



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103965357 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 17

(21) 申请号 201310753972. 3

(22) 申请日 2013. 12. 31

(73) 专利权人 嘉和生物药业有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区哈雷路 1043 号 602 室

(72) 发明人 周清 冯晓 粘伟红 刘悦

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限
公司 31224

代理人 吕伴

(56) 对比文件

CN 102241776 A, 2011. 11. 16,

CN 103060274 A, 2013. 04. 24,

CN 102741286 A, 2012. 10. 17,

审查员 刘俊

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

A61P 19/08(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书34页 附图2页

(54) 发明名称

一种抗人 RANKL 抗体

(57) 摘要

本发明涉及单克隆技术领域,具体涉及一种抗人 RANKL 抗体。本发明提供抗人 RANKL 抗体,其可特异性结合如 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列。所述抗体不仅特异性地与人 RANKL 结合,还与食蟹猴的 RANKL 有交叉免疫反应,并与鼠源 RANKL 没有免疫交叉反应。重要的是通过 RANKL 与相应受体 RANK 的竞争结合实验,筛选获得了可以阻断 RANKL/RANK 结合,且阻断能力不低于,甚至优于 Denosumab 的单克隆抗体。

1. 一种抗人RANKL抗体,其特征在于其可特异性结合如SEQ ID NO:1所述的氨基酸序列,并且包括重链和轻链,所述重链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述轻链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,并且所述抗体与RANKL结合,阻断RANK与RANKL相互作用。

2. 如权利要求1所述的抗人RANKL抗体,其特征在于所述抗人RANKL抗体为单链抗体或人源化抗体。

3. 一种药物组合物,其活性成分为权利要求1所述的抗人RANKL抗体。

4. 权利要求1所述的抗人RANKL抗体在制备治疗骨损失疾病药物中用途。

一种抗人RANKL抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆技术领域,具体涉及一种抗人RANKL抗体。

背景技术

[0002] 人体骨骼是动态的不断变化的组织,破骨细胞吸收骨质后,成骨细胞形成骨质,完成一个正常的骨重塑循环。成年人骨重塑率在每年2-10%。正常情况下骨吸收与骨形成(骨代谢)保持动态平衡,破骨细胞与成骨细胞之间的平衡打破后会造成骨质过多(骨质硬化)或骨质过少(骨质疏松)。

[0003] 在骨代谢过程中,OPG/RANKL/RANK系统是发挥重要调节作用的关键信号通路,已有文献报道发现一些全身性代谢疾病如骨质疏松、类风湿性疾病、肿瘤以及骨折愈合等疾病都存在骨改建活性的增强,与RANK/RANKL/OPG系统有密切关系。

[0004] 细胞核因子- κ B受体活化因子配基(Receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL),又称为tumor necrosis factor ligand superfamily member11 (TNFSF11), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), osteoprotegerin ligand (RANKL), and osteoclast differentiation factor (ODF),是细胞因子TNF家族的一员,通过与NF- κ B (RANK, 也称作破骨细胞分化和激活受体,或ODAR)的受体结合而促进破骨细胞的形成。另一方面,骨保护素(OPG)通过隔离RANKL并且阻止RANKL与RANK缔合而抑制破骨细胞的形成。因此,与RANK缔合的RANKL的量与下骨吸收与骨形成之间的平衡相关。

[0005] 许多疾病通过增加破骨细胞的数量和(或)增强破骨细胞的活性而引起骨量减少,如绝经后和老年性骨质疏松症、恶性肿瘤并发体液性高钙血症、肿瘤转移、Paget's骨病、类风湿性关节炎、甲状旁腺功能亢进、假体周边骨自溶症等。绝经后雌激素水平下降,IL21、IL26、TNF- α 的基因表达增加,促进破骨细胞的增殖、分化、融合,抑制其凋亡,使骨吸收增加,骨代谢偶联失衡,从而导致了骨质疏松。骨质疏松疾病的治疗主要从两方面着手:(一)促进成骨细胞的骨形成作用;(二)抑制破骨细胞的骨吸收作用。另外还通过提供骨矿化药物如钙制剂和维生素等促进上述过程。

[0006] 阻断RANKL/RANK信号传递能抑制破骨细胞形成和活性,阻断骨吸收,从而治疗骨质疏松症,已证实是一条可行的途径。美国Amgen公司出品的Denosumab为通过免疫人IgG转基因小鼠XenoMouse获得的全人源抗人RANKL单抗隆抗体,能阻断RANKL/RANK信号传递,有效抑制破骨细胞形成和活性,阻断骨吸收和骨质破坏。2010年被US FDA批准治疗妇女绝经后骨质疏松。欧洲还批准了用于前列腺癌相关的骨丢失。Denosumab抗体的临床有效性使得RANKL作为单克隆抗体药物治疗一系列由于破骨细胞活动增强导致的骨丢失的骨代谢疾病的靶点得到最终验证。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是提供抗人RANKL抗体、药物组合物及其用途。

[0008] 第一方面,本发明提供抗人RANKL抗体,其可特异性结合如SEQ ID NO:1所述的氨

基酸序列。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗人RANKL抗体,包括重链和轻链,其中:a)重链包括SEQ ID NO:2-9的氨基酸序列中之一所示的可变区;并且b)轻链包括SEQ ID NO:10-17的氨基酸序列中之一所示的可变区;并且所述抗体与RANKL结合,阻断RANK与RANKL相互作用。

[0010] 在一些实施方案中,所述抗人RANKL抗体为单链抗体或人源化抗体。人源化抗体包括嵌合抗体、改型抗体和全人源化抗体等

[0011] 在另一方面中,本发明涉及编码抗人RANKL抗体分子的核酸以及含有所述核酸的宿主细胞。

[0012] 本发明还涉及含有本发明的至少一种抗人RANKL抗体分子及任选所述组合物的一或多种其它组份的产物或组合物。

[0013] 本发明还涉及制备或生成本文所述抗人RANKL抗体分子、核酸、宿主细胞、产物及组合物的方法。

[0014] 本发明还涉及所述抗人RANKL抗体分子在制备治疗骨损失疾病药物中用途。

[0015] 在本发明的一些实施方案中,提供了治疗骨质疏松疾病的方法,包括施用有效量的抗体。在一些实施方案中,提供了治疗骨质疏松疾病的方法,包括施用药物组合物。

[0016] 在一些实施方案中,提供了治疗患者中的伴随骨损失的炎症状况的方法,包括施用药物组合物。

[0017] 在一些实施方案中,提供了治疗患者中的伴随骨损失的自身免疫疾病的方法,包括施用药物组合物。

[0018] 在一些实施方案中,提供了治疗患者中的类风湿性关节炎的方法,包括施用本发明的药物组合物。

[0019] 在本发明的实施方案中,提供了检测生物样品中人RANKL水平的方法,包括使样品接触抗体。

[0020] 自然人RANKL蛋白在体内存在三种形式,全长的跨膜性质蛋白,不含胞内区的膜结合蛋白和可溶性的蛋白(从137位Gly开始,到317位Asp,共181个氨基酸)。研究表明,生理条件下,RANKL主要以跨膜形态存在于成骨细胞表面,但在病理状态下,基质金属蛋白酶14(MMP14)和金属蛋白酶10(ADAM10)将跨膜形态的RANKL从细胞表面切割下来,释放出可溶性RANKL蛋白,导致循环中可溶性RANKL明显增高,破骨细胞活性增强。因此,本申请利用可溶性RANKL蛋白作为抗原,通过免疫小鼠和杂交瘤融合技术,经过系列筛选,获得鼠抗人RANKL单克隆抗体,并证实这些鼠源性抗体不仅特异性地与人RANKL结合,还与食蟹猴的RANKL有交叉免疫反应,并与鼠源RANKL没有免疫交叉反应。重要的是通过RANKL与相应受体RANK的竞争结合实验,筛选获得了可以阻断RANKL/RANK结合,且阻断能力不低于,甚至优于Denosumab的单克隆抗体。这些抗体可以在体外有效地抑制RANKL诱导的破骨细胞的分化。据此推断,这些单克隆抗体在体内应有效地抑制骨吸收和骨质疏松。这些鼠源抗体经过人-鼠嵌合或人源化改造,或者利用其与抗原结合并有中和作用的抗体片段,利用哺乳类动物细胞或原核细胞系统培养表达制备,可以成为适合临床药理治疗单克隆抗体药物。

附图说明

[0021] 图1显示了构建的重组人RANKL的核苷酸序列;

- [0022] 图2 anti-RANKL鼠单抗与human RANKL结合曲线。
- [0023] 图3 anti-RANKL鼠单抗与monkey RANKL结合曲线。
- [0024] 图4 anti-RANKL鼠单抗抑制RANKL与RANK-Fc结合曲线。
- [0025] 图5 anti-RANKL鼠单抗抑制human RANKL诱导的RAW264.7细胞分化的活性。

具体实施方式

[0026] 除非另有指示或定义,否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义,该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册,如Sambrook等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,,(第2版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Lewin,“Genes IV”,Oxford University Press,New York,(1990);及Roitt等人,“Immunology”(第2版),Gower Medical Publishing,London,New York(1989),以及本文中引用的一般现有技术;此外,除非另有说明,否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行,该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献

[0027] 除非另有说明,否则术语“免疫球蛋白”及“抗体”指完整免疫球蛋白及可结合所需抗原的免疫活性片段。免疫球蛋白与其免疫活性(抗原结合性)片段包括表位结合位点(亦即能被识别抗体的抗原特异性结合的位点或表位)。抗体片段实例包括例如Fab、F(v)、Fab`、F(ab`)2片段,由还原免疫球蛋白的二硫键而衍生的“半分子”,单链免疫球蛋白、或其他合适的抗原结合性片段(参见例如Bird等人,Science,242:423—426(1988);Huston等人,PMS,(USA),85:5879(1988);Webber等人,Mol.Immunol,32:249(1995))。抗体或其免疫活性片段可来自动物(例如啮齿类,如小鼠或大鼠)、或嵌合型(参见Morrison等人,PNAS,81:6851(1984);Jones等人,Nature,321:522(1986))。此外,本文所用的术语“序列”(例如在“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、或“蛋白序列”等的术语中)一般应理解为既包括相关氨基酸序列,又包括编码所述序列的核酸序列或核苷酸序列,除非本文需要更限定的解释。

[0028] 如本文所用的术语(多肽或蛋白的)“域”/“区”是指折叠蛋白结构域,其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言,域负责蛋白的单个的功能性质,且在许多情况下可添加、移除或转移至其他蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或域的功能。

[0029] 如本文所用的术语“抗体可变区”是指基本上由本领域及下文中分别称为为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”、及“互补决定区3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”。抗体可变区正是因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。

[0030] 抗原结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以本身已知的任何适合方式来测定,包括例如本文所述的分析、斯卡查德分析(Scatchardanalysis)和/或竞争性结合分析(例如放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)及夹心式竞争性分析(sandwich competition assay))及本领域中本身已知的其不同变化形式。

[0031] 氨基酸残基将根据如本领域中公知且达成一致的标准三字母或一字母氨基酸码加以指示。在比较两个氨基酸序列时,术语“氨基酸差异”是指相比于第二序列,在参考序列某一位置处指定数目氨基酸残基的插入、缺失或取代。在取代的情况下,所述取代将优选为保守氨基酸取代,所述保守氨基酸是指氨基酸残基被化学结构类似的另一氨基酸残基置换,且其对多肽的功能、活性或其他生物性质影响较小或基本上无影响。所述保守氨基酸取

代在本领域中是公知的,例如根据W098/49185,其中保守氨基酸取代优选是以下组(i)-(v)内的一个氨基酸被同一组内的另一氨基酸残基所取代:(i)较小脂族非极性或弱极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro及Gly;(ii)极性带负电残基及其(不带电)酰胺:Asp、Asn、Glu及Gln;(iii)极性带正电残基:His、Arg及Lys;(iv)较大脂族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val及Cys;及(V)芳族残基:Phe、Tyr及Trp。特别优选的保守氨基酸取代如下:Ala被Gly或Ser取代;Arg被Lys取代;Asn被Gln或His取代;Asp被Glu取代;Cys被Ser取代;Gln被Asn取代;Glu被Asp取代;Gly被Ala或Pro取代;His被Asn或Gln取代;Ile被Leu或Val取代;Leu被Ile或Val取代;Lys被Arg、Gln或Glu取代;Met被Leu、Tyr或Ile取代;Phe被Met、Leu或Tyr取代;Ser被Thr取代;Thr被Ser取代;Trp被Tyr取代;Tyr被Trp或Phe取代;Val被Ile或Leu取代。

[0032] 本领域技术人员应用公知技术能确定这里提到的多肽的合适的变体。在一些实施方案中,本领域技术人员可以鉴定通过导向于不认为对活性是重要的区而可以改变但是不破坏活性的分子的合适的部位。在一些实施方案中,人们可以鉴定相似多肽之间保守的分子的残基和部分。在一些实施方案中,即使对于生物活性或者对结构重要的区也可以进行保守氨基酸取代而不破坏生物活性或者不会不利地影响多肽结构。

[0033] 另外,本领域技术人员能综述结构功能研究,鉴定对于活性或结构重要的相似多肽中的残基。考虑这样一种比较,人们能预知蛋白质中氨基酸残基的重要性,相当于对相似蛋白质中对活性或结构重要的氨基酸残基。本领域技术人员对于这样预测的重要的氨基酸残基可以选择化学相似氨基酸取代作用。

[0034] 本领域技术人员还能分析与相似多肽中的结构相关的三维结构和氨基酸序列。根据这样的信息,本领域技术人员可以预测抗体三维结构的氨基酸序列比对。在一些实施方案中,本领域技术人员可以选择对预计在蛋白质表面上的氨基酸残基不进行基团变化,因为这样的残基在与其他分子的重要的相互作用中涉及。此外,本领域技术人员可以制备在各个期望的氨基酸残基处包含单一氨基酸取代作用的试验变体。然后可以应用本领域技术人员公知的活性测定来对这些变体进行筛选。这样的变体也可以被用来收集关于合适的变体的信息。例如,如果有人发现特定氨基酸残基的变化导致破坏的不期望的降低的,或者不合适的活性,则可以避免这样的变化。换句话说,以从这样的常规实验获得的信息为基础,本领域技术人员容易确定哪里应该避免进一步的取代作用,不管是单独的或者是与其他突变一起的。

[0035] 关于二级结构的预测已经出版了大量科学出版物。参见Moult J., Curr. Op. In Biotech., 7(4):422-427(1996), Chou等, Biochemistry, 13(2):222-245(1974); Chou等, Biochemistry, 113(2):211-222(1974); Chou等, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chou等, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276和Chou等, Biophys. J., 26:367-384(1979)。此外,目前可获得计算机程序辅助预测二级结构。预测二级结构的一种方法以同源性模拟为基础。例如,序列同一'I'生大于30%,或相似性大于40%的两种多肽或蛋白质经常具有相似结构拓扑学。蛋白质结构数据库(PDB)的最新增长提供对二级结构增强的可预测性,包括多肽或蛋白质结构中可能的折叠数目。参见Holm等, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)。有人提议(Brenner等, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997)),在给定多肽或蛋白质中存在有限数目的折叠,并且一旦确定临界数目的折叠,结构预测将合适地变得更精确。

[0036] 预测二级结构的另外的方法包括“穿线法”(Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87(1997); Sippl等, *Structure*, 4(1):15-19(1996)), “图形分析”(Bowie等, *Science*, 253:164170(1991); Gribskov等, *Meth. Enzym.*, 183:146-159(1990); Gribskov等, *Proc. Nat Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358(1987)), 和“进化的键”(参见Holm, 上文(1999), 和Brenner, 上文(1997))。

[0037] 术语“多肽”作为遗传术语指天然蛋白质, 或者具有天然序列的一个或多个氨基酸缺失, 添加和/或取代的序列。术语“多肽”还包括RANKL抗体或其CDR(如下所述, SEQ IDNO: 2-9和SEQ ID NO:10-17), 或它们的一个或多个氨基酸缺失, 添加和/或取代的序列。

[0038] 全长重链包括可变区结构域, VH, 和三个恒定区结构域, CH1, CH2, 和CH3。VH结构域在多肽的氨基末端, CH3结构域在羧基末端。这里使用的术语“重链”包括全长重链及其片段。

[0039] 全长轻链包括可变区结构域和恒定区结构域, 和重链一样, 轻链的可变区结构域在多肽的氨基末端。术语“轻链”, 如这里使用的, 包括全长轻链及其片段。单链抗体是Fv分子, 其中重链和轻链可变区通过柔性接头连接, 形成单链多肽, 其形成抗原-结合区。W088/01649和美国专利Nos. 4, 946, 778和5, 260, 203详细讨论单链抗体。

[0040] 在一些实施方案中, 二价抗体而不是“多特异性”或“多功能”抗体, 一般理解其每个结合位点是相同的。

[0041] 当过量抗体将与反受体结合的受体的量减少至少大约20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 或更多(根据体外竞争结合分析测定的)时, 抗体基本上抑制配体与受体的粘附。

[0042] 术语“表位”包括能与免疫球蛋白或T-细胞受体特异性结合的任何多肽决定簇。在一些实施方案中, 表位决定簇包括象氨基酸这样的分子的化学活性表面基团, 糖侧链, 磷酸基, 或磺酰基, 并且, 在一些实施方案中, 可以具有特异的三维结构特征, 和/或特异的电荷特征。表位是抗体结合的抗原的区。在一些实施方案中, 当它优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原, 就说抗体特异性结合抗原。

[0043] 本文使用的术语“试剂”指化合物, 化合物的混合物, 生物大分子, 或从生物材料制备的提取物。

[0044] 本文使用的, 术语“标记”或“标记的”指插入可检测标记物, 例如通过插入放射标记的氨基酸或连接能被标记的抗生物素蛋白(例如能被光学方法或比色法检测的含有荧光标记物或酶活性的链霉抗生物素蛋白)检测的生物素部分多肽。在一些实施方案中, 标记或标记物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域公知的并且可以使用。多肽的标记的例子包括但不限于下组: 放射性同位素或放射性核素(例如³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), 荧光标记物(例如FITC, 诺丹明, 镧系磷光剂), 酶标记(例如辣根过氧化物酶, 半乳糖苷酶, 荧光素酶, 碱性磷酸酶), 化学发光剂, 生物素基, 预先确定的第二报道分子识别的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列, 二抗的结合位点, 金属结合结构域, 表位标记)。在一些实施方案中, 标记通过各种长度的间隔臂连接以减小可能的空间位阻。

[0045] 本文使用的术语“生物样品”包括但不限于任何量的来自活物或以前是活物的物质。这样的活物包括但不限于人, 小鼠, 猴, 大鼠, 兔, 和其他动物。这样的物质包括但不限于血液, 血清, 尿液, 细胞, 组织, 器官, 骨, 骨髓, 淋巴结和皮肤。

[0046] 术语“骨质疏松疾病”包括但不限于骨质疏松,骨质稀少,佩吉特氏病,溶骨性转移灶,牙周炎,类风湿性关节炎和由于固定导致的骨损失。除了这些骨疾病之外,已知一些癌症提高破骨细胞活性并且诱导骨再吸收,例如乳腺癌,前列腺癌和多发性骨髓瘤。现在已知这些癌症产生导致骨中RANKL过量表达的因子,并且导致增加的破骨细胞数目和活性。

[0047] 术语“药剂或药物”指当适当地对患者施用能诱导期望的治疗效果的化合物或组合物。

[0048] 术语“调节剂”是改变分子的活性或功能的化合物。例如,与不存在调节剂下发现的活性或功能值相比,调节剂可以引起分子的一些活性或功能值的提高或降低。在一些实施方案中,调节剂是抑制剂,降低分子的至少一种活性或功能值。一些例示的分子的活性和功能包括但不限于结合亲和性,酶活性,和信号转导。一些例示的抑制剂包括但不限于蛋白质,肽,抗体,肽体,碳水化合物或小有有机分子,肽体描述于例如W001/83525。

[0049] 术语“基本上纯”指主体物质是占优势存在的物质(例如以摩尔为基础,它在组合物中比其他各种物质更丰富)。在一些实施方案中,基本上纯化的级分是其中主体物质包括占存在的全部大分子物质至少大约50%(摩尔比)的组合物。在一些实施方案中,基本上纯的组合物含有组合物中存在的的所有的大分子物质的大约80%,85%,90%,95%,或99%以上。在一些实施方案中,主体物质被纯化至基本上均质(通过常规检测方法不能检测到组合物中的杂质物质),其中组合物基本上由单一大分子物质组成。

[0050] 术语患者包括人和动物受试者。

[0051] 在本发明的一些实施方案中,提供了抗人RANKL的鼠源单克隆抗体。在一些实施方案中,提供了包括重链和轻链免疫球蛋白,特别是相应于可变区的序列的氨基酸序列及其编码核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了相应于互补决定区(CDR),特别是从CDR1至CDR3的序列。根据一些实施方案,也提供了表达这样的免疫球蛋白分子和单克隆抗体的杂交瘤细胞系。在一些实施方案中,本发明提供了来自于上述抗人RANKL的鼠源单克隆抗体的人源化抗体。

[0052] 术语“人源化抗体”主要指鼠源单克隆抗体以基因克隆及DNA重组技术改造,重新表达的抗体,其大部分氨基酸序列为人源序列取代,基本保留亲本鼠单克隆抗体的亲和力和特异性,又降低了其异源性,有利应用于人体。人源化抗体包括嵌合抗体、改型抗体和全人源化抗体等几类。人源化作用的基本原理为改变抗原识别,即CDR结构域,在人免疫球蛋白的环境中的特异性(“CDR移植”,Winter和Milstein)。由动物(一般是鼠)到人源化的抗体的转录必需在相反的需求之间妥协,其解决方法根据情况而改变。为了使免疫原性最小化,免疫球蛋白将保持尽可能多的可接受的人序列。在任何情况下,为了保持最初的结合特性,免疫球蛋白构架在可接受的人序列中应当包含足够数目的突变以保证CDR区的构象尽可能与供体鼠免疫球蛋白的CDR区的构象相似。具体可参照Maeda等,1991;Singer等,1993;Tempest等,1994;Kettleborough等,1991;Hsiao等,1994;Baca等,1997;Leger等,1997;Ellis等,1995;Sato等,1994;Jones等,1986;Benhar等,1994;Sha and Xiang,1994;Shearman等,1991;Rosok等,1996;Gussow&Seemann,1991;Couto等,1994;Kashmiri等,1995;Baker等,1994;Riechmann等,1988;Gorman等,1991;Verhoeyen等,1988;Foote&ffinter,1992;Lewis&Crowe,1991;Co等,1991;Co等,1991;Verhoeyen等,1991;Eigenbrot等,1994;Hamilton等,1997;Tempest等,1995;Verhoeyen等,1993;Cook等,1996;Poul等,

1995;Co等,1992;Graziano等,1995;Presta等,1993;Hakimi等,1993;Roguska等,1996;Adair等,1994;Sato等,1993;Tempest等,1991;Sato等,1996;Kolbinger等,1993;Zhu和Carter,1995;Sims等,1993;Routledge等,1991;Roguska等,1994;Queen等,1989;Carter等,1992;专利EP592106;EP1709076等

[0053] 天然存在的抗体结构

[0054] 天然存在的抗体结构单元一般包括四聚体。每一个这样的四聚体一般由两个相同的多肽链对组成,每一对具有一条全长“轻链”(在一些实施方案中,大约25kDa)和一条全长“重链”(在一些实施方案中,大约50_70kDa)。每条链的氨基末端部分一般包括大约100至110或更多氨基酸的可变区,其一般负责抗原识别。每条链的羧基末端部分一般定义负责效应物功能的恒定区。人轻链一般分类为K和 λ 轻链。重链一般分类为 μ , δ , γ , α ,或 ϵ ,抗体同种型分别定义为IgM,IgD,IgG,IgA,IgE,IgG有几个亚类,包括但不限于IgG1,IgG2,IgG3,和IgG4。IgM有几个亚类,包括但不限于IgM1和IgM2。类似地,IgA分为几个亚类,包括但不限于IgA1和IgA2。一般情况下,全长轻链和重链中,可变区和恒定区通过大约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链也包括大约10个以上氨基酸的“D”区。参见,例如,Fundamental Immunology第七章(Paul,W.编著,第二版,Raven Press,N.Y.(1989))(为所有的目的全文引作参考)。各个轻/重链对的可变区一般形成抗原结合位点。

[0055] 可变区一般具有相同的相对保守的构架区(FR)的一般结构,通过三个超可变区,也称作互补决定区或CDR区。各对两个链的CDRs一般通过构架区排列,其可以与特异性表位结合。从N-末端至C-末端,轻链和重链可变区一般包括结构域FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,和FR4。氨基酸在每个结构域的排列一般根据Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest的定义(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987,1991)),或Chothia&Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Chothia等,Nature342:878-883(1989)。

[0056] 双特异性和双功能抗体

[0057] 双特异性和双功能抗体一般是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。通过各种方法可以制备双特异性抗体,包括但不限于杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见,例如,Songsivilai&Lachmann Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990),Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553(1992)。

[0058] 本发明抗人RANKL的鼠源单克隆抗体的制备为本领域技术人员所公知的技术;其人源化抗体的DNA序列在可操作性地结合(即以这种确保其功能性的方式定位)至表达控制序列上后在宿主细胞中进行表达。这些载体一般能够在宿主生物中作为表达载体或者作为染色体DNA的整合部分进行复制。一般,所述表达载体包含可选的标记以允许鉴定已经用目标DNA序列转化的细胞。以scFv重组形式或者以Fab形式生产本发明的人源化免疫球蛋白,优选原核系统。大肠杆菌是对于克隆本发明的DNA序列特别有用的原核宿主之一。而且,现有的大量的经充分表征的启动子,例如Lac或trp操纵子或 β -内酰胺酶或 λ 噬菌体。一般,这些启动子控制表达并且具有核糖体结合位点,以便正确启动并完成转录和翻译。通过与聚乙二醇(PEG)缀合有可能提高在原核系统中生产的本发明的人源化免疫球蛋白的半衰期。其它单细胞生物,如酵母,可以用于表达。选择的宿主是酵母属(Saccharomyces),利用提供了表达控制、复制终止和起点序列的合适载体。昆虫细胞培养物也可以用来生产本发明的人

源化免疫球蛋白,一般使用以稳定方式转染的S2果蝇细胞或具有基于杆状病毒的表达系统的Spodoptera frugiperda的细胞(Putlitz等,1990)。植物和植物细胞培养物可以用于本发明的人源化免疫球蛋白的表达(Larrick&Fry,1991;Benvenuto等,1991; Durin等,1990; Hiatt等,1989)。

[0059] 根据另一实施方案,本发明的多肽的半衰期延长修饰(此修饰亦降低多肽的免疫原性)包含连接药理学上可接受的合适的聚合物,例如直链或支链聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。一般而言,可使用任何适合形式的聚乙二醇化,例如本领域中用于抗体及抗体片段(包括但不限于域抗体及scFv片段)的聚乙二醇化;参考例如:Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese及Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris及Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2 (2003); 及W02004/060965。用于使多肽聚乙二醇化的各种试剂也是市售的。优选使用(特别是通过半胱氨酸残基的)定点聚乙二醇化(参见例如Yang等人, Protein Engineering 16, 761-770 (2003))。例如,出于此目的,PEG可连接至天然存在于本发明的多肽中的半胱氨酸残基,本发明的多肽可经修饰以便适当引入一个或多个用于连接PEG的半胱氨酸残基,或包含一个或多个用于连接PEG的半胱氨酸残基的氨基酸序列可融合至本发明的多肽的N-末端和/或C-末端,以上均使用对本领域技术人员而言本身已知的蛋白工程的技术。

[0060] 根据一些实施方案,本发明的抗体可用于检测生物样品中的RANKL。在一些实施方案中,这使得可以鉴定产生蛋白质的细胞或组织。在一些实施方案中,与RANK结合并且阻断与其它结合化合物相互作用的抗体在调节破骨细胞分化和骨再吸收中具有治疗性用途。在一些实施方案中,抗RANKL抗体可以阻断RANKL结合ODAR,这可以导致信号转导级联中的阻断和NF- κ B介导的转录激活作用的丧失。应用例如荧光素酶报告分子测定测量NF- κ B介导的转录激活作用的分析是本领域技术人员公知的。

[0061] 在一些实施方案中,提供了治疗骨病的方法,包括施用治疗有效量的抗RANKL抗体。在一些实施方案中,提供了治疗骨病的方法,包括施用治疗有效量的抗RANKL抗体和另一种治疗剂。在一些这样的实施方案中,以治疗有效量施用所述另外的治疗剂。在一些实施方案中,所述骨病是特征在于骨损失的疾病,包括但不限于骨质稀少和骨质溶解。在一些实施方案中,使用抗RANKL抗体的治疗抑制骨再吸收速度。因此,在一些实施方案中,为了补偿骨形成低于正常水平,可以应用治疗来降低再吸收速度高于正常的骨再吸收速度,或者将骨再吸收降低至低于正常水平。在一些实施方案中,可以对抗体测定不存在或存在OPG下与RANKL的结合,并且检查它们抑制RANKL介导的破骨细胞生成和/或骨再吸收的能力。

[0062] 根据一些实施方案可以治疗的状况包括但不限于下组:

[0063] 骨质疏松症,包括但不限于原发性骨质疏松症,内分泌骨质疏松症(包括但不限于甲状腺功能亢进,甲状旁腺功能亢进,库欣综合征,和肢端肥大症),骨质疏松症的遗传和先天形式(包括但不限于成骨不全,高胱氨酸尿症,门克斯综合征,赖-戴综合征),和由于肢端固定的骨质疏松症;

[0064] 成年人和少年骨佩吉特氏病(畸形性骨炎);

[0065] 骨髓炎,即导致骨损失的骨感染性病变;

[0066] 高钙血症,包括但不限于实体肿瘤(包括但不限于乳房,肺和肾)和血液恶性病变(包括但不限于多发性骨髓瘤,淋巴瘤和白血病)导致的高钙血症,特发性高钙血症,和与甲

状腺功能亢进和肾功能失调相关的高钙血症；

[0067] 骨质稀少,包括但不限于手术之后的骨质稀少,施用药物诱导的骨质稀少,与小肠和大肠疾病相关的骨质稀少,和与慢性肝和肾病相关的骨质稀少；

[0068] 骨坏死,即骨细胞死亡,包括但不限于与创伤性损伤有关的骨坏死,与戈谢病有关的骨坏死,与镰状细胞贫血有关的骨坏死,与系统性红斑狼疮有关的骨坏死,与类风湿性关节炎有关的骨坏死,与牙周病有关的骨坏死,与溶骨性转移有关的骨坏死,与其它状况有关的骨坏死;和与类风湿性关节炎有关的软骨损失和关节侵蚀。

[0069] 在一些实施方案中,可以单独地或者与至少一种用于治疗骨病的另外的治疗剂一起使用抗RANKL抗体。在一些实施方案中,与治疗有效量的另外一种治疗剂结合使用抗RANKL抗体。可以与抗RANKL抗体一起施用的举例的治疗剂包括但不限于指定为BMP-1至BMP-12的骨形态发生因子,转化生长因子 β (TGF- β)和TGF- β 家族成员;白介素-1(IL-1)抑制齐U,包括但不限于IL-1ra及其衍生物和KineretTM, anakinra; TNF α 抑制剂,包括但不限于可溶性TNF α 受体, EnbrelTM, etanercept, 抗-TNF α 抗体, RemicadeTM, 英夫单抗, 和D2E7抗体; 甲状旁腺素及其类似物; 甲状旁腺素相关蛋白及其类似物; E系列前列腺素; 双磷酸盐(例如阿仑特罗和其他); 骨增强矿物例如氟化物和钙; 非甾族抗炎药物(NSAIDs), 包括但不限于COX-2抑制剂, 例如CelebrexTM, 塞来西布, 和VioxxTM, 罗非克西; 免疫抑制剂, 例如甲氨蝶呤或来氟米特, 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 包括但不限于分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(SLPI); IL-6抑制剂(包括但不限于抗IL-6抗体), IL-8抑制剂(包括但不限于抗IL-8抗体), IL-18抑制剂(包括但不限于IL-18结合蛋白和抗IL-18抗体), 白介素-1转化酶(ICE)调节剂; 成纤维细胞生长因子FGF-1至FGF-10和FGF调节剂; PAF拮抗剂; 角质形成细胞生长因子(KGF), KGF-相关分子, 和KGF调节剂; 基质金属蛋白酶(MMP)调节剂; 一氧化氮合酶(NOS)调节剂, 包括但不限于, 诱导型NOS的调节剂; 糖皮质激素受体调节剂; 谷氨酸受体调节剂; 脂多糖(LPS)水平调节剂; 和去甲肾上腺素和调节剂及其模拟物。

[0070] 在一些实施方案中, 抗RANKL抗体与特定治疗剂一起使用来治疗各种炎症状况, 自身免疫状况, 或伴随骨损失的其他试剂。在一些实施方案中, 根据状况和期望的治疗水平, 可以施用两种, 三种或更多试剂。在一些实施方案中, 通过包含在相同配方中一起提供这些试剂。在一些实施方案中, 通过包含在相同配方中一起提供这样的试剂和抗RANKL抗体。在一些实施方案中, 通过包含在治疗试剂盒中可以一起提供这样的试剂。在一些实施方案中, 通过包含在治疗试剂盒中可以一起提供这样的试剂和抗RANKL抗体。在一些实施方案中, 可以分开提供这样的试剂。在一些实施方案中, 当通过基因治疗施药时, 相同载体中可以包含编码蛋白质试剂和/或抗RANKL抗体的基因。在一些实施方案中, 编码蛋白质试剂和/或抗RANKL抗体的基因可以处于相同启动子区的控制下。在一些实施方案中, 编码蛋白质试剂和/或抗RANKL抗体的基因可以在分开的载体中。

[0071] 在一些实施方案中, 本发明涉及包括抗RANKL抗体和至少一种白介素-1(IL-1)抑制剂的治疗方案, 和应用这样的治疗方案的治疗方法。在一些实施方案中, 治疗方案包括抗RANKL抗体和IL-1抑制剂和至少一种这里描述的另外的分子。在一些实施方案中, 治疗方法与抗RANKL抗体联合使用IL-1抑制剂和/或TNF α 抑制剂。在一些实施方案中, 抗RANKL抗体与IL-1抑制剂和/或TNF α 抑制剂联合可以用于治疗哮喘, 类风湿性关节炎和多发性硬化这样的状况。

[0072] 白介素-1(IL-1)是抗炎细胞因子。在一些例子中,IL-1是很多疾病和医学状况中的介导体。在一些例子中,巨噬细胞/单细胞系细胞生产IL-1。在一些例子中,IL-1以两种形式产生=IL-1a(IL-1a)和IL-1 β (IL-1 β)。

[0073] 如果自发的或实验性疾病或医学状况与体液或组织中升高的IL-1水平有关和/或如果来自身体的细胞或组织在培养物中产生升高水平的IL-1,则认为这种疾病或医学状况是“白介素-1介导的疾病”。在一些实施方案中,通过下面另外两种状况识别这样的白介素-1介导的疾病:(1)通过施用IL-1或上调IL-1的表达能从实验上用动物模拟与疾病或医学状况相关的病理发现;和(2)通过用抑制IL-1作用的试剂治疗能抑制或消除疾病或医学状况中实验动物模型中诱导的病理。在一些实施方案中,上述状况中的一项或多项符合IL-1-介导的疾病。在一些实施方案中,所有三种状况都符合IL-1-介导的疾病。急性和慢性白介素-1(IL-1)-介导的疾病包括但不限于下组:急性胰腺炎;肌萎缩侧索硬化(ALS,或Lou Gehrig's病);阿尔茨海默病;恶病质/厌食,包括但不限于AIDS-诱导的恶病质;哮喘和其它肺病;动脉粥样硬化;自身免疫性脉管炎;慢性疲劳综合征,梭状芽孢杆菌相关疾病,包括但不限于梭状芽孢杆菌相关腹泻,冠状动脉状况和适应症,包括但不限于充血性心衰,冠状动脉再狭窄,心肌梗塞,心肌功能障碍(例如与脓毒症有关),和冠状动脉旁路移植;癌症,包括但不限于白血病,包括但不限于多发性骨髓瘤白血病和髓细胞白血病(例如AML和CML),和肿瘤转移;糖尿病(包括但不限于胰岛素依赖性糖尿病);子宫内膜异位;发热;纤维肌瘤;肾小球肾炎;移植物抗宿主疾病和/或移植物排斥;出血性休克;痛觉过敏;炎性肠病;关节炎状况,包括但不限于骨关节炎,牛皮癣关节炎,和类风湿性关节炎;炎性眼病,包括但不限于例如与角膜移植有关的那些;局部缺血,包括但不限于脑局部缺血(包括但不限于作为例如创伤,癫痫,出血或中风的结果的脑损伤,这些的每一种情况都可以导致神经变性);Kawasaki's病;学习障碍;肺病(包括但不限于急性呼吸窘迫综合症,或ARDS);多发性硬化;肌病(例如肌肉蛋白质代谢,包括但不限于脓毒症中的肌肉蛋白质代谢);神经毒性(包括但不限于HIV诱导的这样的状况);骨质疏松症;疼痛,包括但不限于与癌症相关的疼痛;帕金森氏病;牙周病;早产;牛皮癣;再灌注损伤;脓毒性休克;放射治疗副作用;颞颌关节病;睡眠障碍;葡萄膜炎;从例如由劳损,扭伤,软骨损伤,创伤,整形术,感染,或其它疾病过程引起的炎症。

[0074] 在一些实施方案中,本发明涉及包括抗RANKL抗体和至少一种TNF α 抑制剂的治疗方案,和应用该治疗方案的方法。在一些实施方案中,治疗方案包括抗RANKL抗体和TNF α 抑制剂和至少一种这里描述的另外的分子。一些疾病和医学状况是由TNF介导的并且归类为炎症状况。如这里使用的“TNF-介导的疾病”包括但不限于与体液或组织中升高水平的TNF相关的和/或其中细胞或组织取自在培养物中产生高水平TNF的个体的疾病或医学状况。在一些实施方案中,如果(1)通过施用或上调TNF表达在动物中能实验性模拟与疾病或医学状况相关的病理发现和/或(2)通过用抑制TNF作用的试剂治疗能抑制或破坏疾病或医学状况的实验动物模型中诱导的病理,则认为疾病是TNF-介导疾病。一些疾病和医学状况是TNF介导的,并且可以分类为炎症状况。如这里使用的,“TNF介导的疾病”包括但不限于:恶病质和厌食;癌症,包括但不限于,白血病;慢性疲劳综合征;冠状动脉状况和/或适应症,包括但不限于,充血性心衰,冠状再狭窄,心肌梗塞,心肌功能障碍(包括但不限于与脓毒症有关的这样的状况),和冠状动脉旁路移植;抑郁症;糖尿病,包括但不限于,青少年起病I型糖尿病,

糖尿病,和胰岛素抗性(包括但不限于与肥胖有关的胰岛素抗性);子宫内膜异位,子宫内膜炎,和相关的状况;纤维肌瘤和痛觉缺失;移植物抗宿主排斥;痛觉过敏;炎性肠病,包括但不限于克隆氏病和艰难梭菌-相关腹泻;局部缺血,包括但不限于,作为创伤,癫痫,出血,和/或中风结果的脑损伤;肺病,包括但不限于成人呼吸窘迫综合征,哮喘,肺纤维化;多发性硬化;神经炎性疾病;眼部疾病和状况,包括但不限于角膜移植,眼退化和葡萄膜炎;疼痛,包括但不限于,与癌相关的疼痛;胰腺炎,牙周病;毛发红糠疹(PRP);前列腺炎,包括细菌性和非细菌性前列腺炎,和相关状况;牛皮癣和相关状况;肺纤维化;再灌注损伤;风湿病,包括但不限于类风湿性关节炎,骨关节炎,青少年关节炎(包括但不限于青少年类风湿性关节炎),血清反应阴性多关节炎,强直性脊柱炎,Reiter's综合征和反应性关节炎,Still's病,牛皮癣关节炎,肠病关节炎,多肌炎,皮炎,硬皮病,系统性硬化,脉管炎(例如Kawasaki's病),脑脉管炎,赖姆病,葡萄球菌诱导("脓毒性")的关节炎,斯耶格伦综合征,风湿热,多软骨炎 和风湿性多肌病和巨细胞动脉炎);脓毒性休克;放疗副作用;系统性红斑狼疮(SLE);颞颌关节病;甲状腺炎;和组织移植和/或例如由劳损,扭伤,软骨损伤,创伤,整形术,感染(例如HIV,艰难梭菌和相关物种)或其他疾病过程引起的炎症。

[0075] 在一些实施方案中,TNF抑制剂通过下调或抑制TNF产生,结合游离TNF,干扰TNF与其受体结合,和干扰与其受体结合之后TNF信号传递调节中的至少一种而发挥作用。术语“TNF抑制剂”包括但不限于可溶性TNF受体,包括但不限于,可溶性肿瘤坏死因子受体I型(sTNF-RI;也称作p55受体),可溶性肿瘤坏死因子受体II型(也称作p75受体),和Enbre1™, etanercept;抗TNF抗体,包括但不限于,Remicade™,英夫单抗和D2E7(参见,例如美国专利NO.6090382和6258562);抗TNF受体抗体;sTNF-RI(参见,例如,W098/24463),Etanercept(Enbre1™);TNF- α 转化酶(TACE)的抑制剂;和影响TNF活性的其他分子。

[0076] 在一些实施方案中,抗RANKL抗体可以与至少一种用于炎症的治疗剂一起施用。在一些实施方案中,抗RANKL抗体可以与至少一种用于免疫疾病的治疗剂一起施用。用于炎症和免疫疾病的举例的治疗剂包括但不限于皮质类固醇,包括但不限于,泼尼松龙;非留族抗炎药物(NSAIDs),包括但不限于,环加氧酶I型(COX-1)和环加氧酶2型(COX-2)抑制剂;疾病修饰抗风湿药物(DMARDs),包括但不限于,甲氨蝶呤,羟基氯奎,氯奎,环孢菌素,金化合物(例如醋硫葡金,金硫丁二酸盐,和葡糖硫金),来氟米特;IV型磷酸二酯酶抑制剂,包括但不限于,环戊苯吡酮和己酮可可碱;他克莫司(FK-506);西罗莫司(瑞帕霉素);霉酚酸;5-脂氧化酶抑制剂,包括但不限于,弃白通;白介素-6(IL-6)调节剂;38kDa促细胞分裂剂激活蛋白激酶的小分子调节剂(P38-MAPK);炎症途径中涉及的胞内分子的小分子调节剂,其中这样的胞内分子包括但不限于,jnk,IKK,NF-K β ,ZAP70,和I κ B。用于炎症的一些举例的治疗剂描述于,例如,C.A.Dinarello和L.L.Moldawer Proinflammatory and Ant-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis:A Primer for Clinicians第三版(2001)Amgen Inc.Thousand Oaks,CA。用于炎症和自身免疫疾病的举例的治疗剂,包括但不限于,干扰素- γ (IFN- γ)调节剂;OX40/OX40L的调节剂(包括可溶形式的OX40);4-1BB/4-1BB配体的调节剂(包括可溶形式的4-1BB);和B细胞-T细胞共同刺激途径的调节剂等;

[0077] 在一些实施方案中,抗RANKL抗体被用来治疗骨损失,包括但不限于,恶性或转移肿瘤引起的骨的溶骨性破坏产生的骨损失。在一些实施方案中,抗RANKL抗体可以被用来治疗与癌症相关的骨损失。举例的癌症包括但不限于乳房癌,前列腺癌,甲状腺癌,肾癌,肺

癌,食道癌,直肠癌,膀胱癌,子宫颈癌,卵巢癌和肝癌,以及胃肠道癌。在一些实施方案中,抗RANKL抗体可以被用来治疗与一些血液恶病变相关的骨损失,包括但不限于,多发性骨髓瘤和淋巴瘤,包括何杰金氏病。

[0078] 在一些实施方案中,单独施用抗RANKL抗体。在一些实施方案中,抗RANKL抗体与至少一种其他治疗剂一起施用,包括但不限于,至少一种其他癌症治疗剂。举例的癌症治疗剂包括但不限于放疗和化疗。在一些实施方案中,化疗可以包括用一种或几种下面的药物治疗:蒽环霉素,紫杉醇,他莫西芬,阿霉素,5-氟尿嘧啶,和本领域公知的其他药物。在一些实施方案中,癌症治疗剂是黄体激素释放激素(LHRH)拮抗剂。

[0079] 药物组合物

[0080] 在一些实施方案中,本发明提供含有治疗有效量的抗RANKL抗体和药学可接受稀释剂,载体,增溶剂,乳化剂,防腐剂和/或佐剂的药物组合物。

[0081] 在一些实施方案中,本发明提供含有治疗有效量的抗RANKL抗体和治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,和药学可接受稀释剂,载体,增溶剂,乳化剂,防腐剂和/或佐剂的药物组合物。在一些实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂选自:骨形态发生因子,转化生长因子- β (TGF- β),白介素-1(IL-1)抑制剂,包括但不限于IL-1ra及其衍生物和Kineret[™],anakinra;TNF α 抑制剂,包括但不限于可溶性TNF α 受体,Enbrel[™],etanercept,抗-TNF α 抗体,Remicade[™],英夫单抗,和D2E7抗体;甲状旁腺素及其类似物;甲状旁腺素相关蛋白及其类似物;E系列前列腺素;双磷酸盐(例如阿仑特罗和其他);骨增强矿物例如氟化物和钙;非留族抗炎药物(NSAIDs),包括但不限于COX-2抑制剂,例如Celebrex[™],塞来西布和Vioxx[™],罗非克西;免疫抑制剂,例如甲氨蝶呤或来氟米特,丝氨酸蛋白酶抑制剂,包括但不限于分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(SLPI);IL-6抑制剂(包括但不限于抗IL-6抗体),IL-8抑制剂(包括但不限于抗IL-8抗体),IL-18抑制剂(包括但不限于IL-18结合蛋白和抗IL-18抗体),白介素-1转化酶(ICE)调节剂;成纤维细胞生长因子FGF-1至FGF-10和FGF调节剂;PAF拮抗剂;角质形成细胞生长因子(KGF),KGF-相关分子,和KGF调节剂;基质金属蛋白酶(MMP)调节剂;一氧化氮合酶(NOS)调节剂,包括但不限于,诱导型NOS的调节剂;糖皮质激素受体调节剂;谷氨酸受体调节剂;脂多糖(LPS)水平调节剂;和去甲肾上腺素和调节剂及其模拟物。

[0082] 在一些实施方案中,可接受的配方材料优选是使用的剂量和浓度对接受者没有毒性。在一些实施方案中,所述药物组合物可以含有用于改变,保持或保留例如pH,渗透压,粘度,澄清度,颜色,等张性,气味,无菌,稳定性,溶解或释放速度,组合物的吸收或渗透的配方材料。在一些实施方案中,合适的配方材料包括但不限于,氨基酸(例如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(例如抗坏血酸,亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲液(例如硼酸盐,碳酸氢盐,Tris-HCl,柠檬酸盐,磷酸盐或其他有机酸);填充剂(例如甘露糖醇或甘氨酸);螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(例如咖啡因,聚乙烯吡咯烷酮,环糊精或羟丙基环糊精);填料;单糖;二糖;和其他碳水化合物(例如葡萄糖,甘露糖或糊精);蛋白质(例如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白);着色剂,矫味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(例如钠);防腐剂和/或防腐剂(例如苯扎氯铵,苯甲酸,水杨酸,硫汞撒,苯乙醇,羟苯甲酸甲酯,羟苯甲酸丙酯,氯己定,山梨酸或过氧化氢);溶剂(例如甘油,丙二醇或聚乙二醇);糖醇(例如甘露糖醇或山梨

糖醇);悬浮剂;表面活性剂或湿润剂(例如普流罗尼、PEG、脱水山梨糖醇酯, polysorbates, 如 polysorbate 20, polysorbate 80, 卵磷脂, 胆甾醇, 四丁酚醛), 稳定增强剂(例如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(例如碱金属卤化物, 优选氯化钠或氯化钾, 甘露糖醇, 山梨糖醇);递送赋形剂;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂(Remington's Pharmaceutical Science, 18版, A.R.Gennaro编著, Mack Publish Company(1990))。

[0083] 在一些实施方案中, 抗RANKL抗体和/或治疗分子与本领域公知的半衰期延长赋形剂连接。这样的赋形剂包括但不限于聚乙二醇和葡聚糖。这样的赋形剂描述于, 例如, 美国申请登记号N0.09/428082和公开的PCT申请N0.W099/25044, 这里为了任何目的引作参考。

[0084] 在一些实施方案中, 本领域技术人员根据, 例如, 想要的给药途径, 递送方式和期望的剂量, 来确定优化的药物组合物。例如, 参见Remington's Pharmaceutical Science, 18版, A.R.Gennaro编著, Mack Publish Company(1990)。在一些实施方案中, 这样的组合物可以影响本发明的抗体的物理状态, 稳定性, 体内释放速度和体内清除速度。

[0085] 在一些实施方案中, 药物组合物中的主要赋形剂或载体性质上可以是含水或不含水的。例如, 在一些实施方案中, 合适的赋形剂或载体可以是注射用水, 生理盐水或人工脑脊液, 可能补充有肠胃外施用组合物中常用的其他材料。在一些实施方案中, 中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是其他举例的赋形剂。在一些实施方案中, 药物组合物含有大约pH7.0-8.5的Tris缓冲液, 或大约pH4.0-5.5的乙酸盐缓冲液, 其可以进一步含有山梨糖醇或其合适的取代物。在一些实施方案中, 含有抗RANKL抗体, 有或没有至少一种另外的治疗剂的组合物, 可以通过将具有期望程度纯度的选择的组合物与任选的配方试剂混合来制备。此外, 在一些实施方案中, 使用合适的赋形剂例如蔗糖, 可以将含有抗RANKL抗体, 有或没有至少一种另外的治疗剂的组合物配制成冻干物。

[0086] 在一些实施方案中, 可以选择本发明的药物组合物用于肠胃外给药。在一些实施方案中, 可以选择药物组合物用于吸入或者通过消化道例如口服递送。这样的药学可接受组合物的制备是本领域公知的。

[0087] 在一些实施方案中, 当涉及肠胃外给药时, 治疗组合物可以是药学可接受赋形剂中无热原的, 肠胃外可接受的, 含有期望的抗RANKL抗体, 有或没有另外的治疗剂的水溶液形式。在一些实施方案中, 用于肠胃外注射的赋形剂是无菌蒸馏水, 其中将有或没有至少一种另外的治疗剂的抗RANKL抗体配制成无菌等张溶液, 适当保存。在一些实施方案中, 制备涉及配制期望的分子和试剂, 例如可注射微球, 可生物降解的颗粒, 聚合化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸), 珠或脂质体, 它可以提供产品的可控或持续释放, 然后通过延效型注射递送。在一些实施方案中, 也可以使用透明质酸, 有在循环中促进保持的作用。在一些实施方案中, 可以使用可植入的药物递送装置引入期望的分子。

[0088] 在一些实施方案中, 药物组合物可以配制成用于吸入的制剂。在一些实施方案中, 可以将有或没有至少一种另外的治疗剂的抗RANKL抗体配制成用于吸入的干燥粉末。在一些实施方案中, 也可以用用于气溶胶递送的推进剂配制含有有或没有至少一种另外的治疗剂的抗RANKL抗体的吸入用溶液。在一些实施方案中, 溶液可以喷雾。肺部给药进一步描述于PCT申请N0.PCT/US94/001875, 它描述了化学修饰蛋白质的肺部递送。

[0089] 在一些实施方案中, 涉及可以口服给药的制剂。在一些实施方案中, 可以用固体剂型例如片剂和胶囊的复合中常规使用的那些载体或者不用那些载体, 可以配制以这种方式

给药的有或没有至少一种另外的治疗剂的抗RANKL抗体。在一些实施方案中,可以设计当生物利用率最大并且预先全身性降解最小的消化道中的点释放制剂的活性部分的胶囊。在一些实施方案中,可以含有至少一种另外的试剂以有利于抗RANKL抗体和/或任何另外的治疗剂的吸收。在一些实施方案中,还可以使用稀释剂,矫味剂,低熔点蜡,植物油,润滑剂,悬浮剂,片剂,崩解剂和粘合剂。

[0090] 在一些实施方案中,药物组合物在适合片剂制备的无毒性赋形剂混合物中可以含有有效量的抗RANKL抗体,有或没有至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中,通过将片剂溶解于无菌水中,或其他合适的赋形剂中,可以制备单剂型的溶液。在一些实施方案中,合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,例如碳酸钙,碳酸钠或碳酸氢钠,乳糖,或磷酸钙;或粘合剂,例如淀粉,明胶,或阿拉伯胶;或润滑剂,例如硬脂酸镁,硬脂酸或滑石。

[0091] 另外的药物组合物对于本领域技术人员是明显的,包括涉及持续或控制释放送递配方中含有抗RANKL抗体,有或没有至少一种另外的治疗剂的制剂。在一些实施方案中,各种各样的其他持续或控制释放送递方式的配制技术,例如脂质体载体,可生物降解微颗粒或多孔珠和延效型注射剂,是本领域技术人员公知的。参见例如,PCT申请N0.PCT/US93/00829,它描述了用于送递药物组合物的多孔聚合物微颗粒的控制释放。在一些实施方案中,持续释放制剂可以含有有形产物形式的半渗透性聚合物基质,例如膜,或微胶囊。持续释放的基质可以包括聚酯,水凝胶,聚交酯(US3773919和EP058481),L-谷氨酸和Y-乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman等,Biopolymers,22:547-556(1983)),聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277(1981)和Langer,Chem.Tech.,12:98-105(1982)),乙酸亚乙基乙烯酯(Langer等,上文)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP133988)。在一些实施方案中,持续释放的组合物还可以包括脂质体,它可以通过本领域公知的几种方法制备。参见,例如Eppstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688-3692(1985);EP036676;EP088046和EP143949。

[0092] 一般体内施用的药物组合物是无菌的。在一些实施方案中,可以通过经无菌过滤膜过滤来实现。在一些实施方案中,在组合物被冻干的情况下,可以在冻干和重新配置之前或之后利用该方法灭菌。在一些实施方案中,肠胃外给药的组合物可以以冻干形式或溶液贮存。在一些实施方案中,一般将肠胃外组合物放到有灭菌出口的容器中,例如有皮下注射针头可穿孔的盖的静脉输液液袋或小瓶。

[0093] 在一些实施方案中,一旦配制了药物组合物,它可以作为溶液,混悬液,凝胶,乳状液,固体保存在无菌小瓶中,或者作为脱水或冻干的粉末剂保存在无菌小瓶中。在一些实施方案中,这样的制剂可以以即用形式或者以给药之前重新配制的形式(例如冻干的)贮存。

[0094] 在一些实施方案中,本发明涉及制备单剂量给药单位的试剂盒。在一些实施方案中,每个试剂盒可以包括盛有干燥蛋白质的第一容器和盛有含水配方的第二容器。在本发明的一些实施方案中,包括包含单腔或多腔预填充注射器(例如液体注射器和溶解注射器)的试剂盒。

[0095] 在一些实施方案中,治疗上要使用的含有有或没有至少一种另外的治疗剂的抗RANKL抗体的药物组合物的有效量取决于,例如,治疗内容和主体。本领域技术人员明白根据一些实施方案,治疗的适当剂量水平因此部分地根据送递的分子,使用有或没有至少一种另外的治疗剂的抗RANKL抗体的适应症,给药途径,和患者尺寸(体重,体表面积或器官大

小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而不同。在一些实施方案中,医师可以调整剂量和改变给药途径,以获得最佳治疗效果。在一些实施方案中,根据上面提到的因素,一般剂量范围可以是大约0.1微克/千克至最多大约100毫克/千克或更多。在一些实施方案中,剂量可以是0.1微克/千克至最多大约100毫克/千克;或者1微克/千克至最多大约100毫克/千克;或者5微克/千克至最多大约100毫克/千克。

[0096] 在一些实施方案中,给药频率要考虑使用的制剂中抗RANKL抗体和/或任何另外的治疗剂的药物动力学参数。在一些实施方案中,医师施用组合物,直到达到实现期望的效果的剂量。在一些实施方案中,因此可以以单一剂量,或随时间作为两个或多个剂量给药(其可以含有或不含有相同量的期望的分子),或者作为通过植入装置或导管连续输注来施用本发明药物组合物。本领域技术人员按常规确定精确的合适的剂量,并且这是平常他们完成的常规任务。在一些实施方案中,通过应用合适的剂量反应数据可以确定合适的剂量。

[0097] 一些实施方案中,药物组合物的给药途径是公知的方法,例如,口服,静脉内注射,腹膜内,脑内(实质内),脑室内,肌内,眼内,动脉内,肝门内,或病变内途径;通过持续释放系统或者通过植入装置。在一些实施方案中,可以通过浓注或连续输液或者通过植入装置施用组合物。

[0098] 在一些实施方案中,通过植入其上吸附期望的分子或者将期望的分子制成胶囊的膜,海绵状物或者其他合适的材料可以局部施用组合物。在一些实施方案中,施用植入装置的情况下,可以将装置植入任何合适的组织或器官,期望的分子的送递可以通过扩散,随时间释放药团,或连续给药。

[0099] 在一些实施方案中,期望以离体的方式使用含有抗RANKL抗体,有或没有至少一种另外的治疗剂的药物组合物。在这样的情况下,取自患者的细胞,组织和/或器官接触含有抗RANKL抗体,有或没有至少一种另外的治疗剂的药物组合物,然后接着将这些细胞,组织和/或器官植回患者。

[0100] 在一些实施方案中,通过使用这里描述的方法植入经基因工程处理的细胞来表达和分泌多肽,能送递抗RANKL抗体和/或任何另外的治疗剂。在一些实施方案中,这样的细胞可以是动物细胞或人细胞,并且可以是自体的,异源的,或异种的。在一些实施方案中,细胞可以无限繁殖。在一些实施方案中,为了减少免疫应答机会,可以将细胞制成胶囊以避免周围组织浸润。在一些实施方案中,胶囊材料一般是生物相容的半渗透性聚合物外壳或膜,它使得蛋白质产物释放,但是阻止患者免疫系统或者来自周围组织的其它有害因子破坏细胞。

[0101] 以下结合具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0102] 实施例1、human RANKL的制备

[0103] 通过构建human RANKL表达载体,稳定转染CHO细胞,筛选能够稳定高表达human RANKL的细胞株。大规模培养该细胞株,收集细胞上清,通过镍柱纯化制备human RANKL蛋白,用于实施例2、3、4、5、6和7中小鼠免疫、克隆筛选及功能鉴定。

[0104] CHO细胞购自Invitrogen公司,RAW264.7细胞购自上海中科院细胞库,表达载体为本公司提供,T4DNA连接酶、蛋白分子量标准Marker、限制性内切酶等购自NEB公司;胶回收试剂盒购自Invitrogen;302培养基、胰蛋白酶和FBS购自Invitrogen公司;Phenyl sepharose6FF-low sub,SP-Sepharose FF,Ni-NTA Sepharose FF凝胶购自GE公司;磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,氯化钠,Tris,柠檬酸,柠檬酸三钠,咪唑和MTX购自Sigma公司,羊抗人IgG-HRP购自Jackson,TMB Substrate,购自Cell Signaling公司,RANK-Fc,TRANC,M-CSF和TGF- β 购自R&D公司,TRAP显色系统购自Sigma公司,DMEM培养基、 α -MEM培养基和胎牛血清购自Invitrogen公司。

[0105] PCR仪(杭州朗基科学仪器生物有限公司),摇床CLIMO-SHAKER1SFS-X(瑞士科耐Kuhner公司)。多功能酶标仪为Molecular Devices SpectraMax M5Multi-mode Microplate Reader洗板机为TECAN HydroFlex Plate Washer,超净工作台品牌为苏净,规格型号SW-CJ-2F/T,二氧化碳培养箱的品牌为Thermo,规格型号Forma311。

[0106] (1)human RANKL表达载体的构建

[0107] 首先通过基因工程手段合成human RANKL目标序列(图1),序列从自然人RANKL的136位Gly开始,到317位Asp共182个氨基酸(SEQ ID NO:1),在N端增加10个His,可以与镍柱中的氯化镍结合,从而可以通过离子亲和层析进行纯化,并在两端增加NotI和PmeI两个酶切位点。将合成的human RANKL和表达载体均通过NotI和PmeI进行双酶切,回收human RANKL目的片段和表达载体片段,进行连接,转化,通过PCR和酶切方法鉴定阳性克隆,最后通过测序验证表达载体的正确性。采用质粒提取试剂盒抽提质粒用于稳定转染。图1为构建的human RANKL的核苷酸序列,对应的氨基酸序列。(2)稳定转染CHO细胞及克隆筛选

[0108] 转染前48小时,在302无血清培养基中传代培养CHO细胞,接种密度为 3×10^5 /ml。转染当天细胞总数应大于 1.5×10^7 ,细胞活力在95%以上。采用Bio-rad的电转仪进行转化,转染电压为300V,电容为900 μ F。细胞每2~3天需传代一次,更换新鲜的培养基继续培养,直至细胞生长恢复正常。当细胞活力在90%以上,进行MTX加压筛选。MTX的浓度按照25nM,50nM,100nM,250nM,500nM逐步增加。MTX压力达到500nM时开始按照有限稀释法分板,待克隆长出后进行Dot-blot检测,取5 μ l 96孔板细胞上清,点至硝酸纤维素膜上,风干后加入5%脱脂奶粉中室温封闭30分钟,加入1:1000稀释的RANK-Fc,室温震荡孵育1小时,TBST中洗涤3次,每次5分钟,加入1:10000稀释的HRP标记的羊抗人IgG-Fc(购自Sigma公司)中室温震荡孵育1小时,采用DAB显色系统进行显色。筛选表达水平较高的克隆,共有120个克隆进行首次筛选,选择表达水平最高的一个克隆再次进行亚克隆,从而保证获得的表达human RANKL的克隆为单克隆。

[0109] (3)human RANKL的纯化

[0110] 收集大规模培养的细胞上清,离心后采用镍柱进行纯化,镍柱中的氯化镍能够跟His结合,也能够与咪唑进行结合。首先将样品按一定流速流过镍柱,使得样品中的human RANKL与镍柱结合,然后加入不同浓度的咪唑,与human RANKL竞争结合镍柱,从而将human RANKL洗脱下来。取2ml Ni²⁺Sepharose6FF填装层析柱,Binding buffer(20mM PB+0.15M NaCl,pH7.4)洗10~20个柱体积。细胞上清液按照30ml/h的流速上样,用Binding buffer洗涤10~20个柱体积后,10mM咪唑洗去杂蛋白,70mM,100mM和500mM咪唑分别洗脱,收集洗脱液,human RANKL的主要洗脱峰出现在70mM咪唑的洗脱条件。纯化蛋白的还原电泳结果,经

纯化获得的human RANKL蛋白其分子量约为34kDa,与理论分子量一致,纯度大于90%。

[0111] (4)human RANKL的鉴定

[0112] 包被human RANKL和市售hRANKL标准品,样品稀释至1 μ g/ml,100 μ l/孔加入,4度孵育过夜。加入从10 μ g/ml开始梯度稀释的RANK-Fc,室温孵育1小时,加入1:20000稀释的二抗(羊抗人IgG-Fc),室温孵育1小时,采用TMB显色系统进行显色。在多功能酶标仪上以测定波长450nm,参比波长630nm测定96孔板中各孔的吸光值,每孔吸光值(OD) = OD_{450nm} - OD_{630nm}。鉴定human RANKL与RANK-Fc的结合活性。human RANKL与RANK-Fc的结合活性,包被于ELISA板上的重组human RANKL与其受体RANK-Fc结合,其结合具有RANK-Fc浓度依赖性并可达到饱和,达到50%最大结合的RANK-Fc浓度为10.9ng/ml,其结合与R&D公司市售RANKL标准品一致,后者达到50%最大结合的RANK-Fc浓度为5.6ng/ml。

[0113] RAW264.7细胞使用DMEM+10%FBS的培养基进行培养,每3-4天传代一次。进行样品活性检测时,将对数生长期的细胞培养基更换为 α -MEM培养基+10%FBS,制成细胞悬液。以2000cell/100 μ l接种96孔板,放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养1小时。加入从800ng/ml开始对倍稀释human RANKL,从200ng/ml开始对倍稀释的市售hRANKL标准品和固定浓度的M-CSF和TGF β 。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养5天,弃细胞上清,每孔加入100 μ l细胞裂解液(Citrate Buffer pH5.0+0.5%Triton X-100),4 $^{\circ}$ C冰箱中裂解10min,每孔加入100 μ l pNPP显色液,37 $^{\circ}$ C孵育30min,再每孔加入50 μ l终止液(0.5M NaOH),450/570nm读数。鉴定human RANKL诱导RAW264.7细胞分化的活性。human RANKL诱导RAW264.7细胞分化为破骨细胞的结果,重组human RANKL能够诱导 RAW264.7细胞分化为破骨细胞,具有明显的剂量依赖性,其细胞活性与R&D的产品相似,重组human RANKL的EC₅₀为113.4ng/ml,市售hRANKL标准品的EC₅₀略小一些,为35.7ng/ml。

[0114] 本实施例表明,重组且经纯化的humanRANKL,不仅保持了与相应受体RANK-Fc的结合能力,且能通过受体激动破骨细胞的分化,具有其生物学活性。重组humanRANKL作为抗原用于本申请所描述的免疫程序,并且用来作为ELISA法筛选阳性克隆的包被蛋白和抗体免疫学和细胞学功能鉴定的材料。

[0115] 实施例2、小鼠免疫和滴度测定

[0116] 免疫用抗原(重组human RANKL)来自实施例1,BALB/c小鼠购自北京通利华实验动物技术有限公司。抗RANKL的单克隆抗体通过多次免疫BALB/c小鼠获得。免疫途径为足底注射,免疫剂量为10 μ g/50 μ l/只小鼠,每只足底25 μ l。共免疫了10只小鼠。

[0117] 首次免疫将10 μ g human RANKL与等体积的TiterMax Gold[®](Sigma,Oakville,ON)混合,随后的10多次免疫将10 μ g human RANKL与等体积的100 μ g明矾(Sigma,Oakville,ON)和10 μ l无热源的含CpG的D-PBS混合,不含佐剂。BALB/c小鼠的免疫分别发生在第0,5,10,15,20,25,30,35,40and44天,第44天取四只最高血清滴度的小鼠进行融合。

[0118] 10只小鼠分别在第五次(第20天)免疫和第九次(第40天)免疫后,眼球采血,通过ELISA的方法测定免疫小鼠血清中抗RANKL抗体的滴度。首先,human RANKL用包被缓冲液稀释(0.1M包被缓冲液,pH9.6NaHCO₃38.4g/L)至1 μ g/ml,100 μ l/孔包被于96孔ELISA板(Corning,Acton,MA),4度过夜。次日,用1 x PBST(0.05%Tween20 in1x PBS)洗板3次,200 μ l/孔加入封闭液(0.5%BSA,0.1%Tween20,0.01%Thimerosal in1x PBS)室温封闭1小时。洗板3次,小鼠血清用0.5%BSA/PBS从1:100开始3倍稀释,空白孔为0.5%BSA/PBS,

100 μ l/孔加入ELISA板中,室温孵育2小时,洗板3次,加入终浓度为1 μ g/ml的羊抗鼠IgG Fc-HRP,室温孵育1小时。洗板3次,加入TMB(BioFxBSTP-0100-01)显色液室温显色10-20分钟,加入终止液,于450nm读数。OD值大于空白孔的2倍定义为阳性克隆,血清在最高稀释倍数时,OD值越高,表明对human RANKL的免疫反应性越强。血清滴度检测数据如表1所示。第五次免疫后,小鼠血清滴度范围除了4#和8#为1:62500,其余小鼠均达到1:312500。第九次免疫后,小鼠血清滴度范围除了1#和4#为1:312500,其余小鼠血清滴度均达到了1:1562500。

[0119] 表1

小鼠编号	第一次血清滴度测定 免疫5次	第二次血清滴度测定 免疫9次
#1	1:312500	1:312500
#2	1:312500	1:1562500
#3	1:312500	1:1562500
#4	1:62500	1:312500
#5	1:312500	1:1562500
#6	1:312500	1:1562500
#7	1:312500	1:1562500
#8	1:62500	1:1562500
#9	1:312500	1:1562500
#10	1:312500	1:1562500
阴性对照(免疫前)	<100	<100

[0121] 实施例3、抗human RANKL鼠单克隆的产生

[0122] 免疫小鼠用CO₂安乐死,然后颈椎脱臼,分离获得淋巴结,合并不同小鼠来源的淋巴结。放入DMEM培养基中进行研磨,收集上清,离心获得淋巴细胞,并采用血球计数板计数。

[0123] 将上述获得的B细胞洗涤,与非分泌性骨髓瘤细胞P3X63Ag8.653(ATCC,Cat#CRL1580)按1:1进行混合,细胞混合液于800g离心,轻轻地去掉上清,加入2-4ml链酶蛋白酶溶液(CalBiochem,cat.#53702;0.5mg/ml in PBS),作用不超过2分钟,加入3-5ml胎牛血清终止酶反应,加入细胞电融合液ECFS(0.3M Sucrose,Sigma,Cat#S7903,0.1mM Magnesium Acetate,Sigma,Cat#M2545,0.1mM Calcium Acetate,Sigma,Cat#C4705)调整体积为40ml,离心,去掉上清,重新将细胞悬于40ml ECFS中,洗涤一次,加入ECFS,调整细胞密度为2 \times 10⁶个/ml.采用电融合仪(ECM2001,BTX,Harvard Apparatus,Holliston,MA进行融合)。融合室选择2.0ml,参数设置为:

[0124] Alignment condition:voltage:50V,time:50s

[0125] Membrane breaking at:voltage:3000V,time:30usec

[0126] Post-fusion holding time:3sec

[0127] 电融合完成后,轻轻地取出细胞上清,转入无菌的含等体积杂交瘤培养基(DMEM(JRH Biosciences),15%FBS(Hyclone),supplemented with L-glutamine,pen/strep,OPI(oxaloacetate,pyruvate,bovine insulin)(all from Sigma)and IL-6(Boehringer Mannheim))的离心管中,于37度孵育15-30分钟,然后400g(1000rpm)离心5分钟,轻轻地将细胞重悬于少量的杂交瘤筛选培养基(Hybridoma Culture Medium supplemented

with 0.5x HA(Sigma, cat.#A9666)), 中调整细胞密度, 轻柔混匀, 每块96孔细胞培养板接种 5×10^6 个B细胞, 200 μ l/孔。在第7或10天去掉一半的培养上清, 每孔再加入100 μ l筛选培养基。

[0128] 细胞培养14天后, 用ELISA法测定杂交瘤上清中特异性结合RANKL的抗体筛选阳性杂交瘤。human RANKL用包被缓冲液(0.1M Carbonate Buffer, pH9.6, NaHCO₃ 8.4g/L)稀释至1 μ g/ml, 50 μ l/孔进行包被, 4度过夜, 次日, 用洗板液(0.05% Tween20 in PBS)洗涤3次, 200 μ l/孔加入封闭液(0.5% BSA, 0.1% Tween20, 0.01% Thimerosal in PBS)室温封闭1小时, 洗板3次, 每孔加入50 μ l杂交瘤细胞上清, 或者阳性和阴性对照(阳性对照为human RANKL免疫的小鼠血清, 阴性对照为免疫前的BALB/c小鼠血清), 室温孵育2小时, 洗板3次, 每孔加入1:2000稀释的羊抗鼠IgG-HRP(Jackson Lab, Cat.No:115-035-062)室温孵育1小时, 洗板3次, 每孔加入100 μ l TMB显色液(BioFX Lab, Cat.No.TMSK-0100-01)室温显色10分钟, 每孔加入50 μ l终止液, 于450nm读数。结果, 经过第一轮初筛, 共190块96孔细胞培养板, 筛选到435个能够与human RANKL结合的阳性克隆(OD值大于0.5)。

[0129] 初筛ELISA检测结果呈RANKL抗体阳性者, 去掉阳性克隆的培养基, 加入新鲜的杂交瘤培养基, 将克隆转至24孔板培养, 2天后, 对24孔板克隆进行第二轮ELISA筛选验证实验, 包括同上的直接ELISA检测, 竞争抑制实验和与mouse RANKL的免疫交叉反应。其中, mouse RANKL的免疫交叉反应将包被蛋白更换为mouse RANKL, 包被浓度为1 μ g/ml, 检测样品为原倍的细胞上清, 一个浓度点, 其余实验条件与初筛ELISA实验方法一致。结果显示有9个克隆与mouse RANKL具有免疫交叉反应。竞争抑制实验为单点测试, RANK-Fc用包被液稀释至1 μ g/ml进行包被, 4度过夜。原倍的细胞上清与等体积的浓度为600ng/ml的human RANKL混合, 加入ELISA板中, 室温孵育2小时, 洗板3次, 加入1:10000稀释的兔抗人His-HRP(购自Abcam公司)抗体, 室温孵育1小时, 洗板4次, 采用TMB显色系统进行显色。室温显色15分钟, 加入1M H₂SO₄终止显色。在多功能酶标仪(Molecular Devices SpectraMax M5 Multi-mode Microplate Reader)上以测定波长450nm, 参比波长630nm测定96孔板中各孔的吸光值, 每孔吸光值(OD)=OD_{450nm}-OD_{630nm}。筛选出具有竞争活性的克隆, 将其细胞上清再做3倍梯度稀释重复实验, 选择竞争活性相对较强的克隆再进行一轮亚克隆, 扩增、冻存细胞株, 并纯化细胞上清获得一定量的抗体用于功能鉴定。

[0130] 第二轮ELISA结果显示: 有249个克隆OD值大于0.5, 有41个克隆具有抑制human RANKL与RANK-Fc结合的活性, 有9个克隆具有与鼠RANKL的免疫交叉反应。将上述50个克隆进行亚克隆, 冻存细胞株, 并纯化细胞上清用于实施例4、5、6和7的功能鉴定。

[0131] 实施例4、纯化的鼠单抗与human RANKL的免疫反应性

[0132] 上述41个具有中和活性的克隆和9个与鼠有交叉反应的克隆进行扩增培养, 在T125方瓶中加入100ml杂交瘤培养基, 于37度, 5% CO₂培养箱中培养10天左右, 收集上清, 采用ProteinA进行抗体纯化, 用pH=3.0的柠檬酸缓冲液进行洗脱, 收集样品, 调pH至6.0左右。A280进行抗体浓度测定。每个抗体均得到mg级的蛋白。采用直接ELISA法检测上述50个抗human RANKL鼠单抗与免疫原human RANKL的结合能力。用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液将Human RANKL蛋白稀释至1 μ g/ml, 100 μ l每孔加入到96孔ELISA板中, 4 $^{\circ}$ C放置过夜。PBST洗板3次, 用PBST+2% BSA封闭1小时, 之后用PBST洗板3次。分别将待测抗体用PBST从10 μ g/ml起进行10倍系列稀释至 1×10^5 μ g/ml, 每孔100 μ l加入ELISA板中, 样品做双复孔, 每块96孔

ELISA板做5个样品,共做10块96孔ELISA板。抗原抗体室温孵育1小时后,用PBST洗板3次。将1:10000稀释HRP标记的羊抗鼠IgG(购自Jackson公司)加入待测抗体孔中,每孔100 μ l,室温孵育1小时后,用PBST洗涤液洗板4次。每孔加入100 μ l TMB显色液(购自Cell Signaling公司),室温避光放置7分钟,每孔加入50 μ l 1M H₂SO₄终止显色反应。在多功能酶标仪(Molecular Devices SpectraMax M5Multi-mode Microplate Reader)上以测定波长450nm,参比波长630nm测定96孔板中各孔的吸光值,每孔吸光值(OD)=OD_{450nm}-OD_{630nm}。

[0133] 以抗体浓度为横坐标,测得的每孔吸光值为纵坐标,用Sigmoidal dose-response (variable slope)方式作图(GraphPad Prism软件),得到抗原-抗体结合曲线(图2)。结果表明绝大多数anti-RANKL鼠单抗与包被于ELISA板固相表面的human RANKL呈浓度依赖型结合并可达到饱和,其EC₅₀在10-20ng/ml之间,详细数据见表2。

[0134] 表2:鼠单抗与human RANKL结合的EC₅₀及其他相关数据比较

[0135]

样品名称	114-7.19.12	114-7.37.28	114-7.38.48	114-6.6.29	114-5.7.14	114-5.9.4	114-2.402	114-2.222
EC ₅₀ 值 (μ g/ml)	9.93	15.94	18.47	11.67	6.23	11.79	11.15	13.73

[0136] 实施例5、纯化的鼠单抗与monkey RANKL和mouse RANKL的种属交叉反应

[0137] 采用直接ELISA的方法检测抗human RANKL鼠单抗与食蟹猴RANKL和小鼠RANKL的种属交叉反应,实验方法与实施例4完全相同。分别采用human RANKL,monkey RANKL和mouse RANKL进行包被,monkey RANKL和mouse RANKL均购自R&D公司。

[0138] 以抗体浓度为横坐标,测得的每孔吸光值为纵坐标,用Sigmoidal dose-response (variable slope)方式作图(GraphPad Prism软件),得到抗原-抗体结合曲线。结果表明所有与human RANKL有结合能力的鼠单抗均能与monkey RANKL结合,其结合呈浓度依赖型结合并可达到饱和,EC₅₀在10-20ng/ml之间(图3,表3)。所检测抗体中有9个抗体与小鼠RANKL有交叉反应。其结合呈浓度依赖型并可达到饱和,EC₅₀在10-20ng/ml之间。续的实验证明,这9个抗体均不能抑制RANKL与RANK-Fc的结合。

[0139] 表3:鼠单抗与monkey RANKL结合的EC₅₀及其他相关数据比较

[0140]

样品名称	114-7.19.12	114-7.37.26	114-7.38.48	114-6.6.29	114-5.7.14	114-5.9.4	114-2.402	114-2.222
EC ₅₀ 值 (μ g/ml)	12.92	15.99	19.75	10.44	6.86	9.67	11.11	15.31

[0141] 实施例6、纯化的鼠单抗抑制human RANKL与RANK-Fc的结合活性

[0142] 采用竞争ELISA实验评价抗human RANKL鼠单抗是否具有抑制human RANKL与RANK-Fc结合的中和活性,并与市售品Denosumab进行比较。用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液将RANK-Fc蛋白稀释至1 μ g/ml,100 μ l每孔加入到96孔ELISA板中,4 $^{\circ}$ C放置过夜。PBST洗板3次,用PBS+2%BSA封闭1小时,之后用PBST洗板3次。分别将待测抗体和Denosumab用PBS+2%BSA从20 μ g/ml起进行4倍系列稀释至0.0024 μ g/ml,与等体积的human RANKL(浓度为0.6 μ g/ml)混匀,每孔100 μ l加入ELISA板中,样品做双复孔,每块ELISA板做5个样品,且每块ELISA板中均有Denosumab对照品,共10块ELISA板。室温孵育2小时后,用PBST洗板3次。将1:10000稀释HRP标记的羊抗人His标签的二抗(购自Abcam公司)加入ELISA板中,每孔100 μ l,室温孵育1小时后,用PBST洗涤液洗板4次。每孔加入100 μ l TMB显色液(购自Cell signaling公

司),室温避光放置15分钟,每孔加入50 μ l 1M H₂SO₄终止显色反应。在多功能酶标仪上以测定波长450nm,参比波长630nm测定96孔板中各孔的吸光值,每孔吸光值(OD)=OD_{450nm}-OD_{630nm}。

[0143] 以抗体浓度为横坐标,测得的吸光值为纵坐标,用Sigmoidal dose-response (variable slope)方式作图(GraphPad Prism软件),得到抗体竞争抑制受体与配体结合的曲线。9个与鼠RANKL有交叉反应的抗体不具备抑制受体与配体结合的活性,其余41个抗体中,有8个抗体失去中和活性,另外的33个抗体具有明显的中和活性,能够抑制RANKL与RANK-Fc的结合,且呈浓度依赖性。实验测得Denosumab的EC₅₀值为0.67 μ g/ml,而同一实验条件下测得的8个抗体的EC₅₀值位于0.2-1.0 μ g/ml之间。抗体的EC₅₀值越小,表示其阻断RANKL与RANK-Fc结合的活性越强,所得的8个抗体中有5个抗体的活性明显优于Denosumab。图4示为8个样品抑制RANKL与RANK-Fc结合的实验结果,详细信息见表4。

[0144] 表4:鼠单抗抑制RANKL与RANK-Fc结合的EC₅₀及其他相关数据比较

[0145]

样品名称	114-7.19.12	114-7.37.26	114-7.38.48	114-6.6.29	114-5.7.14	114-5.9.4	114-2.402	114-2.222	Denosumab
EC ₅₀ 值 (μ g/ml)	0.28	0.29	0.93	0.39	0.33	0.28	0.93	0.8	0.67

[0146] 实施例7、鼠单抗抑制human RANKL诱导的RAW264.7细胞分化实验

[0147] Human RANKL可以诱导RAW264.7细胞(购自上海中科院细胞库)分化为破骨细胞,本实验目的为评价能够中和RANKL与RANK-Fc结合的抗human RANKL鼠单抗是否具有抑制human RANKL诱导的RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞,购自中科院上海细胞库)细胞分化活性,并与市售品Denosumab进行比较。破骨细胞中有一种特征性的酶-抗酒石酸酸性磷酸酶,pNPP显色系统可以通过OD_{405nm}读数的高低反应抗酒石酸酸性磷酸酶活性的大小,从而反应RAW264.7细胞分化为破骨细胞的程度。RAW264.7细胞使用DMEM+10%FBS(购自Invitrogen公司)的培养基进行培养,每3-4天传代一次。进行细胞活性检测时,将对数生长长期的细胞培养基更换为 α -MEM培养基+10%FBS(购自Invitrogen公司),制成细胞悬液。以2000cell/100 μ l接种96孔板,放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中(Thermo公司,规格型号Forma311)培养1小时。加入对倍稀释的待测样品(共22个抗体,7块96孔细胞培养板)和Denosumab,以及human RANKL和MCSF,TGF β (购自R&D公司)。使得待测抗体的终浓度分别为2000,1000,500,250,125和62.5ng/ml,human RANKL的终浓度为150ng/ml,MCSF和TGF β 的终浓度分别为20ng/ml和2ng/ml。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养5天,弃细胞上清,每孔加入100 μ l细胞裂解液(Citrate Buffer pH5.0+0.5%Triton X-100),4 $^{\circ}$ C冰箱中裂解10min,每孔加入100 μ l pNPP显色液(购自Sigma公司),37 $^{\circ}$ C孵育30min,再每孔加入50 μ l终止液(0.5M NaOH),450/570nm读数。

[0148] 以抗体浓度为横坐标,测得的吸光值为纵坐标,用Sigmoidal dose-response (variable slope)方式作图(GraphPad Prism软件),得到抗体抑制RAW264.7细胞分化为破骨细胞的曲线。anti-RANKL鼠单抗能完全抑制human RANKL诱导的RAW264.7细胞分化为破骨细胞,称剂量依赖性,所测抗体中除114-6.6.7/114-6.6.18/114-6.6.29样品抑制作用较差,其余19个抗体其抑制活性很强,具有很低的EC₅₀值。市售品Denosumab的EC₅₀值为334.4ng/ml,而同一实验条件下测得的8个抗体的EC₅₀值位于200-800ng/ml之间。EC₅₀值越小,表示抗体抑制RANKL诱导的RAW264.7细胞分化的活性越强,所得的8个抗体中有3个抗体

活性优于Denosumab,有2个抗体活性与Denosumab相当。图5所示为8个样品抑制human RANKL诱导的RAW264.7细胞分化为破骨细胞的结果。详细信息见表5。

[0149] 表5:鼠单抗抑制human RANKL诱导的RAW264.7细胞分化的EC50及其他相关数据
[0150]

样品名称	114-7.19.12	114-7.37.26	114-7.38.48	114-6.6.29	114-5.7.14	114-5.9.4	114-2.402	114-2.222	Denosumab
EC50 值 (ng/ml)	267.1	470.5	585.2	799.2	314.7	340.2	396	311.3	334.4

[0151] 实施例8 抗human RANKL鼠单抗的核酸CDR区核苷酸序列测定

[0152] 根据上述鼠单抗抑制human RANKL与RANK-Fc结合实验和RAW264.7细胞分化实验结果,选择具有中和活性的抗体进行CDR区核苷酸序列的测定。共选择22个样品,采用杂交瘤培养基进行细胞培养,收集 1×10^6 个细胞,850rpm离心5分钟,去掉上清,加入450 μ l RNAlater(购自Sigma公司)重悬,冻存于-80度冰箱。具体编号信息如下:

[0153]

114-5.7.11	114.5.7.14	114-5.7.29	114-5.16.15	114-5.16.21	114-2.222
114-5.17.12	114-5.17.11	114-5.17.3	114-6.6.29	114-6.6.18	114-2.402
114-7.38.7	114-7.38.29	114-7.38.48	114-7.37.26	114-7.37.36	
114-7.19.12	114-7.19.17	114.5.9.4	114-6.6.7	114-5.16.3	

[0154] 将收集好的22个样品送南京金斯瑞生物科技有限公司进行CDR区核苷酸序列的测定。首先采用TRIzol® PlusRNA Purification System (Invitrogen, Cat. No. :15596-026)进行总RNA的提取,然后通过RT-PCR技术,反转录获得cDNA。以cDNA为模板,通过RACE方法扩增重链和轻链的可变区序列,将获得的可变区序列构建到测序载体中,每个可变区序列挑选5个阳性克隆进行核苷酸序列测定。并将核苷酸序列翻译为氨基酸序列。通过序列比对,最终重链和轻链均分别得到8个独特的CDR序列。其中114-5.7.11、114-5.7.14、114-5.7.29、114-5.16.15、114-5.16.3、114-5.16.21、114-5.17.12、114-5.17.11和114-5.17.3共9个样品的氨基酸序列完全一致,114-6.6.29、114-6.6.18和114-6.6.7共3个样品的氨基酸序列完全一致,114-7.38.7、114-7.38-29和114-7.38.48共3个样品的氨基酸序列完全一致,114-7.37.36和114-7.37.26的氨基酸序列完全一致,114-7.19.12和114-7.19.17的氨基酸序列完全一致。具体氨基酸序列信息如表6:

表 6 : CDR 的氨基酸序列

[0155]

重链的 CDR 序列

抗体名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
114-2.222	EVQLQQSGAELVKGASVKLSCTTSISGFNIK	ATYIH	WVQQRPEQGLEWIG	RIDPANGNTIKYDSKFGQ	KATITADTSSNTAYLQLSLITSEDTAVYFCAR	SLHYVYFEEDY	WGQGTTLTVSS
114-2.402	EVQLQQSGTELVKPGASVKLSCTILFGHNIK	ATYMH	WVRQRPEQGLEWIG	RIDPPNGNTIKYDPKIQD	KATUKVDITSSNTAYLQLSLISEDTAVYFCAR	ENRYDVWLAY	WGQGTTLTVSA
114-5.9.4	EVQLQQSGAELVKGASVKLSCTASGFNIK	GTYIH	WVKQRPGQGLEWIG	RIDPANANTKYDPKIQG	KATIRTDITSSNTAYLQLSLITSEDTAVYFCSS	PSGHYDVWFAY	WGQGTTLTVSP
114-7.19.12	EVQLQQSGAELVKGASVKLSCTASGFNIK	DTYMH	WVRQRPEQGLEWIG	RIDSANGNTIKYDPKIQG	KATITADTSSKTAYLHLSSLITPEDTAVYFCSSR	PKSNYDFWLPY	WGQGTTLTVSA
114-7.37.26	QVQLQQSGAELASPASVKLSCKASGYITF	TYWILQ	WVKQRPGQGLEWIG	AIYDPPGNTIKYIQKFKD	KAILTADKASATAYMQLNSLISEDSAVYFCAR	RGSRRLGAY	WGQGTTLTVSA
114-7.38.48	DVQLQESGPDIVKPSQSLTCTCTVIGYSIT	SAYSWH	WIKQFPGKLEWVG	YIHFSGVTNYPNLSLKS	RISITRDASKNQFFLQLSVTTIEDTAVYFCAT	RREITGFTY	WGQGTTLTVSA
114-6.6.29	DYKLVESGGGLVKGGSLSKLSCAAAGFTFS	SYTMS	WVRQIPEKRLWVA	TISSGGSVYIYDPSVKG	RFTISRDNANKNLYLQMSLKSSEDIAVYCYCTR	DWYDYGTIYVGGYAMDY	WGQGTSLTVSS

轻链的 CDR 序列

抗体名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
114-2.222	DIQMTQTTSSLSASLGDRTVISC	SASQGISNYLN	WYQQRPDGTVKLLIY	STSSLHS	GVPSRESGSGGTDYSLTSSLEPEDIAIYYC	QQYSKLPFI	FGAGTKLEIKR
114-2.402	DIQMTQTTSSLSASLGDRTVISC	SASQGVSNYLN	WYQQRPDGTVKLLIY	STSSLHS	GVPSRESGSGGTDYSLTSSLEPEDVAVIYYC	QQYSKLPFI	FGSGTKLEIKR
114-5.9.4	DIQMTQTTSSLSASLGDVITISC	SASQDISNYLN	WYQQRPDGTVKLLIY	YISSLHS	GVPSRESGSGGTDYSLTSSLEPEDIAIYYC	QQYSKLPFI	FGAGTKLEIKR
114-5.7.14	DIQMTQTTSSLSASLGDRTVISC	SASQGISNYLN	WYQQRPDGTVKLLIY	YISSLHS	GVPSRESGSGGTDYSLTSSLEPEDIAIYYC	QQYSKLPFI	FGAGTKLEIK
114-7.19.12	NIVLIQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDSYGRSFMH	WYQQRPGQPTLLIY	LASNLES	GVVPRFSGSGRIDFTLIDPVEADDAATYYC	QQDNEPFTI	FGGGTRLEIK
114-7.37.26	NIVLIQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDSYGRSFMH	WYQQRPGQPTLLIY	LASNLES	GVVPRFSGSGRIDFTLIDPVEADDAATYYC	QQDNEPFTI	FGGGTRLEIK
114-7.38.48	DIVLIQSPATLSVTPGDSVLSLSC	RASQISKNLH	WYQQRSHESPRLLIK	YASQGIS	GVPSRESGSGGTDFTLSINSVETEDFGHYFC	QQINSWPFI	F6AGTRLEIK
114-6.6.29	DVLMITQTPHSLPVSLGDAQSISC	RSSQSIHNSNGNTYLE	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRES	GVDPRESGSGGTDFTLKISRVAEIDLGVVYIC	FQGSHPVPT	F6GGTKLEIK

[0156] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的

内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。上文提及的每篇参考文献皆全文列入本文作为参考。

序列表

<110> 嘉和生物药业有限公司

<120> 一种抗人 RANKL 抗体

<130> 说明书序列表

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 182

<212> PRT

<213> 人源

<400> 1

[0157]

```

Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp
1           5           10           15
Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His
20           25           30
Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser
35           40           45
Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met
50           55           60
Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr
65           70           75           80
Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu
85           90           95
Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile
100          105          110
Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr
115          120          125
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
130          135          140
Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn
145          150          155          160
Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
165          170          175
Lys Val Arg Asp Ile Asp
180

```

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu His Tyr Tyr Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

[0158]

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Phe Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Lys Ala Thr Ile Lys Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Asn Arg Tyr Asp Val Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Leu Lys Gly Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Ala Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Arg Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Ser Pro Ser Gly His Tyr Asp Val Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Pro
 115 120

[0159]

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Lys Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Ser Ala Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Lys Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Pro Lys Ser Asn Tyr Asp Phe Trp Leu Pro Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Pro Gly Asn Thr Lys Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ser Arg Arg Gly Ile Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

[0160]

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Pro Gly Asn Thr Lys Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ser Arg Arg Gly Ile Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 8
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

[0161]

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30
 Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile His Phe Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Ala Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Arg Arg Glu Thr Gly Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 9
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Trp Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Val Gly Gly Tyr Ala
 100 105 110
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

[0162]

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

[0163]

Asp Ile Gln Met Thr Gln Pro Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Leu Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Lys Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 14
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

[0164]

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Arg Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Thr Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Val
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 15
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
Gly Arg Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
Thr Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asn
 85 90 95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

[0165]

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Lys Asn
 20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

[0166] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

```

TGTCCACTDCCAGGTCCAAGTTTAAACDGGATCTCTAAGCAATTCAGCCGACAGAGGCTTG
GGGCAGCCGAGGXGCAOCCAGGCCCGGGCCCGGGCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGG
AOCDDCCCAAGGCCGCAAGAGAGCGGDDCTDCCCTCGCAGTCCGAGCCCGAGAGGGAG
CGCGAGCCGCGCCDDGDDDDGGACGGCCTCCGAAAACCATGGAATTGGGACTGTCTTGG
ATTTTCCTGTTGCTTATTCTGAAAAGGTTGCACTGTATGCATCACCATCATCATCATCAT
CACCACCACCCCGGAGGSAAGCCGAGGGGGCAGCCGAGGCCGGAAGCATTGAGGGCCG
CGGCTCCCAGCACATCAGGGCCGAGAAAGCCTATGCTGGACGAAAGCTGGCTGGACCTG
GCCAAAAGGTCCAAAACCTGGAGGCTCAGCCATTTGCCACCTGACAATCAAGCCTACC
GACATCCCCAGCCGAAAGCCACAAGGTGAGCCCTGACCTCCTGGTATCACGACAGGGCT
GGGGCAAGATCAGCAACATGACCTTCAGCAATGCCAAGCTGATCGTGAATCAAGACG
GCTTTTACTACCTGTACGCCAACATCTGTTTCAGACATCACAGAGACCAAGCCGGGATCT
GGCCACAAGTACCTGCAACTGATGCTCTATGTGACTAAAACAAGCATCAAAATCCCT
TCCTCCCACACTCTGATGAAGGGCGGCAGCACCAAGTATTGGAGCCGCCAACAGCCAG
TTCCACTTCTACTCCATTAAGTCGGCCGCTCTTTAAGCTGAGGTCCGGCCGAAGAAAT
CTCCATCGAGGTGTCCAATCCAGCCCTGCTGGACCCCGATCAGGACCCCACTACTTC
GGGGCCTTEAAGGTCAGGGACATCGACTGAGATCCCCCGACCTGACCTGTGGCTAA
TAAAGGAAATTTATTTTCATTCCAAATAGTGTGTT

```

图1

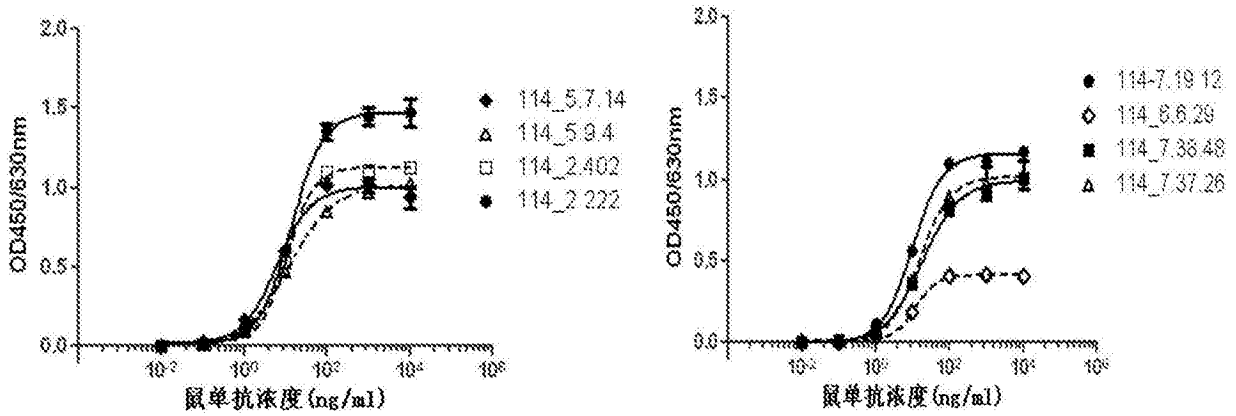


图2

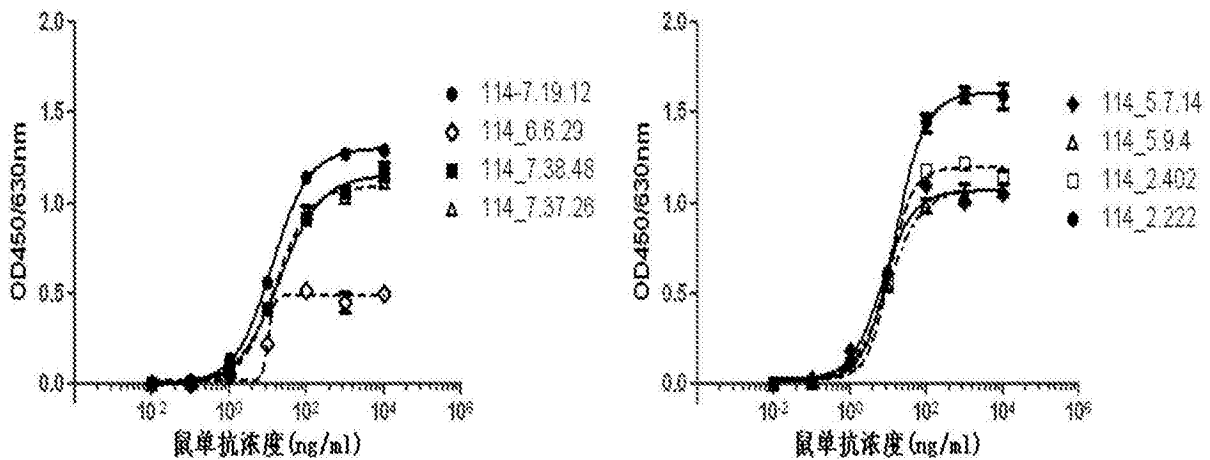


图3

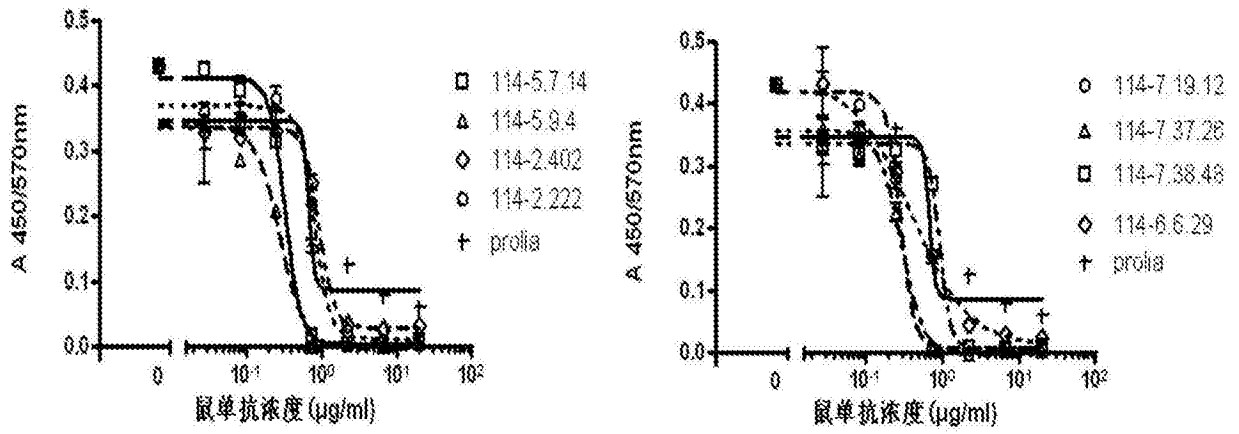


图4

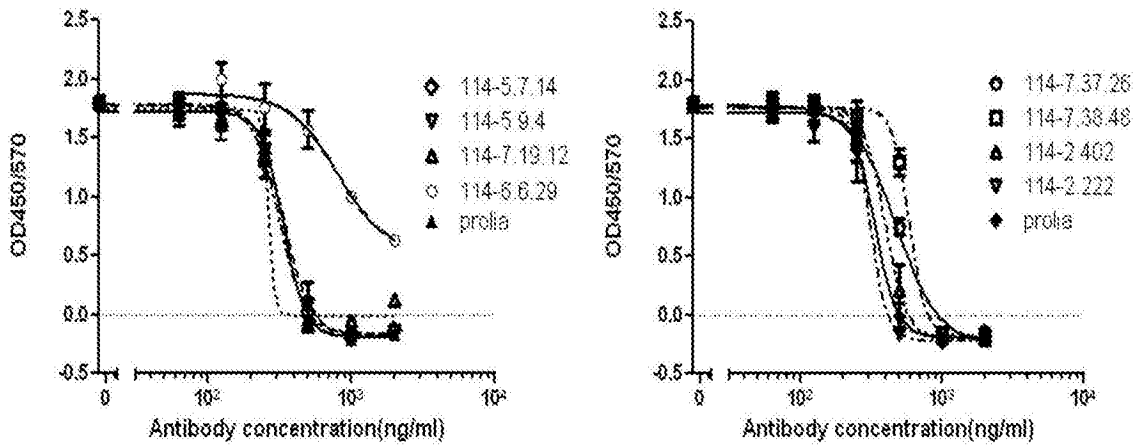


图5