

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



PCT



(10) 国际公布号

WO 2009/105934 A1

(43) 国际公布日
2009 年 9 月 3 日 (03.09.2009)

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/44 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2008/070366

(22) 国际申请日: 2008 年 2 月 27 日 (27.02.2008)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海先导药业有限公司 (SHANGHAI LEADDISCOVERY PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路 1043 号 5 层刘庆法, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 刘庆法 (LIU, Qingfa) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路 1043 号 5 层, Shanghai 201203 (CN)。 庄贤韩 (ZHUANG, Xianhan) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路 1043 号 5 层, Shanghai 201203 (CN)。 朱化星 (ZHU, Huaxing) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区哈雷路 1043 号 5 层, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海光华专利事务所 (J.Z.M.C PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市杨

浦区国定路 335 号 5022 室余明伟, Shanghai 200433 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY ANTI-HUMAN RANKL

(54) 发明名称: 抗人 RANKL 单克隆抗体

(57) Abstract: Provided are antibodies specially binding to human receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), which have the light chain variable region represented by SEQ ID NO: 2 and the heavy chain variable region represented by SEQ ID NO: 4. Also provided are the polynucleotides encoding anti-human RANKL antibodies, Fab antibody and pegylated Fab antibody. These antibodies can be used for the manufacture of medicaments for treating osteoporosis or skeletal damage.

(57) 摘要:

提供了特异性结合人细胞核因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 的抗体, 其轻链可变区如 SEQ ID NO:2 所示, 重链可变区如 SEQ ID NO:4 所示。还提供了编码抗人 RANKL 抗体的多核苷酸、Fab 抗体和聚乙二醇化的 Fab 抗体。这些抗体可用于制备治疗骨质疏松或骨损伤的药物。



WO 2009/105934 A1

抗人RANKL单克隆抗体

技术领域

本发明涉及应用重组抗体治疗人骨质疏松症和骨损伤的药物开发。

背景技术

骨骼的形成和维持是一个十分复杂的生物学过程。分子生物学的研究证明，在骨骼代谢中，有一组主要由基质细胞/成骨细胞结合的细胞核因子- κ B 受体活化因子(简称为 RANK，也称破骨细胞分化因子或破骨细胞分化和活化受体)、其受体(简称为 RANKL)以及护骨素(简称为 OPG)组成的生物学过程对维持骨骼的生长平衡极为重要。RANK 及其配基 RANKL 是破骨细胞分化、成熟和发挥作用的关键组份[1, 2, 3, 4, 5]。RANKL 一旦与 RANK 结合就会刺激前体破骨细胞分化，活化成熟的破骨细胞，引起骨吸收[3, 4, 5, 6]。这本来是机体维持骨代谢平衡的正常机制。但是，如果骨吸收过程过度，则可能引起骨质疏松。为了调节 RANK 的作用，机体产生护骨素 OPG 与配体结合，使破骨细胞的数量保持在适当的平衡状态，不至导致骨吸收的过度。研究已经证实，在骨质疏松症人体中，RANKL 超过了护骨素的水平引起过度的骨吸收[5, 7, 8]。

由于 RANK 及其配基功能的发现，骨质疏松和骨损伤的机理得到了比较清晰的阐明。骨质疏松和骨损伤涉及 OPG/RANK/RANKL 的平衡与调节[1, 3, 6]。

该调节系统涉及 RANK、RANKL 和 OPG 三种组份。RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B)，是 RANKL 的功能受体，主要在破骨细胞前体和成熟破骨细胞表面表达。RANK 是为 I 型跨膜蛋白，包含 616 个氨基酸，其中 184 个氨基酸构成胞外区，383 个氨基酸构成胞内区。RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) 是骨吸收的关键细胞因子，能刺激破骨细胞分化和发挥骨吸收功能[1, 3]。它主要由成骨 / 基质细胞 (osteoblast / stromal cells)、活化的淋巴细胞等表达。RANKL 属于 TNF 配体超家族成员，有膜结合型 (mRANKL) 和可溶型 (sRANKL) 两种形式，mRANKL 为 II 型跨膜糖蛋白，由 316 个氨基酸组成，具有一个短的 N 末端胞内区，sRANKL 是由 mRANKL 的胞外段经蛋白酶水解形成的。两种的 RANKL 均能刺激破骨细胞分化和进行骨吸收，但 mRANKL 较 sRANKL 活性更强。OPG (osteoprotegerin) 是 RANKL 的天然的可溶性诱导受体，多种细胞都可表达

OPG, 包括成骨 / 基质细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞以及内皮细胞前体和成纤维细胞前体等。OPG 是 TNF 受体超家族成员, 与其他 TNF 受体超家族成员不同之处在于它缺乏疏水的跨膜序列, 为一种可溶性糖蛋白, 由 401 个氨基酸组成。OPG 在细胞外有双体和单体两种形式, 两种形式 OPG 生理活性相同[1, 3, 4, 5, 6, 7]。

在骨吸收过程中, RANKL、RANK、OPG 三者共同参与调节破骨细胞的分化、功能。当多种刺激骨吸收因子作用于成骨 / 基质细胞后, 成骨 / 基质细胞在其表面表达 RANKL, 特异性的识别破骨细胞前, 并与其膜上的功能受体 RANK 结合, 在 M-CSF 存在的条件下, 将信号传入细胞内, 刺激破骨细胞前体发育成成熟的破骨细胞。同时, RANKL 还能通过 RANK 途径, 使成熟的破骨细胞内迅速形成肌动蛋白环, 激活成熟的破骨细胞发挥骨吸收功能。RANKL/RANK 的作用能够被 OPG 抑制[1, 3, 6]。

OPG 能够直接与 RANKL 结合, 竞争性的抑制 RANKL 与 RANK 结合, 进而抑制破骨细胞的分化和发挥功能。同时, OPG 还可与 RANKL/RANK 结合体结合形成三聚体, 直接抑制 RANKL/RANK 的作用 [14]。RANKL 缺失或 RANK 缺失小鼠均出现骨吸收异常, 发生严重的骨质疏松。而 OPG 缺乏小鼠在出生后出现骨质疏松, 加入重组 OPG 能够增加骨密度。由此可见, RANKL/RANK/OPG 共同组成了调节破骨细胞分化、发挥骨吸收功能的一个关键环路调节系统[1, 2, 5, 6]。

由于上述作用机理的存在, 在中老年人, 特别是绝经的妇女中骨质疏松相当普遍。国内外骨质疏松症方面的市场增长潜力十分强劲, 主要原因有两方面: 一是人口老龄化, 二是目前骨质疏松症的诊治率依然较低, 即便在发达国家也是如此 (在世界七个主要药品市场上只有不到 25% 的女性骨质疏松症病人被确诊并接受治疗)。

1999 年, 世界七个主要医药市场 (美国、法国、意大利、西班牙、英国和日本) 骨质疏松患者约三千五百万人, 现在被世界卫生组织认为是仅次于心血管疾病的主要保健问题的第二位疾病。据 Datamonitor 公司的一项调查显示, 2003 年骨质疏松症和激素替代疗法 (HRT) 市场已达 83 亿美元, 预计到 2014 年该市场将增至 179 亿美元。据 Decision Resources 的新的研究预测, 在世界的主要市场骨质疏松治疗剂的销售额将超过 3 倍, 从 1999 年的价值 28 亿美元上升到 2009 年的 93 亿美元, 平均每年增长 13%。这个市场的增长主要是由于世界范围老年人口数量的明显增加以及诊断方法的进步。

美国现有 1000 万骨质疏松症患者和 1800 万低骨质人群, 每年因骨质疏松症而致骨折数高达 150 万人次。美国 50 岁以上妇女和男子中分别有二分之一和八分之一的人存在发生骨质疏松性相关骨折风险。在欧洲, 随着人口老化进程加快, 骨质疏松性骨折现象也越

来越常见。英国统计学家估计，英国已有 300 万骨质疏松症患者，并还分别有三分之一和十二分之一的 50 岁以上妇女和男子正在发展产生此疾。骨质疏松症发病并不限于某一种族、文化、年龄或性别，尽管国内尚无相应大型流行病学调查。在美国，用于治疗骨质疏松症及其所致骨折的医疗费用年支出现约为 140 亿美元，后者估计至 2030 年将提高 3 倍而达到年耗 600 亿美元规模。有研究者预测，2015 年时骨质疏松症将会影响到 4100 万美国人。加拿大骨质疏松症相关医疗成本现约是 13 亿美元左右，其中大多支出耗费在长期影响、住院治疗和随后护理之中。加拿大今后 25 年内花费在治疗骨质疏松性骨折方面的费用估计将达 320 亿美元。英国目前用于治疗骨质疏松症的年成本超过 17 亿英镑，后者相当于日耗 500 万英镑。骨质疏松症及其后果的社会负担不容忽视。

据我国卫生部门抽样调查结果显示，我国不同年龄段骨质疏松症的发病率依次为：50-60 岁为 21%，60-70 岁为 58%，70 岁以上将近为 100%。我国是人口大国，也是老年人口最多的国家。有资料显示，目前我国骨质疏松症潜在患者（包括低骨质者）总数估计约有 8700 万人，占全国总人口近 7%。考虑到我国现有 60 岁以上人数已占总人口的 9% 左右，且社会老龄化程度还在不断上升，该类疾病的患病人群正在不断扩大，据统计每年新增患病人数达 700 万之多。预计到 2010 年，潜在骨质疏松症患者数量将增至 1.14 亿人；至 2025 年，达到 1.50 亿人。显然，国内骨质疏松症防治药物市场潜力是极其巨大的。据统计，我国骨质疏松治疗药物（不包含保健品）1999 年市场容量大约为 13.7 亿，2000 年的市场容量大约为 16.8 亿元左右，年增长率约 22%。如同类风湿关节炎的情况一样，随着具有突出疗效抗体类为代表的新一代治疗药物的出现，这一市场还将持续急剧扩大。预计，将在 5 年内使该市场扩大 10 倍，达到 150 亿元。因此，该类药物的市场需求十分明显，并将持续高速度增长。

除了上述大量的骨质疏松症患者外，在某些恶性肿瘤和自身免疫疾病的发生发展和治疗过程中也会因上述机理而产生骨损伤，例如牙周炎、类风湿关节炎、骨癌以及由于恶性肿瘤转移导致的骨癌均有很高比例的骨损伤。在使用激素等药物治疗某些疾病时，也可能引起骨质疏松或者骨损伤。

单抗、治疗性单抗及其发展：

单克隆抗体药物在过去十几年获得了极大的发展。仅仅在抗 TNF α 相关疾病方面就有若干产品开发成功，并且获得了极大的成功。由于巨大的市场需求，这类药物还在高强度开发中[9, 10, 11, 12]。

目前，获得单克隆抗体的方法主要是杂交瘤，主要涉及啮齿类（如小鼠、兔子）、禽类（如鸡等）、灵长类（如猕猴、猿等）和人。另外，近几年对骆驼抗体的研究越来越多。也有人利用抗体人源化的小鼠研究开发单克隆抗体。

虽然人类免疫系统能够产生种类极其庞大的抗体，但是人或全人抗体技术却遇到了瓶颈：人体内产生特异性抗体的前体细胞丰度很低，即使在抗体阳性的个体中，能够产生特异性抗体的前体细胞也远远低于人杂交瘤技术所需要的能够产生特异性抗体细胞数量。因此，分离、纯化和富集特异性分泌抗体的 B 细胞是建立全人抗体平台的关键技术之一。

作为治疗用药的单克隆抗体有很多要求，其中亲和力、中和能力、特异性和副作用是要考虑的重点，而这三个方面又相互关联。一般来说，亲和力高，所需剂量就小，不但制造成本降低，同时引起副作用的可能性就小；特异性高，对体内其他成分的影响就小，副作用就低。因此，获得高亲和力的单克隆始终是抗体药物研发中的重要方面。但是，并不是每一种方法都可以获得高亲和力或者中和能力都能符合制药要求的单克隆抗体 [9, 10, 11, 12]。

虽然获得单克隆抗体的途径很多，但是获得符合制药要求的单克隆抗体并不是一件容易的事。有时，特异性、中和能力、亲和力或者其他方面的限制使得许多单抗不能用于临床治疗。

能否作为候选药物的另一项十分重要的要求是是否容易制造。这就要求抗体的生产能够以大规模、低成本进行生产。这其中最重要的指标是每升培养液能够生产抗体的量，即通常所说的表达量 [9, 10]。

在过去二十年，重组单抗药物获得了极大的发展，新的产品层出不穷，已经成为临床治疗用药中发展最快的领域，引起了业界的广泛关注。各国政府和制药公司都积极投入巨资进行单抗药物的研究开发。但是，在单抗药物高速发展的同时，也遇到了自身难以解决的问题。其中，比较突出的是单抗药物必须用重组的哺乳动物细胞生产，且用药量很大，造成生产成本居高不下，患者不堪重负。因此，如何在保证疗效的前提下降低成本，成了单抗药物研发的重点突破方向之一。通过大肠杆菌廉价地生产小型化抗体，并进行 PEG 化和纳米修饰，从而大大降低成本的单抗药物研究开发途径，使单抗药物的发展进入一个新的阶段。

已上市抗体药物销量的急剧增长，以及新的抗体药物的持续上市，对抗体医药生产厂家的抗体生产能力提出挑战。小分子抗体技术是突破这一瓶颈的最佳方案之一。大肠杆菌表达系统具有方法成熟，工艺简单，产量高，周期短，生产成本低等优点。虽然大肠杆菌

由于缺乏糖基化能力，不能催化 Fc 上的糖基转移，不适合完整抗体的表达，但是可以用于 Fab，Fv，scFv 等抗体片段的表达，加上 PEG 化技术，通过这种人工糖基化修饰，使其达到或接近天然抗体的特性。即将上市的 CDP-870 就应用大肠杆菌进行生产，其成本降低至其他 TNF 抑制剂药物的四分之一。

抗体库技术是上世纪末期建立的一种可以脱离杂交瘤技术而获得抗体的方法，在过去近二十年里获得了很大的发展，已经逐步成为抗体工程不可缺少的重要技术，并在分子进化、抗体改造、抗体成熟等方面发挥了重要作用[13, 14, 15]。

RANKL 拮抗剂及其在临床上的应用：

前已述及，RANKL 是引起骨质疏松和骨损伤的主要因素之一，而且有大量研究表明，它还是强直性脊椎炎、牛皮癣和类风湿关节炎等病人骨损伤以及老年人和绝经后妇女骨质疏松的主要介质[16, 17, 18, 19, 20]。

鉴于骨质疏松和骨损伤对的致残率高且发病群体大，今年来全球范围内着力开发相关预防和治疗药物的机构越来越多。到目前为止，国际上已有多种拮抗人 RANKL 的抗体、受体-Fc 融合蛋白进入临床试验，获得了具有很好前景的试验结果，其中主要有重组人 OPG 和重组抗 RANKL 单抗[21]。

本项目是以全人 Naïve 组合抗体库为起点，通过一系列的筛选（Panning），获得了对人 RANKL 有中和能力的全人抗体，运用分子生物学技术将其重链和轻链可变区基因进行了克隆，并在 CHO 细胞和大肠杆菌中成功表达了具有生物学活性的全长和 Fab 形式。通过 PEG 化，成功获得了 PEG 化的 Fab。

参考文献

1. Dougall WC, Glaccum M, Chat Tier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymphonode development. *Genes Dev*, 1999. 13 (18) : 2 412—2 424
2. Bucay N, Sarosi L, Dunstan CR, et al OPG - deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification . *Genes Dev*, 1998. 12 (9) : 1 260—1 268
3. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*, 2003, 11: 17—21

4. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, et al. Receptor activator NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis . J Periodont Res, 2003, 38: 380—387
5. Mogi M, Otogoto J, Ota N, et al. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis J Dent Res, 2004, 83 (2) : 166—169
6. Hasegawa T, Yoshimura Y , Kikui T, et al. Expression of receptor activator of NF— κ B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. J Periodont Res, 2002 37: 405 —411
7. Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, et al. Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin biological activities. Exp Cell Res, 2004, 293: 292— 301
8. Nakashima T. Protein expression and function difference of membrane bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of expression by osteotropic factors and cytokines . Biochem Biophys Res Commun, 2000, 275 (3) : 768—775
9. Antibody Engineering, Edited by Benny K. C. Lo, in Methods in Molecular Biology, V248, Humana Press.,
10. Beyond borders: Global Biotechnology Report 2005, Ernest & Young, 2005.
11. Progressions 2005, The Ernest & Young Annual Global Pharmaceutical Report, Ernest & Young, 2005.
12. Monoclonal Antibody Successes in the clinic, Janice M Reichert, et al, 2005, Nature Biotech., 23 (9) 1073-1078.
13. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display—An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom, Lidia Rian~

- o-Umarila, Victor Rivelino Juárez-González, Timoteo Olamendi-Portugal, Mauricio Ortiz-León, Lourival Domingos Possani and Baltazar Becerr, 2005, FEBS Journal 272: 2591 - 2601.
14. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2, a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2, Juárez-González VR, Riaño-Umarila L, Quintero-Hernández V, Olamendi-Portugal T, Ortiz-León M, Ortiz E, Possani LD, Becerril B., 2005, J Mol Biol. 2005 Mar 11;346 (5) :1287-97.
 15. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes, Ana Fernandez-Gacio, Marilyn Uguen and Jacques Fastrez, 2003, Trends in Biotechnology, 21 (9) :408-414.
 16. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis, Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM, 1999, 28;397 (6717) :315-23.
 17. RANK is essential for osteoclast and lymph node development, William C. Dougall, Moira Glaccum, Keith Charrier, et al, 1999, *Genes & Dev.*, 13: 2412-2424.
 18. RANKL / RANK/OPG调节系统在牙周炎发病机制中的作用, 张晶, *口腔医学研究*2005年8月第21卷第4期.
 19. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis, Nobuyuki Udagawa, Shigeru Kotake, Naoyuki Kamatani, et al, 2003, *Arthritis Res.*, 4:281-289.
 20. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women, Guitty Eghbali-Fatourehchi, Sundeep Khosla, Arunika

Sanyal, et al., 2003, *J. Clin. Invest.* 111:1221 - 1230.

21. Clinical development of anti-RANKL therapy, Edward M Schwarz and

Christopher T Ritchlin, 2007, *Arthritis Research & Therapy*, 9 (Suppl 1.

发明内容

本发明的目的是公开一种抗人 RANKL 抗体及其编码基因。

本发明的另一个目的是公开上述抗人 RANKL 抗体的 Fab 抗体及其 PEG 化的产物。

本发明的第三个目的是公开上述抗人 RANKL 抗体及其 Fab 抗体的制药用途。

本发明一方面公开了一种抗人 RANKL 抗体，其轻链氨基酸序列包含 SEQ ID NO:2，重链氨基酸序列包含 SEQ ID NO:4。

本发明另一方面公开了一种多核苷酸，该多核苷酸编码上述抗人 RANKL 抗体的轻链，优选的，该多核苷酸的序列包含 SEQ ID NO:1。

本发明第三方面公开了一种多核苷酸，该多核苷酸编码上述抗人 RANKL 抗体的重链，优选的，该多核苷酸的序列包含 SEQ ID NO:3。

本发明第四方面，公开了一种多核苷酸，该多核苷酸编码上述抗人 RANKL 抗体的全长重链，优选的，该多核苷酸序列包含 SEQ ID NO:6。

本发明第五方面，公开了上述抗人 RANKL 抗体的 Fab 抗体。优选的，上述 Fab 抗体被 PEG 化。

本发明第六方面，公开了将上述抗人 RANKL 抗体或其 Fab 抗体用于制备治疗与 RANKL 相关的骨质疏松和骨损伤的药物，如制备老年性骨质疏松、妇女绝经期后的骨质疏松、类风湿关节炎等疾病引起的骨损伤的药物。本发明的抗人 RANKL 抗体或其 Fab 抗体可用于治疗类风湿性关节炎、某些癌症、绝经后妇女、老年人等的骨质疏松或骨损伤。

本发明有益效果：

虽然现有的治疗骨质疏松和骨损伤的药物有较好的疗效，但同时它们也有如下问题：s 但它们也存在很大的缺点。目前治疗和预防主要是用磷酸盐药物，全球市场机会主要被 MerK 的 Fosamax 所霸占。本发明所述的药物与 Fosamax 具有完全不同的作用机理，Fosamax 需要每周至少一个剂量，而本产品则是半年一次；且不像 Fosamax 那样可引起 gastrointestinal side effects。

本发明采用了人人杂交瘤技术，获得了抗人 RANKL 全人抗体，对该抗体的理化及生物活

性的初步分析表明, 该抗体与人 RANKL 有较好的亲和力, 体外能有效中和 RANKL 的促进破骨细胞形成的生理作用。一方面, 由于其全部氨基酸序列均与人抗体完全一致, 使其对人体的免疫原性降低到最低。其次, 应用大肠杆菌表达系统表达 Fab 小分子抗体, 使生产成本大大降低, 并且没有补体结合和 ADCC 等效应引发的副作用。第三, 采用 PEG 化表面改性技术, 以减小其被内皮系统吞噬的概率, 延长在血液循环系统中的时间, 同时又实现在体内缓释的目的, 避免了小分子抗体半衰期短的缺点, 在保持其抗人 RANKL 活性的同时, 使之更适合体内应用。与现有的单抗药物相比, 可以大大降低用药频率。这不但进一步降低了病人的经济负担, 而且大大减少了病人注射的痛苦, 减少了劳动力损失。

附图说明

图 1: 哺乳动物细胞表达载体结构示意图。其氨苄青霉素抗性基因 AMP 和复制起点 0 来自 pUC57, 真核启动子 Pcmv 来自人巨细胞病毒, SV40 Ori 和 SV40 PolyA 信号来自 SV40 病毒。其抗性基因 Neo (R) 来自 pCDNA3.1 (Invitrogen)。

图 2: 目标抗体的 HPLC 检测。图中显示, 只有一条目标带, 积分显示, 其纯度达 98% 以上。

图 3: 抗人 RANKL 抗体对破骨细胞形成的影响。图中数据为 TRAP 染色细胞的计数结果。纵坐标为形成的破骨细胞数; 横坐标为抗体浓度, 范围如正文所述。

具体实施方式

本发明的基本策略是, 从抗体库中获得抗人 RANKL 抗体的重链和轻链的可变区, 并以此为基础获得其 Fab 以及全长两种形式, 以使用以评价其药用价值。

实施例 1: 从抗体库中筛选抗人 RANKL 抗体基因可变区

(1) Naïve 人源组合抗体库的构建

采用来自 22 个省或直辖市、包括 15 个民族的近 3000 位健康青年人的血样 (每人 1 毫升), 用 TRIZOL (GIBCO BRL) 抽提总 RNA, 按照下述文献扩增其重链和轻链可变区的编码区, 并构建抗体库。

1. Hoogenboom and Winter, By-passing immunisation: human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. J. Mol.

Biol., 227, 381-388

2. Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., Prospero, T. D., Hoogenboom, H. R., Nissim, A., Cox, J. P. L., Harrison, J. L., Zaccolo, M., Gherardi, E. & Winter, G. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.*, 13, 3245-3260.
3. Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. & Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.*, 13, 692-698.
4. Marks et al. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597
5. Haidaris CG, Malone J, Sherrill LA, Bliss JM, Gaspari AA, Insel RA, Sullivan MA., Recombinant human antibody single chain variable fragments reactive with *Candida albicans* surface antigens. *J Immunol Methods.* 2001 Nov 1;257 (1-2) :185-202.

构建好的抗体库置于-80℃保存备用。

(2) 筛选的操作步骤:

1. 冻藏的抗体库菌株 1 毫升, 37 度化冻后加入新鲜 LB 培养基 14 毫升, 于 50 毫升三角瓶中 37 度培养 16 小时。
2. 12000rpm 高速离心 10 分钟, 转移上清至一个无菌的 50 毫升离心管中, 保存备用。其滴度应在 2×10^{11} 以上。
3. 以纯化的人 RANKL 蛋白 (Orbigen 公司产品) 为抗原, 常规方法包被 25 毫升细胞培养瓶。
4. 包被后的细胞瓶中加入不少于 3×10^{10} 噬菌体颗粒, 37 度温育 1 小时。
5. 倒掉瓶中的液体, 用 10 毫升加入了 1% Tween-20 的 PBS 洗涤培养瓶 10 次。
6. 在培养瓶中加入 1 毫升对数期的 TG1 细胞, 37 度温育震荡培养 16 小时。
7. 重复 2~6 步, 共进行 4 个重复循环。
8. 将上述获得的细胞稀释至 100000 细胞/ml 后在加入 0.1% 氨苄青霉素的 1.5% 琼脂平板上进行培养以获得单克隆。

9. 取上述平板上的克隆在 96 孔深孔板上进行培养, 每孔一个克隆, 共作 960 个克隆 (10 块 96 孔板)。
10. 将上述深孔板在 96 孔板离心机上 5000RPM 离心 20 分钟后, 将上清转移到新的无菌深孔板, 封口后保藏于 4 度备用。
11. 取 96 孔板 10 块, 每孔中加入人 RANKL (10ug/ml) 10 微升常规包被后, 分别加入上述保存的上清 10 微升, 37 度温育 1 小时后用含有 1%Tween-20 的 PBS 洗涤 20 次。
12. 加入 1 微升 HRP 标记的羊抗 M13 单抗(购自 GE 公司), 37 度温育 30 分钟后用 1%Tween-20 的 PBS 洗涤 10 次。
13. 加入含有 0.025%DAB 显色剂的 PBS 200 微升和 1 微升 1%的 H_2O_2 , 37 度温育显色 20 分钟后在读板机上读取 595 纳米处的光吸收。
14. 根据光吸收读数确定显色反应强的孔, 这些孔相对应的克隆即为亲和力较强的抗体可变区克隆。本研究通过上述过程筛选出了 762 个阳性克隆, 根据读数初步确定其中 8 个亲和力最强的克隆。
15. 对上述 8 个克隆进行小量样品制备, 并用于亲和力测定的研究, 最终确定, 2G8 号克隆的亲和力最高, 达到 3.2×10^{-9} 。亲和力的测定方法采用 Scatchard 分析法 (Munson et al, 1980, Anal. BioChem, 107:220) 进行, 结果表明, 2G8 的亲和力达到 3.2×10^{-9} 。

(3) 抗体可变区编码序列向表达载体的克隆

1. 将上述 2G8 的菌株在 100ml LB 培养基中扩增, 用 Promega 公司的质粒 DNA 抽提纯化试剂盒纯化质粒 DNA。
2. 上述质粒 DNA 酶切后在 1.5%琼脂糖凝胶电泳上分离酶切片段, 取 360bp 左右的带进行胶回收, 所得片段即为重链可变区。
3. 上述质粒 DNA 后在 1.5%琼脂糖凝胶电泳上分离酶切片段, 取 320bp 左右的带进行胶回收, 所得片段即为轻链可变区。

然后利用 overlapping PCR 方法[Two-step total gene synthesis method, Lei Young* and Qihan Dong, Nucleic Acids Research, Vol. 32 No. 7; Assembly PCR oligo maker: a tool for designing oligo deoxynucleotides for constructing long DNA molecules for RNA production, Roman Rydzanicz, X. Sharon Zhao and Philip E. Johnson, Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33], 分别将重链可变区和轻链可变区分别与相应的恒定

区（包括信号肽编码区）进行拼接，构成全长重链和全长轻链的编码区。重链和轻链的恒定区的序列如下：

（1）轻链恒定区

tctagaccaccatggaaaccccagcgcagcttctcttctcctgctactctggctcccagataaccaccgga[V 区]
cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgt
gtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact
cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagca
gactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttca
acaggggagagtgttgataagtcgac (SEQ ID NO:5)

（2）重链恒定区

aaggttgaccaccatggagtttgggctgagctggctttttcttgtggctattttaaagggtgtccagtgt[V 区]g
cctccaccaagggcccatcggtcttccccc tggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgccctggg
ctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcgctctgaccagcggtgcaca
ccttcccagctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcaacttcggc
accagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttg
tgtcgagtgccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggaca
ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttc
aactggtaactggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccg
tgtggtcagcgtctctaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaag
gcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccc
ccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgc
cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctcct
tcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataagtcgac (SEQ ID
NO:6)

4. 把上述全长重链和轻链的编码区插入到如下表达载体，构成全长抗体的表达载体。本试验中的表达载体采用 pHCMV-II（图 1）。本例中，也可以用 Invitrogen 公司的 pcDNA3.1、Promega 公司的 pCI-Neo 等载体。

实施例 2：重组抗体在 CHO 细胞的瞬时表达与小量样品制备

1. 上述构建的带有抗体基因的表达载体在大肠杆菌 DH5a 菌株接种于 100 毫升 LB 培养基中进行扩增，用 Qiagen 公司的 Ultrapure Plasmid DNA Purification Kit 抽提纯化质粒 DNA。市场上有多种类似产品可供选择。
2. 将上述纯化的质粒 DNA 采用 Invitrogen 公司的 Lipofamine 试剂盒转染 CHO 细胞，操作参照厂家的说明书进行。亦可选用 PEI25000 或其他公司的转染试剂或试剂盒。
2. 转染条件：在 5 毫升新鲜 E302 培养基中加入经过 24 小时培养的 CHO DHFR(-) 细胞(ATCC 编号 CRL-9096)，使其接种密度达到 2×10^5 细胞/毫升；37 度培养 48 小时后，450Xg 收集细胞，转换到 1 毫升新鲜的 DMEM 培养基，小心重选细胞后，按照厂家说明进行共转染。共转染后的 CHO 细胞培养 48 小时后，取 50 微升上清用 ELISA 方法检测抗体表达情况。
3. 在上述培养体系中加入 45 毫升新鲜 E302 培养基，并加入 G418 至终浓度 50ug/ml，37 度继续培养 96 小时。
4. 单克隆抗体的纯化：单抗的纯化采用 Protein A 亲和层析柱从上述细胞培养上清中直接分离纯化，并用 SDA-PAGE 电泳证明，所得产物纯度大于 90%。
5. 以上亲和层析的产物再次经过分子筛层析，获得纯度>98%的样品（图 2）。这些样品可以用于以下的进一步分析与研究。

实施例 3：单克隆抗体中和活性和亲和力研究

1. 抗人 RANKL 抗体的中和活性

(1) 对破骨细胞形成过程的抑制作用

RAW264.7 (ATCC No. TIB-71, Manassas, Va.) 是一个由 Abelson 小鼠白血病病毒诱导的肿瘤衍生的巨噬细胞株，在 RANKL 存在时，该细胞系可分化成类破骨细胞。Simonet 等 (1997, Cell 89 p. 309) 和 Lacey 等 (1998, Cell 93 p. 165) 详细描述了在 RANKL 存在时在 RAW 细胞培养物中产生破骨细胞的检测方法。

RAW 细胞可以由配体刺激从而分化成类破骨细胞，其分化的情况可以通过检测 TRAP（抗酒石酸盐酸性磷酸酶（Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP）的活性来了解。因此，抗人 RANKL 抗体对骨质疏松的影响或骨损伤也就可以检测了。

在一定量（50 ng/ml）RANKL 存在的情况下，加入 10 ng/ml~150 ng/ml 本发明制备的抗人 RANKL 抗体，对 RAW 细胞培养 4 天，用 ara-硝基磷酸盐处理 5 分钟后，把培养基从细胞吸出，每孔中加入 120ul 0.1M 的柠檬酸缓冲液（含 1 mL triton X-100）后，室温处理 5 分钟。采用 QUIDEL Metra TRAP5b ELISA 试剂盒（QUIDEL 公司产品编号：8036），加入 100 微升 PNPP 溶液（157.8 mg 酸性磷酸酶试剂（Sigma 104-100），7.2 mL 酒石酸盐溶液（Sigma cat. no. 387-3）和 22.8 mL 柠檬酸缓冲液），室温处理 3 到 5 分钟。最后，加入 50ul 0.5 M NaOH 溶液终止反应。

TRAP 可把 para-硝基磷酸盐转化成 para-硝基酚，在 405nm 波长下可对其进行光密度定量。TRAP 的活性是破骨细胞发育的替代指标，与 405nm 的光密度相关。一组光密度与抗 RANKL 抗体浓度的数据即可反映抗体抑制破骨细胞形成的情况。

中和作用测试：采用抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）染色法。多核 TRAP 阳性染色是破骨细胞的特征性标志，这是设计本试验的基础。以 RAW 264.7 细胞为试验材料， 1×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板，培养 24 小时后分别用 50 ng/ml RANKL 和不同浓度（10ng~500ng/ml），细胞每 3 d 换液 1 次。第 6 天抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）染色（美国 Sigma-Aldrich 公司，387-A），细胞用柠檬酸盐/丙酮溶液固定 1 分钟，在以萘酚 AS BI 磷酸盐作为底物的孵育液中 37 度孵育 1 小时，蒸馏水洗 3 次，苏木素复染 2 分钟，干燥后二甲苯透明，DPX（聚苯乙烯+酞酸丁二酯+二甲苯）封固，光镜观察。TRAP 阳性细胞为破骨细胞，镜检计数 TRAP 阳性多核破骨细胞（ ≥ 3 个核）的数量。

试验结果见图 3。抗体浓度分别为：0，0.001，0.01，0.05，0.1，1.0，10.0 ng/ml。从图中数据可以看出，本发明的抗人 RANKL 抗体具有良好的中和 RANKL 刺激破骨细胞形成的能力。

2. 亲和力鉴定

亲和力测定采用 Scatchard 分析法（Munson et al, 1980, Anal. BioChem, 107:220）进行，结果表明，2G8 的亲和力达到 3.2×10^{-9} 。

上述结果表明，2G8 的亲和力已经分别达到 0.1nM，达到了国际公认的作为治疗性抗体药物亲和力需达到 1nM 水平的要求。

3. 抗人 RANKL 单抗基因的 DNA 序列测定

根据系谱, 将上述 2G8 抗人 RANKL 抗体的可变区进行 DNA 测序, 测序工作委托上海基康公司进行。结果如下:

2G8 轻链可变区基因序列 (5'→3', 324bp)

gaaattgtgttgacgcagtcctccaggccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgtagggccag
tcagagtgttcgcggcaggtacttagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtg
catccagcagggccactggcatcccagacaggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagc
agactggagcctgaagattttgcagtggtggactgtcagcagtatggtagttcacctcggacgttcggccaaggac
caaggtggaaatcaa (SEQ ID NO:1)

推测的 2G8 轻链可变区的氨基酸序列 (108 氨基酸)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASRSVRSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGALSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS
RLEPEDFAVYYCQQRLNWPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)

2G8 重链可变区基因序列 (5'→3', 366bp)

gaggtgcagctgttgagctctgggggaggttgggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgg
attcaccttttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaggtatta
ctgggagtggtggttagtacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaac
acgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagatccagggactac
ggtgattatgagttggttcgaccctggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO:3)

推测的 2G8 重链可变区的氨基酸序列 (122)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYLMKWVRQAPGKGLEWVSGITGIGGLTYYSVSKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSARLEDTSVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)

实施例 4: 抗人 RANKL-Fab 的克隆与表达和 PEG 化

(1) Fab 的表达和小量制备

10μg 上述 DNA 片段 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 3 按照常规方法克隆到 pCOM3H 载体 (Wu SC, Lin YJ, Chou JW, Lin CW. 2004, Construction and characterization of a Fab recombinant protein for Japanese encephalitis virus neutralization. Vaccine. 25;23 (2):163-71) 上, 电转化 5ml 大肠杆菌 DH5a (来自 New England Biolabs 或者 Takara)

细胞后，产物在IPTG/X-gal平板上进行初步筛选鉴定，取 20 个菌斑接种于含有氨苄青霉素的液体LB培养基进行扩增，IPTG诱导后进行ELISA鉴定后，进行小量Fab抗体制备，称之为 2G8Fab。

(2) Fab 的 PEG 化

将上述获得的 2G8Fab 进行 PEG 化，Fab 的 PEG 化和纯化方法参照 AP Champman 等[参考文献：Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half life. Nature Biotech. V17 1999 August, Page 780-783]的方法进行，获得 PEG 化的抗人 RANKL 2G8Fab-PEG。

实施例 5：2G8Fab-PEG 对 RANKL 拮抗能力的研究

上述实施例 4 纯化的抗体通过以下方法检测其对 RANKL 的中和能力。

制备的 Fab 按照实施例 3 的描述进行拮抗 RANKL 中和能力试验，发现 2G8Fab 具有很好的中和作用（结果见图 3）。

权 利 要 求

1. 一种抗人 RANKL 抗体，其特征在于，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:2，重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:4。
2. 一种多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码权利要求 1 所述抗人 RANKL 抗体的轻链可变区。
3. 如权利要求 2 所述多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸的序列为 SEQ ID NO:1。
4. 一种多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码权利要求 1 所述抗人 RANKL 抗体的重链可变区。
5. 如权利要求 4 所述多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸的序列为 SEQ ID NO:3。
6. 一种多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码权利要求 1 所述抗人 RANKL 抗体的全长重链。
7. 如权利要求 6 所述多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸序列为 SEQ ID NO:6。
8. 如权利要求 1 所述抗人 RANKL 抗体的 Fab 抗体。
9. 如权利要求 8 所述的 Fab 抗体，其特征在于，上述 Fab 抗体被 PEG 化。
10. 将权利要求 1 所述抗人 TNF α 抗体或权利要求 8 或 9 所述 Fab 抗体用于制备预防或治疗与 RANKL 相关的骨质疏松和/或骨损伤的药物。

1/3

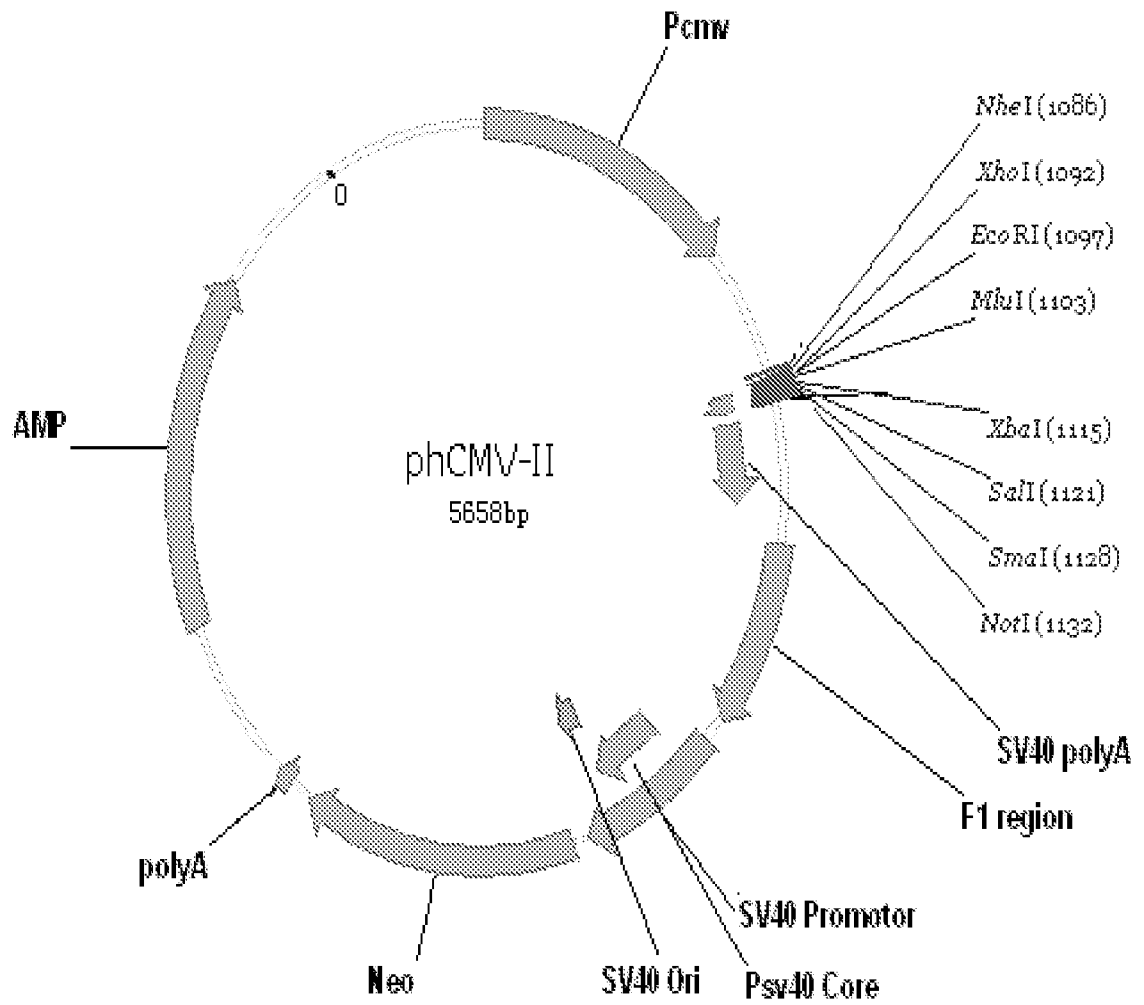


图 1

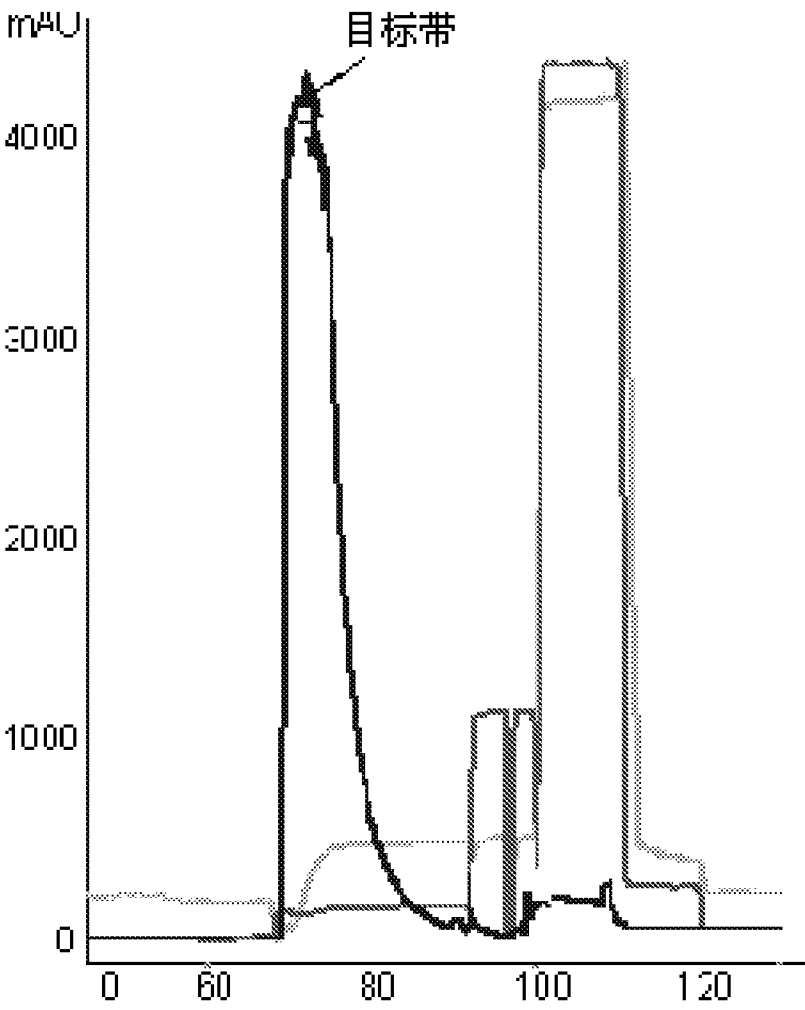


图 2

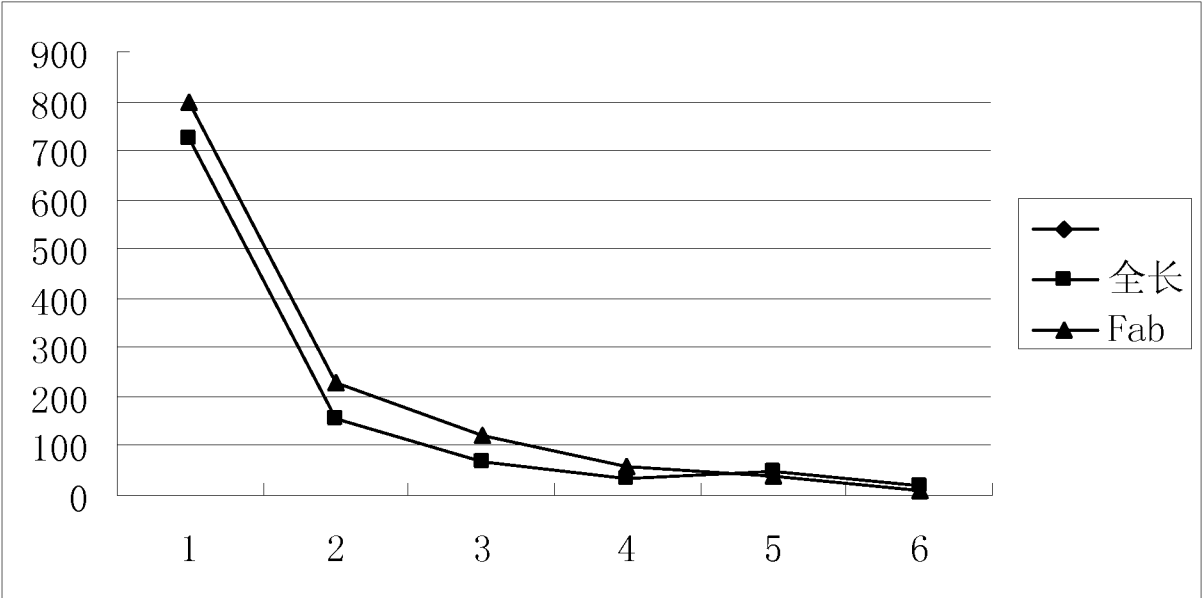


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/070366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**See Extra Sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI; CNPAT; WPI; PAJ; EPODOC; ISI Web of Knowledge; ELSEVIER; Embase and keywords: RANKL, Rank ligand, human, antibody, skeletal and the like;

EBI-EMBL; GenBank: SEQ ID NO: 1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US6740522B2 (IMMUNEX CORP) 25 May 2004 (25.05.2004) see abstract and example 10	1, 8-10
A	WO0191793A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP ETAL) 06 Dec. 2001 (06.12.2001) see page 5, lines 7-15, tables I-II of the description and claim 13	1, 8-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 Nov. 2008 (11.11.2008)

Date of mailing of the international search report

04 Dec. 2008 (04.12.2008)

Name and mailing address of the ISA/CN

The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

ZHOU, Xia

Telephone No. (86-10)62411098

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/070366

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 2-7
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Extra Sheet
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/070366

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOSTENUIK P. J. et al., Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength, Current Opinion in Pharmacology, December 2005, vol.5, No.6, pages 618-625, see the whole text	1, 8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/070366

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US6740522B2	25.05.2004	US2002086826A1	04.07.2002
WO0191793A1	06.12.2001	AU6660401A	11.12.2001
		EP1283721A1	19.02.2003
		US2003215450A1	20.11.2003
		JP2003534022T	18.11.2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/070366

Continuation of : Box No. II

It is well established in the art that the formation of an intact antigen-binding site generally requires the association of the complete heavy and light chain variable regions of a given antibody, viz. in order for an antibody encoded by the polynucleotides to display human RANKL binding or neutralizing specificity, it needs to fulfill structural requirements with regard to at least its light and heavy chain variable regions. Claims 2-7 define the polynucleotides by either its heavy chain variable region or its light chain variable region or even only the constant regions thereof, but the present application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any of such products claimed, however, whose effects cannot be anticipated by the person skilled in the art. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent that a meaningful search of the whole claimed subject-matter of these claims could not be carried out.

Continuation of: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28 (2006.01) i

C12N15/13 (2006.01) i

C07K17/08 (2006.01) i

A61K39/395 (2006.01) i

A61K39/44 (2006.01) i

A61P19/10 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/070366

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI; CNPAT 和关键词: RANKL, Rank 配体, 人, 抗体, 骨等;

WPI; PAJ; EPODOC; ISI Web of Knowledge; ELSEVIER; Embase 和关键词: RANKL, Rank ligand, human, antibody, skeletal 等;

EBI-EMBL; GenBank: SEQ ID NO: 1-4

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US6740522B2 (IMMUNEX CORP) 25.5 月 2004 (25.05.2004) 见摘要和实施例 10	1, 8-10
A	WO0191793A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP ETAL) 06.12 月 2001 (06.12.2001) 见说明书第 5 页第 7-15 行, 表 I-II 和权利要求 13	1, 8-10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

11.11 月 2008 (11.11.2008)

国际检索报告邮寄日期

04.12 月 2008 (04.12.2008)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

周霞

电话号码: (86-10) 62411098

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2008/070366

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题,即:

2. ☒ 权利要求: 2-7

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分,以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

见附加页

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求,并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明,即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费,本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索,本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费,本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说,是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此,本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费,同时提交了异议书,缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费,同时提交了异议书,但未缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	KOSTENUIK P. J.等, Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength, Current Opinion in Pharmacology, 12 月 2005, 第 5 卷, 第 6 期, 第 618-625 页, 见全文	1, 8-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/070366

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US6740522B2	25.05.2004	US2002086826A1	04.07.2002
WO0191793A1	06.12.2001	AU6660401A	11.12.2001
		EP1283721A1	19.02.2003
		US2003215450A1	20.11.2003
		JP2003534022T	18.11.2003

续：第 II 栏

本领域公知完整抗原位点的形成通常需要给定抗体的完整重链和轻链可变区的缔合,即为了获得能展示人 RANKL 结合或中和特异性的由多核苷酸编码的抗体,这需要满足至少给出抗体的轻链和重链可变区的结构需求。权利要求 2-7 通过重链可变区或轻链可变区或甚至于仅仅恒定区来定义多核苷酸,但本申请并没有提供满足 PCT 条约第 6 条的支持或满足 PCT 条约第 5 条的公开的所要求的产品,而这些产品的效果是本领域技术人员无法预期的。这种不符合实质性的规定到了无法对这些权利要求所要求的主题作出有意义检索的程度。

续：A. 主题的分类

C07K16/28 (2006.01) i

C12N15/13 (2006.01) i

C07K17/08 (2006.01) i

A61K39/395 (2006.01) i

A61K39/44 (2006.01) i

A61P19/10 (2006.01) i