化。也可以使用抗氧化赋形剂来防止蛋白质的氧化降解。在这方面,有用的抗氧化剂是还原剂、氧/自由基清除剂和螯合剂。用于根据本发明的治疗性蛋白质配制品中的抗氧化剂优选是水溶性的并且在整个产品的储存寿命内保持其活性。在这方面,EDTA是根据本发明的优选的抗氧化剂。

[0063] 根据本发明的配制品可以包含金属离子,这些金属离子是蛋白质辅助因子并且是形成蛋白质配位络合物所必需的,诸如形成某些胰岛素悬浮液所必需的锌。金属离子也可以抑制一些降解蛋白质的过程。然而,金属离子也催化降解蛋白质的物理和化学过程。

[0064] 镁离子(10-120mM)可用于抑制天冬氨酸异构化为异天冬氨酸。 $\text{Ca}^{+2}$ 离子(高达100mM)可以增加人脱氧核糖核酸酶的稳定性。然而, $\text{Mg}^{+2}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$ 和 $\text{Zn}^{+2}$ 可以使重组人类脱氧核糖核酸酶(rhDNase)不稳定。类似地, $\text{Ca}^{+2}$ 和 $\text{Sr}^{+2}$ 可以稳定因子VIII,它可以被 $\text{Mg}^{+2}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$ 和 $\text{Zn}^{+2}$ 、 $\text{Cu}^{+2}$ 和 $\text{Fe}^{+2}$ 去稳定,并且其聚集可以由 $\text{Al}^{+3}$ 离子增加。

[0065] 抗体配制品的实施例可以进一步包含一种或多种防腐剂。

[0066] 一旦配制了药物组合物,可以将它作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体、晶体或作为脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。此类配制品可以以即用形式或以在给予前重新配制的形式(例如冻干形式)储存。本发明还提供了用于产生单剂量给予单元的药剂盒。本发明的药剂盒可各自含有具有干燥蛋白质的第一容器和具有水性配制品的第二容器。在本发明的某些实施例中,提供了含有单室和多室预填充注射器(例如液体注射器和冻干注射器)的药剂盒。

[0067] 待使用的含有抗体药物组合物的治疗有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域技术人员将理解,治疗的适当剂量水平将部分地取决于递送的分子、使用抗体的一种或多种适应症、给药途径、以及患者的大小(体重、体表面积或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)。

[0068] 稳定性

[0069] 在包含抗体(或其抗原结合片段)的组合物的上下文中,如本文所用,术语“稳定性”和“稳定的”是指组合物中抗体(或其抗原结合片段)在给定的制造、制备、运输和/或储存条件下对聚集、降解或破碎的抗性。包含高度稳定性的抗体配制品表现出增强的可靠性和安全性,因此对临床用途是有利的。

[0070] 任选地通过检查组合物中抗体的所希望的参数(例如,重链和/或轻链的聚集、降解,化学修饰等)随时间的变化来评估组合物中的抗体稳定性。在这一点上,通常在初始时间点(T0)和评估时间点(T1)检查参数,任选地同时将抗体暴露于多种环境条件中的任何一种,并进行比较。初始时间点可以是,例如,抗体首次在组合物中配制或首次检查质量的时间(即,检查以确定抗体组合物是否满足关于聚集或降解的法规或制造规范)。初始时间点也可以是抗体在组合物中重新配制的时间(例如,与初始制剂相比,以更高或更低的浓度重新配制)。在多种实施方案中,评估时间点是在初始时间点之后约1周(或约2周、或约3周、或约4周、或约5周、或约6周、或约7周、或约8周、或约10周、或约3个月、或约6个月、或约1年)。可在各种储存条件下评估组合物中抗体或其片段的所希望的参数(例如,聚集或降解),这些储存条件如-30°C、4°C、20°C或40°C的温度、摇动、pH、储存在不同容器材料(例如,玻璃瓶、预填充注射器等)等。

[0071] 用于确定包含抗体的组合物中存在的聚集的程度、和/或类型、和/或大小的示例性方法包括但不限于尺寸排阻色谱(SEC)、高效尺寸排阻色谱(HPSEC)、静态光散射(SLS)、傅立叶变换红外光谱(FTIR)、圆二色性(CD)、尿素诱导蛋白质解折叠技术、内源性色氨酸荧光、差示扫描量热法、和1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)蛋白结合技术。可以进行尺寸排阻色谱(SEC)以基于它们的尺寸分离分子,通过使分子通过填充有适当树脂的柱,较大分子(例如聚集)将在较小分子(例如单体)之前洗脱。通常通过在280nm处的UV吸光度检测分子,并且可以收集分子用于进一步表征。高压液相色谱柱通常用于SEC分析(HP-SEC)。可替代地,可以使用分析超离心(AUC)。AUC是确定液体样品中大分子沉降系数的正交技术。与SEC一样,AUC能够从单体中分离和检测抗体片段/聚集体,并且进一步能够提供有关分子量的信息。组合物中的抗体聚集也可以通过使用库尔特计数器的粒子计数器分析、或通过使用浊度计的浊度测量来表征。浊度是溶液中的颗粒散射光的量的量度,因此可以用作蛋白质聚集的一般指标。另外,非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)或毛细管凝胶电泳(CGE)可用于表征组合物中抗体或抗体片段的聚集和/或片段化状态。

[0072] 用于确定抗体降解的示例性方法包括但不限于尺寸排阻色谱 (SEC)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和伴SDS的毛细管电泳 (CE-SDS)、和伴在线MS检测的反相HPLC。

[0073] 在多种实施例中,组合物中小于5%的本文描述的抗体在感兴趣的条件下是聚集形式。例如,在-30°C、4°C、20°C或40°C储存约1周(或约2周、或约3周、或约4周、或约5周、或约6周、或约7周、或约8周、或约10周、或约3个月、或约6个月或约1年)的时间后,组合物中的小于4%、或小于3%、或小于2%、或小于1%的抗体是聚集形式。在一些实施例中,在约4°C储存两周后,组合物中小于5%(或小于4%、或小于3%、或小于2%、或小于1%、或更少)的本文描述的抗体是聚集形式。

[0074] 例如,在-30°C、4°C、20°C或40°C储存约1周(或约2周、或约3周、或约4周、或约5周、或约6周、或约7周、或约8周、或约10周、或约3个月、或约6个月、或约1年)的时间后,组合物中的至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%)的抗体任选地以非聚集的形式(即,单体)存在。在一些实施例中,在约4°C储存两周后,至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或更多)的抗体在组合物中以非聚集形式存在。在一些实施例中,在约4°C储存两周持续两周后,至少99%的抗体在组合物中以非聚集形式存在,和/或在40°C储存两周后,至少95%的抗体在组合物中以非聚集形式存在。

[0075] 在多种实施例中,组合物中小于5%的本文描述的抗体是降解的。例如,组合物中小于4%、或小于3%、或小于2%、或小于1%或更少的抗体在感兴趣的条件下降解。例如,任选地储存在约-30°C、约4°C、约20°C或约40°C持续约1周(或约2周、或约3周、或约4周、或约5周、或约6周、或约7周、或约8周、或约10周、或约3个月、或约6个月或约1年)的时间的组合物中的至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%)的抗体是完整的(即,未降解的)。在一些方面,将组合物在约4°C储存两周的时间后,至少85%(或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或更多)的抗体是完整的(即非降解的)。在一些实施例中,当在组合物在约4°C储存两周时至少99%的抗体保持完整,和/或当在组合物在约40°C储存两周时至少95%保持完整。

[0076] 本文还考虑了组合物中抗体的功能或活性稳定性。用于检测和/或定量例如抗体与靶的结合、或硬骨素中和的测定法是本领域已知的。任选地,与在初始时间点的抗体活性相比,抗体在感兴趣的条件下表现出约50%-100%的活性。例如,与初始时间点的活性相比,抗体保持约60%-90%或70%-80%之间的活性水平。因此,抗体的功能稳定性包括至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的活性保留,并且可包括与初始时间点的活性相比,活性测量值大于100%,如105%、110%、115%、120%、125%或150%或更多。

[0077] 粘度

[0078] 在一些实施例中,确定包含一种或多种本文描述的抗体的组合物的粘度。如本文所用,术语“粘度”是指“绝对粘度”。绝对粘度(有时称为动态或简单粘度)是运动粘度和流

体密度的乘积(绝对粘度=运动粘度 $\times$ 密度)。运动粘度的尺寸为 $L^2/T$ ,其中L是长度并且T是时间。通常,运动粘度以厘司(cSt)表示。运动粘度的SI单位是 $\text{mm}^2/\text{s}$ ,其是1cSt。绝对粘度以厘泊(cP)的单位表示。绝对粘度的SI单位是毫帕-秒(mPa-s),其中1cP=1mPa-s。

[0079] 组合物的粘度可以在向组合物中添加抗体后数小时(例如,1-23小时)、数天(例如,1-10天)、数周(例如,1-5周)、数月(例如,1-12个月)、或数年(例如,1-2年、1-3年)测量。粘度测量可以在储存或给药温度(例如 $2^\circ\text{C}$ - $8^\circ\text{C}$ 或 $25^\circ\text{C}$ (室温))进行。在一些实施例中,液体或重新配制的液体组合物在储存和/或给药温度的绝对粘度为1-5cP或更低,或14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、或4cP或更低。在一些实施例中,液体或重新配制的液体组合物的绝对粘度为6cP或更低。

[0080] 在一些实施例中,在添加抗体之前和之后测量抗体组合物的粘度。测量粘度的方法是本领域公知的,这些方法包括例如使用毛细管粘度计、或锥板流变仪。可以使用任何方法,其条件是使用相同的方法来比较测试和参考配制品。

[0081] 治疗方法

[0082] 本文描述的抗体和药物组合物可用于治疗或预防骨相关障碍,如与异常成骨细胞或破骨细胞活性相关的骨相关障碍。在一些实施例中,将抗体给予至经受选自下组的骨相关疾病的受试者,该组由以下组成:软骨发育不全、颅锁骨发育不全、内生软骨瘤病、纤维性结构不良、高歇氏病(Gaucher's Disease)、低血磷性佝偻病、马方氏综合征、遗传多发性外生骨疣、多发性神经纤维瘤、成骨不全症、骨硬化病、骨斑点症、硬化病变、假关节、化脓性骨髓炎、牙周病、抗癫痫药物引起的骨质流失、原发性和继发性甲状旁腺功能亢进、家族性甲状旁腺功能亢进症状、失重导致骨质流失、男性骨质疏松症、绝经后骨质流失、骨关节炎、骨关节炎、骨浸润性疾病、口腔骨流失、颞骨坏死、幼年佩吉特氏病(juvenile Paget's disease)、蜡泪样骨病、代谢性骨病、肥大细胞增多症、镰状细胞性贫血/疾病、器官移植导致的骨质流失、肾移植引起的骨质流失、全身性红斑狼疮、强直性脊柱炎、癫痫、幼年特发性关节炎、地中海贫血、黏多糖贮积症、法布里病(Fabry Disease)、特纳综合征、唐氏综合征、克兰费尔特综合征(Klinefelter Syndrome)、麻疯病、皮瑟氏疾病(Perthe's Disease)、青少年特发性脊柱侧凸、婴儿发作多系统炎症性疾病、温彻斯特综合征(Winchester Syndrome)、门克斯病(Menkes Disease)、威尔逊氏病(Wilson's Disease)、骨缺血性疾病(如累格氏病(Legg-Calve-Perthes disease)和地区迁徙的骨质疏松症)、低迷的状态、类固醇引起的病症、激素性骨质流失、肝素诱导的骨质流失、骨髓障碍、坏血病、营养失调、钙缺乏、骨质疏松症、骨量减少、酗酒、慢性肝病、绝经后状态、慢性炎症病症、类风湿性关节炎、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、炎症性结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、月经过少、闭经、怀孕相关的骨质流失、糖尿病、甲状腺机能亢进、甲状腺失调、甲状旁腺能失调、库兴氏病(Cushing's disease)、肢端肥大症、生殖官能不良、固定术或废用(immobilization or disuse)、反射性交感神经营养不良综合征、局部骨质疏松症、骨软化、与关节替换相关的骨质流失、HIV相关的骨质流失、与生长激素有光的骨质流失、囊胞性纤维症有关的骨质流失、化学疗法相关的骨质流失、肿瘤诱导的骨质流失、癌症相关的骨质流失、激素相关的骨质流失、多发性骨髓瘤、药物诱导的骨质流失、神经性食欲缺乏、疾病相关的面部骨质流失、疾病相关的颅骨骨质流失、疾病有关的颌骨骨质流失、疾病相关的头骨骨质流失、随着年龄的骨质流失、随着年龄的面部骨质流失、随着年龄的头骨骨质流失、随着年龄的颌骨骨

质流失、随着年龄的头骨骨质流失、以及与太空旅行有关的骨质流失。

[0083] 在一些实施例中,本文描述的抗体可用于改善整形外科手术、牙科手术、植入手术、关节替换、骨移植、骨整形手术和骨修复(如骨折愈合、骨不连愈合、延迟愈合治愈和面部重建)的结果。可在手术、替换、移植、外科手术或修复之前、期间和/或之后给予包含一种或多种抗体的组合物。

[0084] 在一些实施例中,本文描述的抗体可用于治疗任何骨折,该骨折包含两段骨之间的间隙(例如,两段骨之间的间隙为至少约1mm)。在一些或任何实施例中,间隙是至少约2mm、至少约3mm、至少约4mm、至少约5mm、至少约6mm、至少约7mm、至少约8mm、至少约9mm、或至少约1cm或更大。在一些或任何实施例中,间隙是约5mm至1cm、或高达1cm。术语“骨间隙缺损”和“节段骨骼缺损”在本文中同义使用,并且是指两个骨段之间的间隙(例如,至少1mm的间隙)。

[0085] 示例性骨间隙缺损包括但不限于粉碎性骨折、非愈合性骨折、节段性骨骼缺损、手术创建的骨缺损、手术治疗的骨缺损、以及由骨或疾病的创伤性损伤产生的骨缺损(包括但不限于关节炎、肿瘤去除(切除)、或感染去除)。在一些或任何实施例中,通过去除感染的骨切片或由于骨癌而从骨中去除癌症产生骨间隙缺损,该骨癌包括但不限于骨肉瘤、尤文氏肉瘤、软骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、纤维肉瘤、和脊索瘤。在一些或任何实施例中,骨间隙缺损是发育畸形,例如,由于遗传缺损。

[0086] 在一些或任何实施例中,通过去除含有良性肿瘤的骨切片产生骨间隙缺损。示例性良性骨肿瘤包括但不限于骨瘤、骨样骨瘤、成骨细胞瘤、骨软骨瘤、内生软骨瘤、软骨粘液样纤维瘤、动脉瘤样骨囊肿、单房性骨囊肿、骨纤维异常增生、和骨巨细胞肿瘤。

[0087] 给予抗体增强或加速骨间隙缺损愈合,从而“治疗”骨间隙缺损。“增强”骨愈合意指介导超过(即,大于)以下的骨愈合水平:未给予硬骨素抑制剂的受试者(例如,哺乳动物,例如人,即,对照受试者)中经历的骨愈合水平。骨愈合可通过以下来证明:例如桥接状态、改善的骨量、改善的骨矿物质含量、和骨折间隙内的密度(即桥接骨的形成)、成熟的骨痂、改善的骨强度(任选伴随医学上可接受的骨硬度水平)、或改善的受影响区域的患者使用。“改善的”意指测量参数的增加或减少(根据需要)。该增加可以是测量参数全部或部分返回至基线水平(例如,骨间隙缺损之前的水平)、返回至本领域中使用的标准数据库中提供的值、或返回至对侧功能水平(例如,全部或部分地返回至例如对侧肢体的功能性性能)。在一些情况下,增加可以是超出基线水平的改善。如果需要,可以将给予一种或多种剂量的抗体的患者中的测量参数与未给予抗体的骨折患者中的相同参数(任选年龄和性别匹配)进行比较,以进一步分析本文描述的方法的功效。

[0088] 可以使用射线照相术(例如,射线照相吸光度法)、单能量和/或双能量X射线吸收测量法、定量计算机断层扫描(QCT)、超声波检查、射线照相术(例如,射线照相吸光度测定法)、和磁共振成像来测量骨缺损部位的桥接骨、骨矿物质含量、和骨密度、和/或成熟骨痂的形成。在一些实施例中,可以将抗体以将桥接骨形成、骨痂形成、或骨缺损部位的骨密度(或体积)有效增加至少约5%(约6%、约7%、约8%、或约9%)的剂量给予一段时间。在一些实施例中,桥接骨形成、骨痂形成、或骨缺损部位的骨密度增加了至少约10%(例如,至少约10%、至少约12%、至少约15%、至少约18%、至少约20%、或至少约22%)。在其他实施例中,由硬骨素抑制剂将桥接骨形成、骨痂形成、或骨缺损部位的骨密度增加至少约25%(例

如,至少约26%、或至少约28%)。在还其他实施例中,桥接骨形成、骨痂形成、或骨缺损部位的骨密度增加至少约30% (例如,至少约32%、至少约35%、至少约38%、或至少约40%)、或至少约50% (例如,至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或约100%)。可以在初始给予抗体后1周、2周、3周、或4周确定桥接骨形成的增加或重建。可替代地,可以在治疗期结束后 (例如,治疗期结束后1周、2周、3周、或4周) 确定骨密度水平。在一方面,与未接受抗体的年龄和性别匹配的患者相比,该方法减少了建立所希望的水平的骨形成、骨量、骨痂或骨密度 (例如,本文描述的骨形成、骨矿物质密度、骨痂或骨量的任何增加百分比) 所需的时间量,该方法由此减少受试者的恢复时间。例如,在一个实施例中,抗体将增加缺损部位的骨密度或体积所需的时间的量减少至少约10% (例如,至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、或至少约50%)。

[0089] 抗体不需要治愈受试者的障碍或完全预防骨相关障碍的发作以实现有益的生物反应。可以将抗体预防性使用,意指全部或部分保护免于骨相关障碍或其症状。抗体还可以在治疗上用于全部或部分改善骨相关障碍或其症状,或者全部或部分地保护骨相关障碍或其症状的进一步发展。实际上,本发明的材料和方法特别适用于增加骨矿物质密度,并且任选地在一段时间内保持增加的骨矿物质密度。

[0090] 在一些实施例中,在例如约1周至约18个月 (例如,约1个月至约12个月、约1个月至约9个月、或约1个月至约6个月、或约1个月至约3个月) 的治疗期进行本文描述的抗体一次或多次给予。在一些实施例中,向受试者给予一种或多种剂量的本文描述的抗体持续例如约1月至约12月 (52周) (例如,约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、或约11个月) 的治疗期。

[0091] 另外,取决于针对特定受试者选择的治疗方案,给予多剂量的抗体或间隔开给药剂量可以是有利的。在一些实施例中,在一年 (12个月、52周) 或更少 (例如,9个月或更少、6个月或更少、或3个月或更少) 的时间段定期给予抗体或其片段。在这一点上,将抗体或其片段以每约3天、或约7天、或2周、或3周、或4周、或5周、或6周、或7周、或8周、或9周、或10周、或11周、或12周、或13周、或14周、或15周、或16周、或17周、或18周、或19周、或20周、或21周、或22周、或23周、或6月、或12月一次给予至人类。

[0092] 在一些实施例中,以有效增加骨矿物质密度或治疗与骨矿物质密度降低相关的骨障碍的量和持续时间给予一种或多种剂量的抗体。在多种实施例中,每周向受试者 (例如,人类受试者) 给予包含从约50毫克至约1,000毫克的抗体的一个或多个剂量。例如,抗体的剂量可以包含至少约5mg、15mg、25mg、50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约120mg、约150mg、约200mg、约210mg、约240mg、约250mg、约280mg、约300mg、约350mg、约400mg、约420mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约650mg、约700mg、约750mg、约800mg、约850mg、约900mg、约950mg或高达约1,000mg的抗体。还考虑了在任何与所有这些重点之间的范围,例如约50mg至约80mg、约70mg至约140mg、约70mg至约270mg、约75mg至约100mg、约100mg至约150mg、约140mg至约210mg、或约150mg至约200mg、或约180mg至约270mg、或约280至约410mg。剂量以任何间隔给予,例如每周多次 (例如,每周两次或三次)、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次。在一些或任何实施例中,每周两次给予约120mg至约210mg的抗体的剂量。在一些或任何实施例中,每周两次给予约140mg抗体的剂量。在多个方面,每月一次给予约210mg抗体的剂量。

[0093] 在一些实施例中,一种或多种剂量的抗体可以包含在约0.1至约50毫克之间(例如,在约5与约50毫克之间)、或约1至约100毫克的抗体/千克体重(mg/kg)。例如,抗体的剂量可以包含至少约0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约26mg/kg、约27mg/kg、约28mg/kg、约29mg/kg、约30mg/kg、约31mg/kg、约32mg/kg、约33mg/kg、约34mg/kg、约35mg/kg、约36mg/kg、约37mg/kg、约38mg/kg、约39mg/kg、约40mg/kg、约41mg/kg、约42mg/kg、约43mg/kg、约44mg/kg、约45mg/kg、约46mg/kg、约47mg/kg、约48mg/kg、或约49mg/kg、或约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg、或高达约100mg/kg。还考虑了任何与所有这些终点之间的范围,例如约1mg/kg至约3mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约8mg/kg、约3mg/kg至约8mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约40mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、或约5mg/kg至约20mg/kg。

#### [0094] 监测疗法

[0095] 可以使用单能量和双能量X射线吸收测量法、超声波、计算机断层扫描、射线照相术、和磁共振成像来测量抗体介导的骨矿物质含量、或骨密度的增加。骨量的量也可以通过体重或通过使用其他方法计算(参见,Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* [代谢性骨病及相关研究], 5:177-181 (1984))。将动物模型用于本领域中用于测试药物组合物和方法对例如骨损失、骨吸收、骨形成、骨强度、或骨矿化的参数的影响,这些动物模型模拟人类疾病的条件,如骨质疏松症和骨质减少。此类模型的实例包括卵巢切除的大鼠模型(Kalu, *Bone and Mineral* [骨和矿物质], 15:175-192 (1991)); Frost和Jee, *Bone and Mineral* [骨和矿物质], 18:227-236 (1992); 以及Jee和Yao, *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* [神经元相互作用杂志], 1:193-207 (2001))。本文描述的测量抗体活性的方法也可用于确定其他硬骨素抑制剂的功效。

[0096] 在人类中,骨矿物质密度可以使用例如髌部和脊柱的双X射线吸收测定法(DXA)在临床上确定。其他技术包括定量计算机断层扫描(QCT)、超声波检查、单能X射线吸收测定(SXA)、和射线照相吸光测定。用于测量的常见中央骨骼部位包括脊柱和臀部;外围部位包括前臂、手指、手腕和脚后跟。除超声波检查外,美国医学协会指出BMD技术通常涉及使用X射线,并且基于辐射衰减取决于辐射路径中组织的厚度和组成的原理。所有技术都涉及将结果与规范数据库进行比较。

[0097] 可替代地,可以通过监测骨标记水平来测量对一种或多种抗硬骨素抗体的生理反应。骨标记是在骨重塑过程中产生的产物,并且由骨、成骨细胞、和/或破骨细胞释放。骨吸收和/或骨形成“标记”水平的波动意味着骨重塑/建模的变化。国际骨质疏松症基金会(IOF)推荐使用骨标记来监测骨密度疗法(参见,例如,Delmas等人, *Osteoporos Int.* [国际骨质疏松症], 增刊6:S2-17 (2000), 通过引用结合)。指示骨吸收(或破骨细胞活性)的标记包括例如,C-端肽(例如,1型胶原的C末端端肽(CTX)或血清交联的C端肽)、N-端肽(1型胶原的N末端端肽(NTX))、脱氧吡啶啉(DPD)、吡啶啉、尿羟基脯氨酸、半乳糖基羟基赖氨酸、和抗酒石酸酸性磷酸酶(例如,抗酒石酸酸性磷酸酶异构体5b)。骨形成/矿化标记包括但不限于骨特异性碱性磷酸酶(BSAP)、从I型原胶原(P1NP, PICP)的N末端和C末端延伸释放的肽、和骨钙蛋白(OstCa)。若干种试剂盒可商购获得以检测和定量临床样品(如尿液和血液)中的

标记。

#### [0098] 组合疗法

[0099] 通过靶向相同病原体或生物化学途径或生物过程的两种或更多种药剂组合来治疗病理有时导致相对于单独使用治疗相关剂量的每种药剂而言更大的功效和减少的副作用。在一些情况下,药物组合的功效是累加的(组合的功效大约等于每种药物单独作用的总和),但在其他情况下,效果是协同的(组合的功效大于单独给予每种药物的效果总和)。如本文所用,术语“组合疗法”意指两种或更多种药剂以同时方式递送(例如同时发生地),或其中首先给予一种药剂、然后给予第二种药剂,例如顺序地给予。

[0100] 在一些实施例中,将抗体与标准护理治疗剂一起给予,用于治疗降低的骨矿物质密度(即,抗体和标准护理治疗剂是同一治疗计划的一部分)。如本文所用,术语“标准护理”是指通常被临床医生接受用于经诊断患有某种疾病的某类患者的治疗。在一些实施例中,将抗体与第二骨增强剂一起给予用于治疗降低的骨矿物质密度或骨缺损。在一些实施例中,骨增强剂选自下组,该组由以下组成:抗再吸收剂、骨形成剂(即,合成代谢剂),雌激素受体调节剂(包括但不限于雷洛昔芬、巴多昔芬、和拉索昔芬)和对破骨细胞具有抑制作用的药物。在一些实施例中,第二骨增强剂选自下组,该组由以下组成:二膦酸盐(包括但不限于阿仑膦酸钠(**FOSAMAX®**)、利塞膦酸盐、伊班膦酸钠(**BONIVA®**)、和唑来膦酸(**RECLAST®**));雌激素或雌激素类似物;抗RANK配体(RANKL)抑制剂,如抗RANKL抗体(例如,迪诺舒单抗(denosumab), **PROLIA®**);维生素D、或维生素D衍生物、或其模拟物;钙源、组织蛋白酶-K(cat-K)抑制剂(例如,奥当卡替(odanacatib))、替勃龙(Tibolone)、降钙素或骨化三醇;和激素替代疗法。在一些实施例中,第二骨增强剂包括但不限于甲状旁腺素(PTH)或其肽片段、PTH相关的蛋白质(PTHrp)、骨形态发生蛋白质、成骨素、NaF、PGE2激动剂、他汀类、雷尼酸锶、和硬骨素抑制剂(例如,描述于美国专利号7,592,429或7,872,106中的抗硬骨素抗体)。在一些实施例中,第二骨增强剂是**Forteo®**(特立帕肽)、**Preotact®**、或**Protelos®**。在一些实施例中,第二吸收剂包含骨形态发生蛋白质(例如,BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13、BMP-14和/或BMP-15)。

[0101] 在一些实施例中,采用本文描述的抗体的组合疗法可以在给予一种或多种另外的治疗剂(例如,第二骨增强剂)之前或之后,以范围从数分钟至数周至数月的间隔进行。例如,在彼此的约24小时内,例如在彼此约6-12小时内、或在彼此约1-2小时内、或在彼此约10-30分钟内给予单独的模式。在一些情况下,可能需要显著延长治疗时间,其中若干天(2、3、4、5、6、或7天)至若干周(1、2、3、4、5、6、7、或8周)在不同模式的各给药之间失效。特别考虑了使用组合疗法的一种或两种药剂/疗法的重复治疗。

#### [0102] 维持治疗方案

[0103] 还考虑了在维持方案中使用第二骨增强剂和/或本文描述的抗体,以例如预防或减缓骨矿物质密度的流失。在这一点上,本文描述的方法或用途任选地包括给予一种或多种量的第二骨增强剂,其在抗体的治疗期结束后将骨矿物质密度有效地维持约1周至约5年的维持期。例如,在一些实施例中,本文描述的方法或用途包含向受试者给予第二骨增强剂持续约至少约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11

周、约12周、约3月、约13周、约14周、约15周、约16周、约4月、约17周、约18周、约19周、约20周、约5月、约21周、约22周、约23周、约24周、约6月、约25周、约26周、约27周、约28周、约7月、约29周、约30周、约31周或更久(例如,约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、约1年、约15个月、约18个月、约2年、约3年、约4年、约5年或更久(例如,经受试者的终生)的维持期。在一些实施例中,维持期是约6-12周。在一些实施例中,维持期是约4-12周、或约1-3月。在一些实施例中,维持期是约12-20周、或约3-5月。在一些实施例中,维持期是约20-32周、或约5-8月。在一些实施例中,维持期是约24-36周、或约6-9月。在一些实施例中,维持期是约1年、约2年、约3年、约4年、约5年或更久。“维持”骨矿物质密度包括维持接受抗体治疗的受试者中经历的相似水平的骨矿物质密度参数。

#### [0104] 药剂盒

[0105] 可以将包含一种或多种本文描述的抗体的药物组合物与提供关于使用此类药物组合物的说明书的包装材料一起放置在容器内(例如,小瓶或注射器)。通常,此类说明书将包括描述抗体浓度,以及在某些实施例中,可能是重新配制药组合物所必需的赋形剂成分或稀释剂(例如,水、盐水或PBS)的相对量的明确表达。

#### [0106] 实例

##### [0107] 实例1-洛莫索珠单抗PARG C末端变体的分析

[0108] 野生型洛莫索珠单抗和洛莫索珠单抗PARG C末端变体通过Lys-C消化,并通过LC/MS肽图谱分析。将这两种构建体的UV图谱并排比较(图3)。经确定,野生型洛莫索珠单抗和洛莫索珠单抗PARG C末端变体在37.7分钟洗脱具有相似的峰,但是经确定,野生型洛莫索珠单抗具有659.3Da的质量,而经确定,洛莫索珠单抗PARG C末端变体具有886.7Da的质量。认为洛莫索珠单抗(PGK)的大多数赖氨酸(K)变体被从该过程中去除。当与野生型洛莫索珠单抗PG序列相比时,显著量的洛莫索珠单抗PARG C末端变体的酰胺化形式(828.6Da峰)的存在证实酰胺化效率是序列依赖性的。

[0109] 然后,将PARG C末端变体用羧肽酶(CP-B)处理,并通过CEX-HPLC方法分析,并与PARG C末端变体对照(其未经CP-B处理)进行对比。在17.5min和21min洗脱的峰在处理后有显著的位移,但对于24min的峰没有位移(图4)。预期24min峰是双重酰胺化形式,其被保护免于蛋白水解降解。

##### [0110] 实例2-C末端变体富集

[0111] 通过阳离子交换色谱(CEX)分级实现从包含野生型洛莫索珠单抗和洛莫索珠单抗PARG C末端变体的组合物纯化和富集不同的洛莫索珠单抗种类。CEX基于表面电荷的差异分离蛋白质。在设定的pH,在阳离子交换柱(例如,Dionex Pro Pac WCX-10分析柱,2.0mm x 250mm)上分离野生型洛莫索珠单抗的带正电荷的变体,并使用盐梯度(例如,流动相A:10:90(v/v)ACN、19mM MES pH 6.2;流动相B:10:90(v/v)ACN、19mM MES、250mM NaCl,pH 6.2)洗脱。洛莫索珠单抗的不同C末端变体带电不同,更多的带正电荷的变体随后在CEX中洗脱。因此,洗脱顺序是:PG(野生型)、P-酰胺(酰胺化的野生型的脯氨酸)、PARG变体、和PAR-酰胺。可以对馏分收集器进行编程以在不同洗脱时间收集含有不同变体的CEX洗脱液。

##### [0112] 实例3-洛莫索珠单抗PARG C末端变体聚集的分析

[0113] 不受任何特定理论的束缚,预期因为PARG C末端变体是高度带电的,此类形式将排斥组合物中的非酰胺化形式,从而减少组合物中的聚集。

[0114] 使用SEC-HPLC与野生型洛莫索珠单抗蛋白质A池并排分析洛莫索珠单抗PARG C末端变体蛋白质A池,SEC-HPLC(尺寸排阻HPLC方法)基于其流体动力学体积的差异分离蛋白质(表1)。

[0115] 表1

[0116]	分子	%HMW
	AMG785 ARG ProA池	3.4%
	AMG785 WT ProA池	7.2%

[0117] 数据表明,与野生型洛莫索珠单抗相比,洛莫索珠单抗PARG C末端变体具有较少的高分子量物质。

[0118] 实例4-洛莫索珠单抗PARG C末端变体的粘度分析

[0119] 使用锥板来分析含有洛莫索珠单抗PARG C末端变体或野生型洛莫索珠单抗的抗体溶液。根据近似的体积消耗将溶液浓缩至120mg/mL,并使用在280nm处的蛋白质吸光度(稀释后最终在0.1-1个吸光度单位(AU)内)和蛋白质特异性消光系数来测定最终浓度(±10%)。使用CP-40轴(spindle)和样品杯或ARES-G2电流计(热分析仪器公司(TA Instruments),纽卡斯尔,特拉华州,美国),使用TA Smart Swap 2度锥/板轴在Brookfield LV-DVIII锥板仪器(布鲁克菲尔德工程公司(Brookfield Engineering),伯勒,马萨诸塞州,美国)上进行粘度分析。所有测量均在25°C进行,并通过附接至样品杯上的水浴进行控制。通过增加轴的RPM,在限定的扭矩范围(10%-90%)内手动收集多个粘度测量值。对测量值求平均值,以便报道每个样品的一个粘度值,以简化所得到的比较图表。

[0120] 实例5-莫索珠单抗PARG C末端变体的溶度分析

[0121] 为了确定皮下(SC)注射洛莫索珠单抗PARG变体的氨基酸变异与野生型洛莫索珠单抗相比对溶解度的影响,在野生型和PARG-C末端变体洛莫索珠单抗中平行进行透析溶解度测定。此筛选需要将洛莫索珠单抗PARG C末端变体的样品和野生型洛莫索珠单抗的样品透析进模拟SC空间的pH和离子强度的溶液中,并监测在很短的时间内抗体在这些条件下的溶解度和物理稳定性。在配制品缓冲液(pH 5.2)中将样品配制成约63mg/mL。然后将每个样品注入透析盒中并透析到PBS缓冲液中以模拟SC空间。在初次透析后24小时进行目测。野生型洛莫索珠单抗通常在24小时后显示出沉淀。

[0122] 结果显示在该分析中两种分子均沉淀,但PARG C末端变体沉淀较少且速率较慢。这表明该变体比野生型更能抵抗沉淀,尽管该变体不能完全消除沉淀。

[0123] 实例6-洛莫索珠单抗PARG C末端变体的扩散分析

[0124] 为了确定洛莫索珠单抗PARG C末端变体的氨基酸变异与野生型洛莫索珠单抗相比对从皮下(SC)空间扩散的影响,使用Scissor(Pion Inc.(Pion Inc.),比勒利卡,MA)进行测定。此测定需要将样品(洛莫索珠单抗PARG C末端变体或野生型洛莫索珠单抗)约70mg/mL注射到模拟的SC空间(由胶原和透明质酸基质组成)中。抗体能够通过透析膜扩散出该基质,进入pH 7.4的碳酸盐缓冲液储库中。收集时间点长达3天,并通过RP-HPLC测定每个时间点的蛋白质浓度。产生的蛋白质浓度对时间曲线模拟来自SC空间的扩散速率。此外,用目视检查监测SC基质中的沉淀。

[0125] 如上所述,在Scissor中测试野生型和PARG C末端变体洛莫索珠单抗两者。图5中显示的结果表明野生型洛莫索珠单抗以低得多的速率从模拟的SC空间扩散,并且在模拟的

注射位点保留比PARG C末端变体洛莫素珠单抗更多的野生型洛莫素珠单抗。

[0126] 实例7-FcRn结合

[0127] FcRn(新生儿Fc受体)是MHC I类样异二聚体,由跨膜 $\alpha$ 链(与MHC I类样分子同源)和 $\beta 2$ 微球蛋白轻链组成。FcRn在轻度酸性条件下(约pH 6)与IgG分子的Fc区域的IgG重链的 $C_{H2}$ 与 $C_{H3}$ 结构域之间的界面结合,并在中性条件下pH(约7.4)释放。通过这种高pH依赖性相互作用,FcRn通过维持血清IgG水平介导成人的IgG稳态。

[0128] 使用竞争性结合测定(**AlphaScreen**<sup>®</sup> binding测定(珀金埃尔默公司(PerkinElmer),圣何塞,加利福尼亚州)评估野生型洛莫素珠单抗的Fc结构域和洛莫素珠单抗PARG C末端变体与FcRn的结合。该测定是基于珠的扩增的发光接近性均相测定法(amplified luminescent proximity homogeneous assay,“Alpha”),其检测双分子相互作用。该测定含有两种珠类型,受体珠和供体珠。受体珠涂有含有噻吩衍生物的水凝胶、以及与组氨酸标记的FcRn(FcRn-His)的组氨酸结构域结合的镍螯合物。供体珠涂有含有酞菁、光敏剂、和链霉亲和素的水凝胶,其与生物素化的CHO衍生的人类Fc结合。当FcRn-His和生物素化的人类Fc结合在一起时,它们使受体和供体珠紧密接近。当将激光施加到此复合物上时,通过供体珠将环境氧转化为单线态氧。如果珠非常接近,发生了能量转移至受体珠,这导致光的产生(发光),这是在装备的**AlphaScreen**<sup>®</sup>信号检测读板器中测量的。

[0129] 当抗体以足够的浓度存在以抑制FcRn-His与生物素化的人类Fc结构域的结合时,观察到570nm处的发射的剂量依赖性降低。确定相对于抗体参考标准的测试样品结合并报告为%相对结合,并且可用于证明抗体的Fc结构域的完整性。预期具有PARG C末端变体的组合物将具有与野生型抗体相似或更好的剂量响应曲线。

[0130] 结果示于图6中。观察到野生型洛莫素珠单抗与PARG C末端变体洛莫素珠单抗两者相似地结合FcRn,并且FcRn结合不被PARG突变所影响。

[0131] 实例8-Fc  $\gamma$  RIIa结合

[0132] Fc  $\gamma$  RIIa是在单核细胞、某些树突细胞、嗜中性粒细胞、B细胞、血小板和NK细胞上表达的活化Fc受体。Fc  $\gamma$  RIIa(CD32a)是分布最广的Fc  $\gamma$  R,具有两个胞外Ig样结构域和对单体IgG的低结合亲和力。在人类中存在两种常见的等位基因变体,其已知存在于Fc  $\gamma$  RIIa,在位置131处表达组氨酸或精氨酸(分别为131H和131R)。

[0133] 开发竞争性结合测定以评估野生型洛莫素珠单抗和洛莫素珠单抗PARG C末端变体与Fc  $\gamma$  RIIa(131H)的结合。Fc  $\gamma$  RIIa(131H)结合测定是基于珠的扩增的发光接近性均相测定法(**AlphaScreen**<sup>®</sup>结合测定(珀金埃尔默公司(PerkinElmer),圣何塞,加利福尼亚州),其检测双分子相互作用。该测定含有2种珠类型,受体珠和供体珠。受体珠含有荧光团螯合物,并涂有含有谷胱甘肽的水凝胶,谷胱甘肽结合重组人类Fc  $\gamma$  RIIa(131H)-谷胱甘肽-S-转移酶(Fc  $\gamma$  RIIa(131H)-GST)。供体珠涂有含有酞菁、光敏剂、和链霉亲和素的水凝胶,其与生物素化的人类IgG1结合。当Fc  $\gamma$  RIIa(131H)-GST与生物素化的人类IgG1结合在一起时,它们使受体和供体珠子接近。当将激光施加到此复合物时,环境氧被供体珠转化为单线态氧。当受体和供体珠接近时,单线态氧在受体珠内扩散,这导致光产生(发光),这是在装备用于发光信号检测的板读数器中测量的。

[0134] 当抗体以足够的浓度存在以抑制Fc  $\gamma$  RIIa(131H)-GST与生物素化的人类IgG1的

结合时,测量570nm处的发射的剂量依赖性降低。确定相对于抗体参考标准的测试样品结合并报告为%相对结合,并且可用于证明抗体的Fc结构域的完整性。结果示于图7中。观察到PARG C末端变体洛莫索珠单抗与Fc  $\gamma$  RIIa(131H)的相对结合远高于野生型洛莫索珠单抗。

[0135] 实例9-小鼠药代动力学研究

[0136] 为了评估体内药物暴露和生物利用度,在小鼠中进行单剂量药代动力学研究。将洛莫索珠单抗PARG C末端变体以1mg/kg的剂量静脉注射(通过尾静脉)或皮下注射。每组使用9只动物,交错取样允许在大量时间点收集数据,而不超过可从单个动物抽取的最大血液量。在每个时间点,抽取0.05ml血液。在给药后0.083、24、96和192小时对动物1至3进行取样。在1、48、168、和240小时对动物4-6进行取样。在6、72、和192小时对动物7-9进行取样。从全血样品中收集血清,并通过结合免疫测定(如ELISA(酶联免疫吸附测定))确定测试物的浓度。测试物品浓度随时间的变化可用于通过两室分析计算药代动力学参数。感兴趣的参数包括但不限于每个剂量组的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC)、半衰期( $t_{1/2}$ )和清除率(CL)。生物利用度可以确定为皮下剂量的AUC与静脉内剂量的AUC的比率。

[0001] 序列表

[0002] <110> 美商安进公司(Amgen Inc.)

[0003] <120> C末端抗体变体

[0004] <130> 31173/52080

[0005] <150> US 62/650,762

[0006] <151> 2018-03-30

[0007] <150> US 62/812,741

[0008] <151> 2019-03-01

[0009] <160> 16

[0010] <170> PatentIn 版本3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 190

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 智人

[0015] <220>

[0016] <221> 尚未归类的特征

[0017] <223> 人类硬骨素

[0018] <400> 1

[0019] Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu

[0020] 1 5 10 15

[0021] Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr

[0022] 20 25 30

[0023] Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro Phe Glu

[0024] 35 40 45

[0025] Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu Leu His Phe Thr Arg

[0026] 50 55 60

[0027] Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu

[0028] 65 70 75 80

[0029] Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile

[0030] 85 90 95

[0031] Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile

[0032] 100 105 110

[0033] Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly

[0034] 115 120 125

[0035] Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys

[0036] 130 135 140

[0037] Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly

[0038] 145 150 155 160

[0039] Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala  
 [0040] 165 170 175  
 [0041] Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr  
 [0042] 180 185 190  
 [0043] <210> 2  
 [0044] <211> 5  
 [0045] <212> PRT  
 [0046] <213> 小家鼠  
 [0047] <220>  
 [0048] <221> 尚未归类的特征  
 [0049] <223> 洛莫索珠单抗 HCDR1(romo HCDR1)  
 [0050] <400> 2  
 [0051] Asp Tyr Asn Met His  
 [0052] 1 5  
 [0053] <210> 3  
 [0054] <211> 17  
 [0055] <212> PRT  
 [0056] <213> 小家鼠  
 [0057] <220>  
 [0058] <221> 尚未归类的特征  
 [0059] <223> 洛莫索珠单抗HCDR2  
 [0060] <400> 3  
 [0061] Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 [0062] 1 5 10 15  
 [0063] Gly  
 [0064] <210> 4  
 [0065] <211> 14  
 [0066] <212> PRT  
 [0067] <213> 小家鼠  
 [0068] <220>  
 [0069] <221> 尚未归类的特征  
 [0070] <223> 洛莫索珠单抗HCDR3  
 [0071] <400> 4  
 [0072] Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
 [0073] 1 5 10  
 [0074] <210> 5  
 [0075] <211> 11  
 [0076] <212> PRT  
 [0077] <213> 小家鼠

- [0078] <220>  
[0079] <221> 尚未归类的特征  
[0080] <223> 洛莫索珠单抗LCDR1  
[0081] <400> 5  
[0082] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
[0083] 1 5 10  
[0084] <210> 6  
[0085] <211> 7  
[0086] <212> PRT  
[0087] <213> 小家鼠  
[0088] <220>  
[0089] <221> 尚未归类的特征  
[0090] <223> 洛莫索珠单抗LCDR2  
[0091] <400> 6  
[0092] Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser  
[0093] 1 5  
[0094] <210> 7  
[0095] <211> 9  
[0096] <212> PRT  
[0097] <213> 小家鼠  
[0098] <220>  
[0099] <221> 尚未归类的特征  
[0100] <223> 洛莫索珠单抗LCD3  
[0101] <400> 7  
[0102] Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Tyr Thr  
[0103] 1 5  
[0104] <210> 8  
[0105] <211> 4  
[0106] <212> PRT  
[0107] <213> 智人  
[0108] <220>  
[0109] <221> 尚未归类的特征  
[0110] <223> C末端变体序列  
[0111] <400> 8  
[0112] Pro Ala Arg Gly  
[0113] 1  
[0114] <210> 9  
[0115] <211> 123  
[0116] <212> PRT



[0156]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Tyr
[0157]	85 90 95
[0158]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0159]	100 105
[0160]	<210> 11
[0161]	<211> 5
[0162]	<212> PRT
[0163]	<213> 智人
[0164]	<220>
[0165]	<221> 尚未归类的特征
[0166]	<223> C末端变体序列
[0167]	<400> 11
[0168]	Pro Ala Arg Gly Lys
[0169]	1 5
[0170]	<210> 12
[0171]	<211> 236
[0172]	<212> PRT
[0173]	<213> 人工序列
[0174]	<220>
[0175]	<223> 人源化的抗体序列
[0176]	<220>
[0177]	<221> 尚未归类的特征
[0178]	<223> 洛莫索珠单抗轻链
[0179]	<400> 12
[0180]	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
[0181]	1 5 10 15
[0182]	Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
[0183]	20 25 30
[0184]	Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
[0185]	35 40 45
[0186]	Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
[0187]	50 55 60
[0188]	Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser Gly Val
[0189]	65 70 75 80
[0190]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0191]	85 90 95
[0192]	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0193]	100 105 110
[0194]	Gly Asp Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

[0195]	115	120	125
[0196]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
[0197]	130	135	140
[0198]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
[0199]	145	150	155
[0200]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
[0201]	165	170	175
[0202]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
[0203]	180	185	190
[0204]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
[0205]	195	200	205
[0206]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
[0207]	210	215	220
[0208]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0209]	225	230	235
[0210]	<210> 13		
[0211]	<211> 469		
[0212]	<212> PRT		
[0213]	<213> 人工序列		
[0214]	<220>		
[0215]	<223> 人源化的抗体序列		
[0216]	<220>		
[0217]	<221> 尚未归类的特征		
[0218]	<223> 无赖氨酸的洛莫素珠单抗重链变体		
[0219]	<400> 13		
[0220]	Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly		
[0221]	1	5	10
[0222]	Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
[0223]	20	25	30
[0224]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
[0225]	35	40	45
[0226]	Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
[0227]	50	55	60
[0228]	Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn		
[0229]	65	70	75
[0230]	Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser		
[0231]	85	90	95
[0232]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val		
[0233]	100	105	110

[0234]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr
[0235]	115 120 125
[0236]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
[0237]	130 135 140
[0238]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
[0239]	145 150 155 160
[0240]	Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
[0241]	165 170 175
[0242]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
[0243]	180 185 190
[0244]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
[0245]	195 200 205
[0246]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
[0247]	210 215 220
[0248]	Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
[0249]	225 230 235 240
[0250]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
[0251]	245 250 255
[0252]	Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0253]	260 265 270
[0254]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0255]	275 280 285
[0256]	His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0257]	290 295 300
[0258]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[0259]	305 310 315 320
[0260]	Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
[0261]	325 330 335
[0262]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
[0263]	340 345 350
[0264]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0265]	355 360 365
[0266]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[0267]	370 375 380
[0268]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0269]	385 390 395 400
[0270]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0271]	405 410 415
[0272]	Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

[0273]	420	425	430
[0274]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[0275]	435	440	445
[0276]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[0277]	450	455	460
[0278]	Ser Pro Ala Arg Gly		
[0279]	465		
[0280]	<210> 14		
[0281]	<211> 470		
[0282]	<212> PRT		
[0283]	<213> 人工序列		
[0284]	<220>		
[0285]	<223> 人源化的抗体序列		
[0286]	<220>		
[0287]	<221> 尚未归类的特征		
[0288]	<223> 具有赖氨酸的洛莫索珠单抗重链变体		
[0289]	<400> 14		
[0290]	Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly		
[0291]	1	5	10
[0292]	Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
[0293]	20	25	30
[0294]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
[0295]	35	40	45
[0296]	Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
[0297]	50	55	60
[0298]	Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn		
[0299]	65	70	75
[0300]	Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser		
[0301]	85	90	95
[0302]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val		
[0303]	100	105	110
[0304]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr		
[0305]	115	120	125
[0306]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
[0307]	130	135	140
[0308]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr		
[0309]	145	150	155
[0310]	Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
[0311]	165	170	175

[0312]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
[0313]	180 185 190
[0314]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
[0315]	195 200 205
[0316]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
[0317]	210 215 220
[0318]	Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
[0319]	225 230 235 240
[0320]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
[0321]	245 250 255
[0322]	Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0323]	260 265 270
[0324]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0325]	275 280 285
[0326]	His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0327]	290 295 300
[0328]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[0329]	305 310 315 320
[0330]	Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
[0331]	325 330 335
[0332]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
[0333]	340 345 350
[0334]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0335]	355 360 365
[0336]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[0337]	370 375 380
[0338]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0339]	385 390 395 400
[0340]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0341]	405 410 415
[0342]	Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[0343]	420 425 430
[0344]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0345]	435 440 445
[0346]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0347]	450 455 460
[0348]	Ser Pro Ala Arg Gly Lys
[0349]	465 470
[0350]	<210> 15

[0351] <211> 26  
 [0352] <212> PRT  
 [0353] <213> 智人  
 [0354] <220>  
 [0355] <221> 尚未归类的特征  
 [0356] <223> SEQ ID NO: 1的氨基酸86-111  
 [0357] <400> 15  
 [0358] Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp  
 [0359] 1                    5                    10                    15  
 [0360] Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys  
 [0361]                    20                    25  
 [0362] <210> 16  
 [0363] <211> 468  
 [0364] <212> PRT  
 [0365] <213> 人工序列  
 [0366] <220>  
 [0367] <223> 人源化的抗体序列  
 [0368] <220>  
 [0369] <221> 尚未归类的特征  
 [0370] <223> 洛莫索珠单抗重链野生型  
 [0371] <400> 16  
 [0372] Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 [0373] 1                    5                    10                    15  
 [0374] Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 [0375]                    20                    25                    30  
 [0376] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 [0377]                    35                    40                    45  
 [0378] Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 [0379]                    50                    55                    60  
 [0380] Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ala Gly Tyr Asn  
 [0381] 65                    70                    75                    80  
 [0382] Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser  
 [0383]                    85                    90                    95  
 [0384] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val  
 [0385]                    100                    105                    110  
 [0386] Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Asp Ile Tyr Asp Asp Trp Tyr  
 [0387]                    115                    120                    125  
 [0388] Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 [0389]                    130                    135                    140

[0390]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
[0391]	145 150 155 160
[0392]	Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
[0393]	165 170 175
[0394]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
[0395]	180 185 190
[0396]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
[0397]	195 200 205
[0398]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
[0399]	210 215 220
[0400]	Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
[0401]	225 230 235 240
[0402]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
[0403]	245 250 255
[0404]	Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0405]	260 265 270
[0406]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0407]	275 280 285
[0408]	His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0409]	290 295 300
[0410]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[0411]	305 310 315 320
[0412]	Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
[0413]	325 330 335
[0414]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
[0415]	340 345 350
[0416]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0417]	355 360 365
[0418]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[0419]	370 375 380
[0420]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0421]	385 390 395 400
[0422]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0423]	405 410 415
[0424]	Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[0425]	420 425 430
[0426]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0427]	435 440 445
[0428]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

[0429]	450	455	460
[0430]	Ser Pro Gly Lys		
[0431]	465		

CCGGGTAAAT GAGCGGCCGC GTTTAAACGG  
 CCGGGTAAAT GAGCGGCCGC GTTTAAACGG  
 .....  
 CCGGGTAAAT GAGCGGCCGC GTTTAAACGG  
 P G K .

图1

CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGT  
 CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGT  
 .....  
 CCGGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC GGT  
 P A R G .

图2

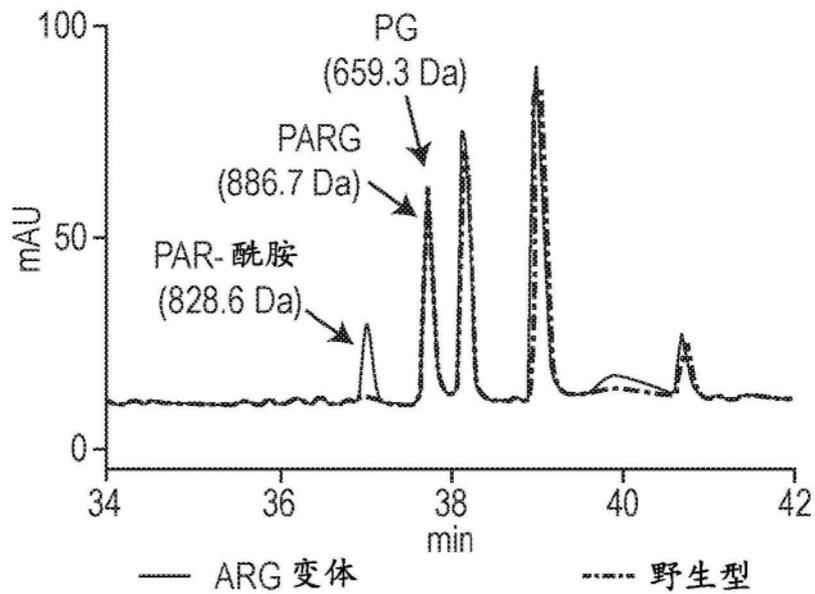


图3

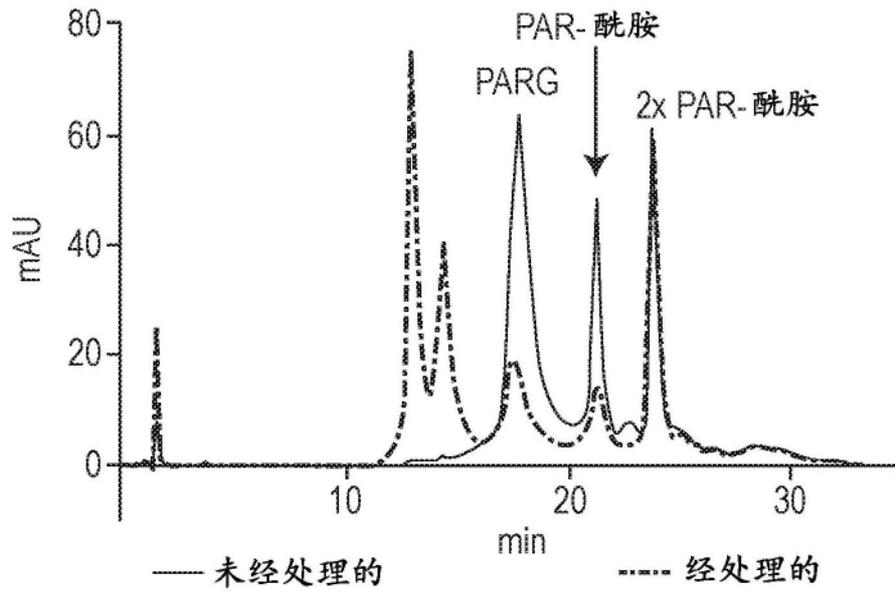


图4

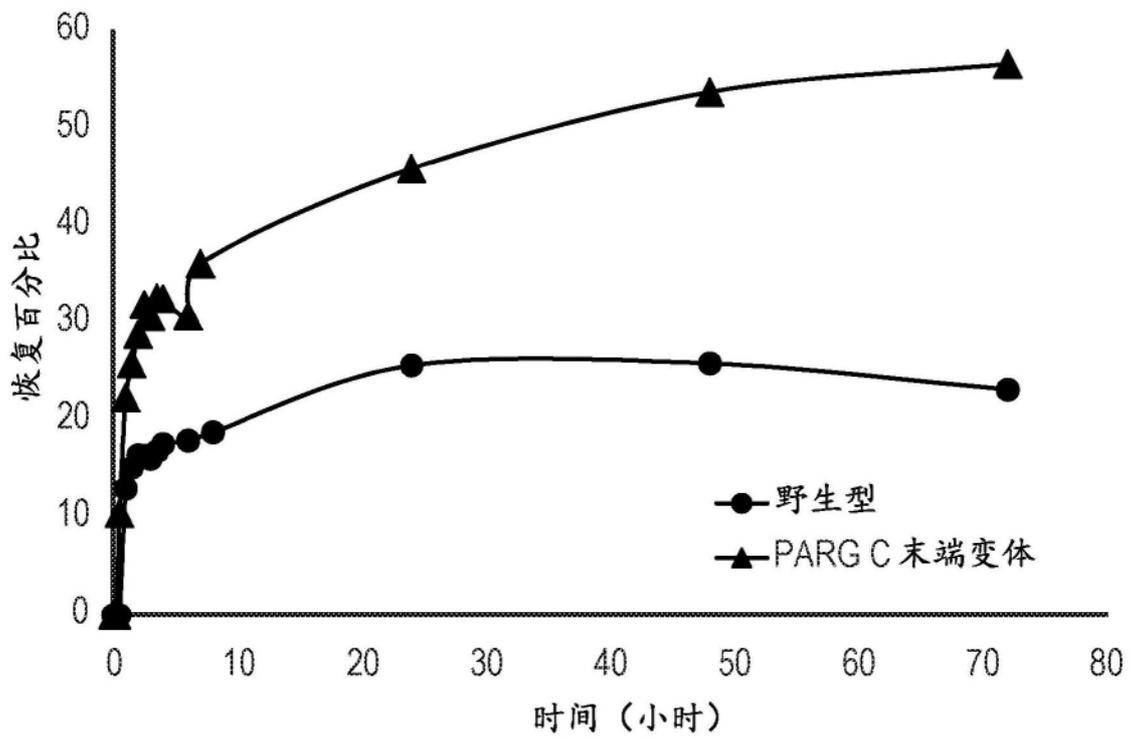


图5

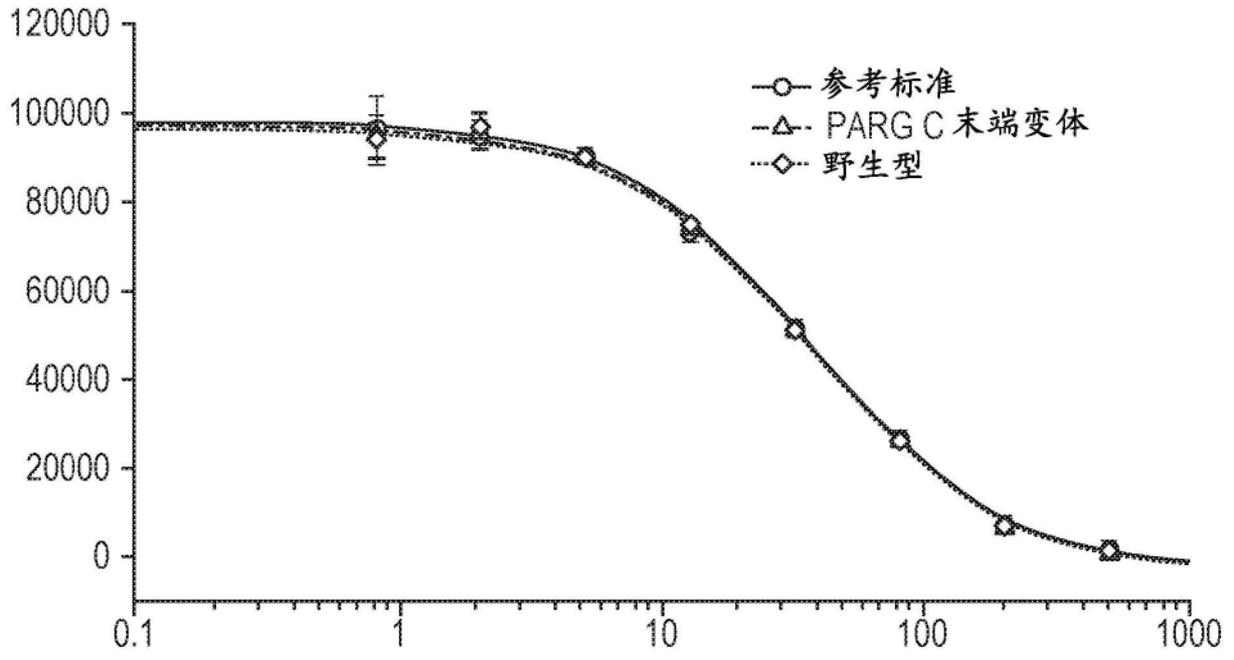


图6

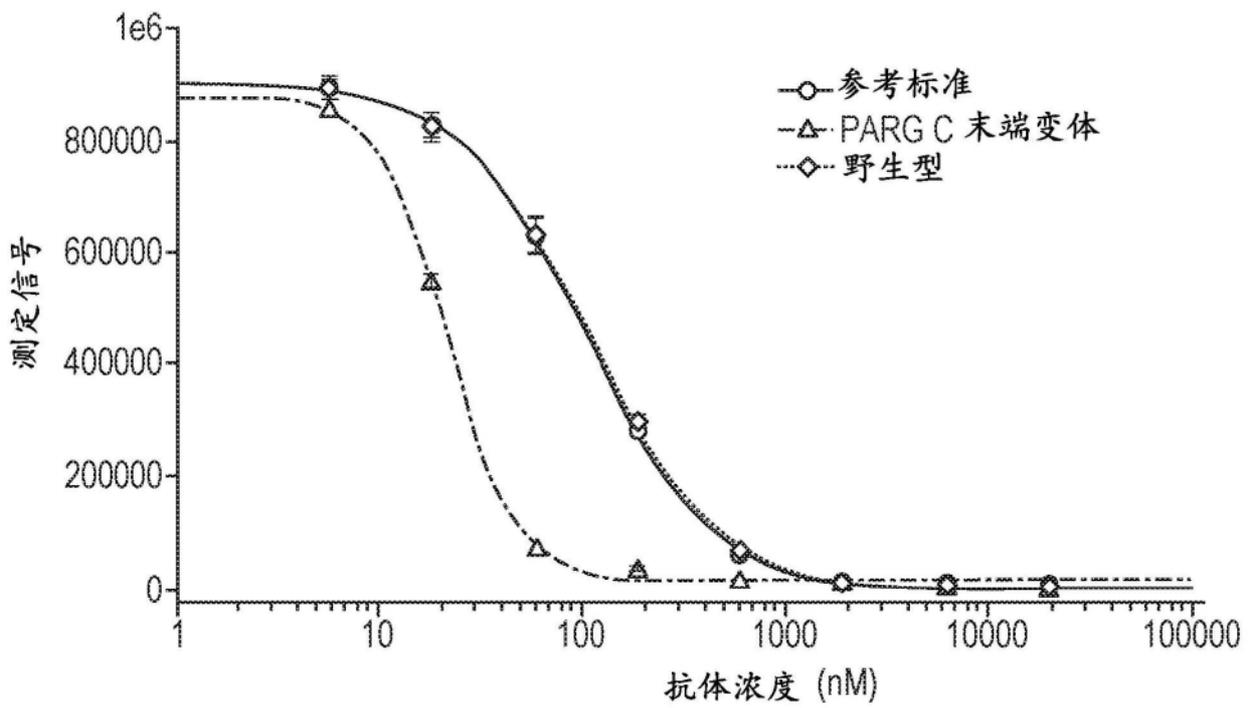


图7