



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103720587 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201310467313. 3

(22) 申请日 2009. 02. 05

(30) 优先权数据

61/065, 065 2008. 02. 07 US

(62) 分案原申请数据

200980112516. 2 2009. 02. 05

(71) 申请人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 R. 邦克 M. 尤 A. 惠恩克

M. 帕利托 M. 里奇 N. 斯塔克豪斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61J 1/05(2006. 01)

A61M 5/178(2006. 01)

权利要求书2页 说明书47页

序列表7页 附图9页

(54) 发明名称

稳定化的蛋白组合物

(57) 摘要

本发明提供 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在容器中的稳定化组合物。并提供制备和使用该组合物的方法。

1. 一种装有包含特异性结合剂的组合物的预充式注射器,其中该组合物与注射器封口之间的顶空为:

- (a) 介于 2.5 mm 到 3.0 mm 之间;
- (b) 介于 2.0 mm 到 2.5 mm 之间;
- (c) 介于 1.5 mm 到 2.0 mm 之间;或
- (d) 介于 1.0 mm 到 1.5 mm 之间,

并且其中该预充式注射器中所包含的该特异性结合剂为稳定化的,
其中该特异性结合剂为抑制 RANKL 与 RANK 结合的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该抗体选自多克隆抗体、单克隆抗体、其中重链与轻链被柔性连接子连接的抗体、Fv 分子、最多体、抗原结合片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 分子、完全人类抗体、人源化抗体和嵌合抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该抗体为 α RANKL-1,其中 α RANKL-1 包括重链和轻链,其中该重链含有 SEQ ID NO:2 的可变区和恒定区,并且该轻链含有 SEQ ID NO:4 的可变区和恒定区。

4. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该抗体为 α RANKL-1,其中 α RANKL-1 包括重链和轻链,其中该重链含有 SEQ ID NO:2 的可变区,并且该轻链含有 SEQ ID NO:4 的可变区。

5. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该组合物还包含至少

- (a) 一种另外的药剂;或
- (b) 一种稳定剂和缓冲剂。

6. 根据权利要求 5 所述的预充式注射器,其中该至少一种稳定剂为表面活性剂。

7. 根据权利要求 6 所述的预充式注射器,其中该表面活性剂选自聚山梨酯和聚氧丙烯-聚氧乙烯酯。

8. 根据权利要求 7 所述的预充式注射器,其中该表面活性剂为聚山梨酯。

9. 根据权利要求 8 所述的预充式注射器,其中该聚山梨酯选自聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80。

10. 根据权利要求 6 所述的预充式注射器,其中该表面活性剂以 0.001% 至 1% 的浓度存在。

11. 根据权利要求 10 所述的预充式注射器,其中该表面活性剂以 0.002% 至 0.5% 的浓度存在。

12. 根据权利要求 11 所述的预充式注射器,其中该表面活性剂以 0.004% 或 0.01% 的浓度存在。

13. 根据权利要求 5 所述的预充式注射器,其中该组合物的 pH 值低于 6.6。

14. 根据权利要求 13 所述的预充式注射器,其中该组合物的 pH 值介于 5.5 和 6.5 之间。

15. 根据权利要求 14 所述的预充式注射器,其中该组合物的 pH 值为 6.3 或 5.2。

16. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该注射器包括含有硅酮的材料,其中该硅酮为交联的或烘烤的。

17. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该注射器不含硅酮,并且该注射器的封

口不含硅酮。

18. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该注射器包含高分子量塑料材料,其中该高分子量塑料材料不含硅酮。

19. 根据权利要求 18 所述的预充式注射器,其中该高分子量塑料材料包含环烯烃聚合物或环烯烃共聚物。

20. 根据权利要求 1 所述的预充式注射器,其中该特异性结合剂的浓度是 1 mg/ml 至 150 mg/ml。

21. 一种制备根据权利要求 1 — 20 中任一项所述的预充式注射器的方法,包括向注射器中引入根据权利要求 1 — 20 中任一项所述的包含特异性结合剂的组合物,以使该组合物与该注射器封口之间的顶空为:

- (a) 介于 2.5 mm 到 3.0 mm 之间;
- (b) 介于 2.0 mm 到 2.5 mm 之间;
- (c) 介于 1.5 mm 到 2.0 mm 之间;或
- (d) 介于 1.0 mm 到 1.5 mm 之间,

并且其中该预充式注射器所包含的该特异性结合剂被稳定化。

稳定化的蛋白组合物

[0001] 本申请为分案申请,本申请的原申请为申请日为 2009 年 2 月 5 日、申请号为 200980112516.2、发明名称为“稳定化的蛋白组合物”的申请。

[0002] 本申请要求 2008 年 2 月 7 日提交的第 61 / 065,065 号美国临时专利申请的优先权。第 61 / 065,065 号美国临时专利申请为了任何目的通过参考全文并入本文。

技术领域

[0003] 本发明提供 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在容器中的稳定化组合物。并提供制备和使用该组合物的方法。

背景技术

[0004] 某些治疗组合物包含特异性结合剂。在某些情况下,例如,为了储存和运输,治疗组合物被放置于容器中。在某些情况下,所述的容器与储存及运输条件、和给药模式相匹配,例如,包括但不限于皮下、肌肉或者静脉注射。某些典型容器包括但不限于安瓿、一次性使用注射器,其中包括但不限于用于预填充的一次性使用注射器、和玻璃或塑料制多剂量管型瓶。在某些情况下,治疗组合物被容纳于预充式注射器内,例如,制造商已将治疗组合物放置于注射器内。

[0005] 在某些情况下,当处于运输和 / 或储存条件下时,容器中的治疗组合物可形成颗粒和 / 或表现出聚集。所述表现形成颗粒和 / 或聚集的组合物,在某些情况下,不适合用于给药而必须被丢弃。在某些情况下,期望提供在容器中稳定化的治疗组合物,使之在处于运输和 / 或储存条件下时不易形成颗粒和 / 或聚集。

[0006] 发明概述

[0007] 在某些实施方案中,提供装有包含特异性结合剂的组合物的预充式注射器,其中将该预充式注射器中所包含的特异性结合剂为稳定化的。

[0008] 在某些实施方案中,提供装有包含特异性结合剂的组合物的预充式注射器,其中该组合物与注射器封口之间的顶空被最小化,并且其中该预充式注射器中所包含的特异性结合剂为稳定化的。

[0009] 一种制备预充式注射器的方法,该方法包括向注射器中引入包含特异性结合剂的组合物以使该组合物与注射器封口之间的顶空最小,并且其中该预充式注射器中所包含的特异性结合剂被稳定化。

[0010] 在某些实施方案中,提供一种用于稳定组合物中特异性结合剂的方法,其中该组合物装在预充式注射器中,该方法包括将该组合物放置到该预充式注射器中以使该组合物与注射器封口之间的顶空最小,并且其中该预充式注射器中所包含的特异性结合剂被稳定化。

[0011] 附图简述

[0012] 图 1 显示 α RANKL-1 组合物在不同蛋白浓度下,于 4°C 在试管中培养 24 个月,并于各时间点由非变性 SEC-HPLC 根据实施例 1 所述方案分析的稳定性。(A) 主峰百分比 (单

体) ; (B) 聚集体百分比 (前峰)。

[0013] 图 2 显示静态条件下, α RANKL-1 组合物在不同蛋白浓度下, 于 4°C 在预充式路厄锁玻璃注射器或预充式玻璃押针式注射器中培养 24 周, 并在各时间点由非变性 SEC-HPLC 根据实施例 1 所述方案分析的稳定性。

[0014] 图 3 显示 α RANKL-1 组合物在不含聚山梨酯的制剂中, 于 COP 塑料 (Resin CZ[®]) 预充式注射器中, 在静态条件或运输后, 在 4°C 培养 4 周、10 周、22 周、32 周或者 52 周, 并于各时间点由非变性 SEC-HPLC 根据实施例 1 所述方案分析的主峰百分比 (单体)。

[0015] 图 4 显示 sTNFR:Fc 样品的粒度分布。该图以强度加权粒度显示 sTNFR:Fc 样品经过根据实施例 2 中所述方案的各种预填充和运输条件后的显微镜下可见粒度。

[0016] 图 5 (A) 为押针式注射器及该注射器组件的示意图 ; 图 5 (B) 为预充式注射器, 显示顶空没有被最小化的示意图。

[0017] 图 6 所示为根据实施例 2 所述方案的包括包含 α RANKL-1 的组合物和顶空、或最小化的顶空的预充式注射器 ; (A) 顶空没有被最小化, 所示顶空为 4.5mm ; (B) 所示为最小化顶空 (左侧) : 带有弯液面的 1.5mm 最小化顶空 ; 和 (右侧) : 带有一个可见气泡的最小化顶空。

[0018] 图 7 所示为编码 α RANKL-1 抗体重链的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :1)。本图显示该重链表达质粒中从 Hind III 位点到 Sal I 位点的 DNA 序列。起始密码子开始于核苷酸 14, 终止密码子开始于核苷酸 1415。

[0019] 图 8 所示为 α RANKL-1 抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。IgG2 信号肽以下划线标出, 可变区以大写字母表示且不使用下划线, 而恒定区以小写字母表示。

[0020] 图 9 所示为编码 α RANKL-1 抗体 kappa 轻链的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :3)。本图所示为该 kappa 链表达质粒从 Xba I 位点到 Sal I 位点的 DNA 序列。起始密码子开始于核苷酸 12 ; 终止密码子开始于核苷酸 717。

[0021] 图 10 所示为 α RANKL-1 抗体 kappa 轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)。Kappa 信号肽以下划线标出, 可变区以大写字母表示且不使用下划线, 而恒定区以小写字母表示。

[0022] 某些实施方案的详述

[0023] 本节标题在本文仅用于组织目的, 并不用于限制本节讨论的主题。所有在本申请中所引用的文件或部分文件, 包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和专著, 在此为了任何目的通过参考全文明确地并入本文。当通过参考而并入的一个或多个文件或部分文件对某个术语的定义与本申请不符时, 以本申请为准。

[0024] 重组 DNA, 寡聚核苷酸合成, 以及组织培养和转化 (例如电穿孔和脂质体转染) 可使用常规技术。酶反应及纯化技术可根据制造商的说明书, 或根据本领域通常实行的, 或根据本文所述进行。前述技术和实验方案可基本上根据本领域已知常规方法并根据本说明书所引用并叙述的各种一般性或更具体的参考文献的描述进行。参见例如, Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (分子克隆实验手册) (第 2 版 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。除非提供具体定义, 否则本申请中所述分析化学、有机合成化学、以及医药与制药化学, 均使用本领域已知并常用的术语以及实验步骤和技术。化合物合成, 化合物分析, 药物配备, 配制, 递送和患者治疗均可使用常规技术。

[0025] 在本申请中,除非另外指明,否则单数名词的使用均涵盖其复数意义。在本申请中,除非另外指明,否则单词“一(“a”或者“an”)”意为“至少一个”。在本申请中,除非另外指明,否则“或(or)”意为“和/或(and/or)”。在多项从属权利要求的上下文中,“或”仅以替代的方式指代前述多于一项的独立或从属权利要求。此外,使用术语“包括(including)”及其其他形式例如包括(“includes”)和包括(“included”)不是限制。另外,除非另外具体指明,否则比如“元素(element)”或者“成分(component)”等术语涉及包括一个单位的元素或成分和包括多于一个单位的元素或成分二者。

[0026] NF- κ B 受体激活子配体(RANKL),又称为骨保护素配体(OPGL),是细胞因子肿瘤坏死因子(TNF)家族中的一员,通过与其受体RANK相结合而促进破骨细胞生成。在某些情况下,破骨细胞的活性增加与许多骨质减少病症相关,所述骨质减少病症包括但不限于绝经后骨质疏松、佩吉特氏症、溶解性骨转移(lytic bone metastases)和类风湿性关节炎。由此可见,RANKL的活性降低可能会导致破骨细胞的活性降低并可减轻骨质减少病症的严重程度。已描述了RANKL的某些特异性结合剂,包括但不限于抗体。参见例如,2004年2月19日公开的第2004/0033535号美国专利公布,其为了任何目的通过参考并入本文。

[0027] 白细胞介素-1(IL-1)是一种与炎症反应相关的细胞因子。在某些情况下,TNF通过与包含两种跨膜蛋白构成的异二聚受体复合体相互作用而刺激细胞反应,此两种跨膜蛋白为IL-1受体类型I(IL-1R1)和IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)。据报导,IL-1首先与IL-1R1结合;然后IL-1RAcP被募集到该复合体(Greenfeder等,1995, J. Biol. Chem. 270:13757-13765;Yoon和Dinarello,1998, J. Immunology 160:3170-3179;Cullinan等人,1998, J. Immunology 161:5614-5620),随后是导致引起细胞反应的信号传导。据假定,在某些情况下,通过抑制IL-1与IL-1受体(例如IL-1R1)结合从而阻止IL-1信号传导可在治疗上用于治疗某些IL-1介导的疾病。在某些情况下,IL-1R1特异性结合剂抑制IL-1与IL-1受体结合。已描述了某些IL-1R1特异性结合剂,包括但不限于抗体。参见例如,2004年5月20日公开的第2004/0097712号美国专利公布,其为了任何目的通过参考并入本文。

[0028] 肿瘤坏死因子- α (TNF α ,又称为恶液质素)和肿瘤坏死因子- β (TNF β ,又称为淋巴毒素)是能够在多种细胞类型中引起广泛作用的同源哺乳动物内分泌蛋白。结构和功能特征上的显著相似性使得这两种细胞因子统称为“TNF”。编码TNF α (Pennica等, Nature 312:724,1984)和TNF β (Gray等, Nature 312:724,1984)的互补cDNA克隆已被分离,从而允许对TNF的结构和生物学的进一步表征。

[0029] 在某些情况下,TNF蛋白通过与在对TNF反应性的细胞的质膜上表达的特异性TNF受体(TNF-R)蛋白的结合来引发对细胞的生物效应。除了TNF的细胞表面受体,人类尿液中也鉴定了能够与TNF结合的可溶性蛋白(Peetre等, Eur. J. Haematol. 41:414, 1988;Seckinger等, J. Exp. Med. 167:1511,1988;Seckinger等, J. Biol. Chem. 264:11966, 1989;Seckinger等的公开第2218101A号英国专利申请;Engelmann等, J. Biol. Chem. 264:11974,1989)。此外,已描述某些TNF特异性结合剂和某些TNF-R特异性结合剂,包括但不限于多肽、可溶性多肽(包括但不限于可溶性融合多肽)和抗体。参见例如, Mohler等, J. Immunol. 151:1548-1561,1993;第5,945,397号美国专利,其为了任何目的通过参考并入本文。

[0030] 某些定义

[0031] 根据本公开内容使用以下术语时,除非另外指明,否则应理解为如下意义。

[0032] 术语“NF- κ B 受体激活子配体”或“RANKL”指通过与 NF- κ B 的受体激活子 (“RANK”) 结合而促进破骨细胞生成的多肽。RANKL 又称作“骨保护素配体”或者“OPGL”。术语“RANKL”包括 RANKL 的片段、和相关多肽,其包括但不限于等位变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体、和 / 或插入变体、融合多肽,以及种间同源物。在某些实施方案中,RANKL 多肽包括末端残基,例如,包括但不限于前导序列残基、靶标残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和 / 或融合蛋白残基。

[0033] 术语“白细胞介素 -1 受体类型 1”或“IL-1R1”指为称为白细胞介素 -1 (“IL-1”) 的炎症细胞因子激发的跨膜受体的多肽。术语“IL-1R1”包括 IL-1R1 的片段、和相关多肽,其包括但不限于等位变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体、和 / 或插入变体、融合多肽、和种间同源物。在某些实施方案中,IL-1R1 多肽包括末端残基,例如,包括但不限于前导序列残基、靶标残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和 / 或融合蛋白残基。

[0034] 术语“TNF 受体”或“TNF-R”指具有天然哺乳动物 TNF 受体的氨基酸序列的多肽或其片段、和相关多肽,其包括但不限于等位变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体、和 / 或插入变体、融合多肽、和种间同源物。已描述了某些确定 TNF-R 生物活性的典型方法和测定,如在第 5,945,397 号美国专利,和 Mohler 等, J Immunol. 151:1548-1561 (1993) 中。在某些实施方案中,TNF 受体包括末端残基,例如但不限于前导序列残基、靶标残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和 / 或融合蛋白残基。TNF-R 能够与 TNF 配体结合。在某些实施方案中,TNF 配体通过与细胞结合引发 TNF-R 传导的生物信号。在某些实施方案中,TNF-R 能够与通过天然 (也就是说,非重组) 来源的 TNF-R 产生的抗 TNF-R 抗体结合。成熟的全长人类 TNF-R 为分子量大约 80 千道尔顿 (kDa) 的糖蛋白。术语“TNF 受体”或“TNF-R”包括但不限于具有至少 20 个氨基酸并且显示出至少一些与 TNF-R 相同的生物活性的天然多肽的变体或亚基,例如,不含跨膜区 (并从细胞中分泌出来) 但是保持了与 TNF 相结合的能力的可溶性 TNF-R 构建物。多种典型 TNF-R,包括可溶性 TNF-R,公开在例如第 5,945,396 号美国专利,和 Mohler 等, J Immunol. 151:1548-1561 (1993) 中。天然人类 TNF-R 公开在例如第 5,945,397 号美国专利,以及 Smith 等, Science248:1019-1023 (1990), Loetscher 等, Cell61:351-359 (1990) 和 Schall 等, Cell61:361-370 (1990) 中。

[0035] 术语“可溶性 TNF-R”或“sTNF-R”指具有对应于全部或部分天然 TNF-R 胞外区的氨基酸序列的多肽,例如,包括但不限于 huTNF-R Δ 235、huTNF-R Δ 185 和 huTNF-R Δ 163,或者天然人类 TNF-R 氨基酸 1-163、氨基酸 1-185、或氨基酸 1-235 的变体,其生物活性表现为与 TNF 配体结合,如 Smith 等在 Science248:1019-1023 (1990) 中所述的。在某些实施方案中,sTNF-R 是依那西普。依那西普是一种含有连接人类 IgG 抗体 Fc 片段的 p75sTNF-R 的胞外结构域的重组融合蛋白。依那西普的氨基酸序列公布于 Clinical Pharmacology and Therapeutics66 (2):209,1999,其通过参考并入本文,且该蛋白以商业名称 **Enbrel[®]** (Amgen Inc.) 出售。

[0036] 依照对蛋白质命名的惯例对 TNF-R 和 sTNF-R 命名 (如 TNF-R),在蛋白质的前面加上 hu (代表人类) 或者 mu (代表鼠),并后缀以 Δ (表明缺失) 和 C-末端的氨基酸数。例

如, huTNF-R Δ 235 指以 Asp²³⁵ 作为 C-端氨基酸的人类 TNF-R (例如, Smith 等在 Science 248 : 1019-1023 (1990) 中所述的具有天然人类 TNF-R 的氨基酸序列 1-235 的多肽)。当没有指明任何人类或鼠物种的时候, TNF-R 一般性的指哺乳动物 TNF-R。类似的, 在没有任何特别指明缺失突变体的时候, 术语 TNF-R 指所有形式的 TNF-R, 包括具有 TNF-R 生物活性的各种变体。某些典型 TNF-R 包括与上述序列相差一个或多个取代、缺失、或插入, 并保留了与 TNF 结合能力, 或保留了通过细胞表面结合的 TNF 受体蛋白抑制 TNF 信号传导活性的能力的多肽, 例如 HuTNF-R Δ x, 其中 x 选自如 Smith 等在 Science 248 : 1019-1023 (1990) 中所述的天然人类 TNF-R 的氨基酸 163-235 中任一个。在某些实施方案中, 对鼠 TNF-R (“muTNF-R”) 进行类似缺失。在某些实施方案中, TNF 信号传导活性的抑制决定于用重组 TNF-R DNA 对细胞进行转染以获得重组受体表达。在此实施方案中, 接着将被转染的细胞与 TNF 接触, 并检测所得代谢反应。如果所测代谢反应结果可归因于配体的作用, 则此重组受体具有信号传导活性。已公开某些用于确定多肽是否具有信号传导活性的典型方案, 例如 Idzerda 等, J. Exp. Med. 171 : 861 (1990) ; Curtis 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3045 (1989) ; Prywes 等, EMBO J. 5 : 2179 (1986) 和 Chou 等, J. Biol. Chem. 262 : 1842 (1987)。可选地, 在某些实施方案中, 使用表达内源性 TNF 受体并具有可测量的 TNF 生物反应的原代细胞或细胞系。

[0037] 当与氨基酸序列一起使用的时候, 术语“包括”表示化合物在给定序列的 N 端或 C 端的任一端或两端可包括额外的氨基酸。

[0038] 当涉及到多肽的时候, 如果被连接的两段或多段多肽中每一段多肽都能以其预期方式发挥功能, 这两段或多段多肽被称为“可操作连接”。如果一段多肽在与另一多肽可操作连接时能以其预期方式发挥功能, 当其不与另一多肽可操作性连接时, 该多肽可能或可能不以其预期方式发挥功能。例如, 在某些实施方案中, 第一多肽在没有连接时可能不能以其预期方式发挥功能, 但是当其与第二多肽连接时达到稳定化, 以使变得能够以其预期方式发挥功能。可选地, 在某些实施方案中, 第一多肽在没有连接时可能以其预期方式发挥功能, 并在当与第二多肽可操作连接时保留了这种能力。

[0039] 在本文中, 当两段或多段多肽以一个单独连续多肽序列被转录或被合成的时候, 这两段或多段多肽被称为“融合”。在某些实施方案中, 两段或多段融合多肽可能由两段或多段可操作连接的多核苷酸编码序列在体内翻译而成。在某些实施方案中, 两段或多段融合多肽可能由两段或多段可操作连接的多核苷酸编码序列在体外翻译而成。

[0040] 在本文中, 当每段被连接的多肽能够以其预期方式发挥功能时, 这两段或多段多肽被称为“可操作融合”。

[0041] 在某些实施方案中, 如果第一多肽含有两段或多段不同的多肽单位, 只要第一多肽中的至少一段不同的多肽单位与第二多肽连接, 所述第一多肽即被视为与第二多肽连接。

[0042] 在某些实施方案中, “第一多肽与第二多肽连接”的表达方式涵盖以下情况 : 其中 (a) 第一多肽中只有一个分子与第二多肽中的仅一个分子连接 ; (b) 第一多肽中只有一个分子与第二多肽中的多于一个分子连接 ; (c) 第一多肽中有多于一个分子与第二多肽中的仅一个分子连接 ; 和 (d) 一段多肽中有多于一个分子与第二多肽中多于一个分子连接。在某些实施方案中, 当被连接的分子中包括第一多肽中多于一个的分子和第二多肽中仅一个分子时, 第一多肽中的所述分子可能全部或部分以共价或非共价的方式与第二多肽连接。

在某些实施方案中,当被连接的分子中包括第一多肽中多于一个分子时,其中第一多肽的一个或多个分子可能以共价或非共价的方式与第一多肽中的其他分子连接。

[0043] 在本文中,“柔性连接子”指本领域技术人员无法根据其化学结构预测固定在三维空间中的任何连接子。在某些实施方案中,包括三个或多个氨基酸的肽连接子为柔性连接子。

[0044] 当涉及到多肽的时候,当第一多肽与一段或多段多肽融合,可操作融合,连接,和/或可操作连接的时候,此两段或多段多肽被称为“附加”在一起。

[0045] 术语“特异性结合剂”用以指与靶标特异性结合的天然或非天然的分子。特异性结合剂的实例包括但不限于蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂类和小分子化合物。在某些实施方案中,特异性结合剂为免疫球蛋白。在某些实施方案中,特异性结合剂为免疫球蛋白片段。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗体。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗原结合区。

[0046] 术语“RANKL 特异性结合剂”指特异性结合于 RANKL 任何部分的特异性结合剂。在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂为免疫球蛋白。在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂为免疫球蛋白片段。在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂为 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗原结合区。

[0047] 术语“IL-1R1 特异性结合剂”指特异性结合于 IL-1R1 任何部分的特异性结合剂。在某些实施方案中,IL-1R1 特异性结合剂为免疫球蛋白。在某些实施方案中,IL-1R1 特异性结合剂为免疫球蛋白片段。在某些实施方案中,IL-1R1 特异性结合剂为 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗原结合区。

[0048] 术语“TNF 特异性结合剂”指特异性结合于 TNF 任何部分的特异性结合剂。在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为多肽。在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为可溶性多肽。在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为可操作地融合第二多肽的可溶性多肽,其中第二多肽不是 TNF 特异性结合剂。例如,所述第二多肽包括但不限于 Fc 和 Fc 片段。在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为免疫球蛋白。在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为免疫球蛋白片段。在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为 TNF 的抗体。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗原结合区。

[0049] 术语“TNF-R 特异性结合剂”指特异性结合于 TNF-R 任何部分的特异性结合剂。在某些实施方案中,TNF-R 特异性结合剂为免疫球蛋白。在某些实施方案中,TNF-R 特异性结合剂为免疫球蛋白片段。在某些实施方案中,TNF-R 特异性结合剂为 TNF-R 的抗体。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗原结合区。

[0050] 术语“特异性结合”指特异性结合剂以比与非靶标结合更高的亲和性与靶标结合的能力。在某些实施方案中,特异性结合指以比非靶标结合高至少 10、50、100、250、500 或 1000 倍的亲和性与靶标结合。在某些实施方案中,亲和性由 ELISA 测定法确定。在某些实施方案中,亲和性由 **BIAcore**[®] 测定法确定。在某些实施方案中,亲和性由动力学方法确定。在某些实施方案中,亲和性由均衡溶液方法 (equilibrium / solution method) 确定。

[0051] 术语“靶标”指能够被特异性结合剂结合的分子或分子的一部分。在某些实施方案中,靶标可能有一个或多个表位。在某些实施方案中,靶标为抗原。

[0052] 术语“表位”指能够被特异性结合剂结合的分子的一部分。典型表位可包括任何

能够与免疫球蛋白和 / 或 T 细胞受体特异性结合的多肽决定簇。典型表位决定簇包括但不限于具有化学活性的分子表面群集,例如,但不限于,氨基酸、糖侧链、磷酸基和磺酰基。在某些实施方案中,表位决定簇可能具有特定三维结构特征、和 / 或特定电荷特征。在某些实施方案中,表位是被抗体结合的抗原区。表位可以是连续或不连续的。在某些实施方案中,当表位包含与用来生成抗体的表位相似的三维结构,但不包含,或者只包含用于生成抗体的表位中一部分氨基酸残基的时候,所述表位称之为模拟的。

[0053] “抗体”或“抗体肽”均指完整抗体、或其片段。在某些实施方案中,所述片段包括完整抗体的连续的几个部分。在某些实施方案中,所述片段包括完整抗体的不连续的几部分。在某些实施方案中,抗体片段可以是与完整抗体相竞争进行特异性结合的结合片段。术语“抗体”还涵盖多克隆抗体和单克隆抗体。在某些实施方案中,结合片段由重组 DNA 技术产生。在某些实施方案中,结合片段由酶切割或化学切割完整抗体产生。结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab)2、Fv、scFv、最多体 (maxbodies) 和单链抗体。非抗原结合片段包括但不限于 Fc 片段。

[0054] 术语“多克隆抗体”指与同一抗原上不同表位结合的异源混合抗体。

[0055] 术语“单克隆抗体”指一系列由同一个核酸分子编码的抗体。在某些实施方案中,单克隆抗体由单独的杂交瘤或其他细胞系,或由转基因动物产生。单克隆抗体通常识别同一个表位。术语“单克隆”不限制任何用来生成抗体的具体方法。

[0056] “嵌合抗体”指第一种物种的抗体可变区融合于另一分子,比如另一第二种物种抗体恒定区的抗体。参见例如第 4,816,567 号美国专利,和 Morrison 等,Proc Natl Acad Sci (USA),81:6851-6855 (1985)。在某些实施方案中,所述第一种物种可能有别于第二种物种。在某些实施方案中,所述第一种物种可能与第二种物种相同。在某些实施方案中,嵌合抗体是 CDR 嫁接抗体。

[0057] 术语“CDR 嫁接抗体”指其中一个抗体的 CDR 插入到另一个抗体的框架中的抗体。在某些实施方案中,CDR 所来源的抗体与框架所来源的抗体来自于不同物种。在某些实施方案中,CDR 所来源的抗体与框架所来源的抗体来自于不同的同种型。

[0058] 术语“多特异性抗体”指含有两个或多个与不同表位结合的可变区的抗体。所述表位可能在相同或不同靶标上。在某些实施方案中,多特异性抗体是“双特异性抗体”,识别相同或不同抗原上两个不同的表位。

[0059] 术语“催化抗体”指附有一个或多个催化部分的抗体。在某些实施方案中,催化抗体为细胞毒性抗体,其中包含细胞毒性部分。

[0060] 术语“人源化抗体”指全部或部分抗体框架来源于人类,但是一个或多个 CDR 区的全部或部分来源于其他物种(比如,包括但不限于小鼠)的抗体。

[0061] 术语“完全人类抗体”指其中 CDR 与框架均大体上由人类序列构成的抗体。在某些实施方案中,完全人类抗体由非人类哺乳动物产生,包括但不限于小鼠、大鼠和兔类。在某些实施方案中,完全人类抗体由杂交瘤细胞生成。在某些实施方案中,完全人类抗体由重组产生。

[0062] 术语“重链”包括具有足够的可变区序列以赋予对靶标的特异性的任何多肽。全长重链包括一个可变区结构域 V_H , 和三个恒定区结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。所述 V_H 结构域位于该多肽的氨基末端,而所述 C_{H3} 结构域位于羧基末端。本文所用术语“重链”包含全长重链

及其片段。

[0063] 术语“轻链”包括具有足够的可变区序列以赋予对靶标的特异性的任何多肽。全长轻链包括一个可变区结构域 V_L ，和一个恒定区结构域 C_L 。如同重链一样，轻链的可变区结构域位于该多肽的氨基末端。本文所用术语“轻链”包括全长轻链及其片段。

[0064] 术语“Fab 片段”指含有一条轻链和一条重链的 C_H1 和可变区的抗体。该 Fab 片段的轻链不能与另一个重链形成二硫键。在某些实施方案中，该 Fab 片段的轻链与另一 Fab 片段的轻链形成二硫键。

[0065] 术语“Fab' 片段”指含有一条轻链、一条重链的 C_H1 区和可变区、以及位于重链中 C_H1 和 C_H2 结构域之间的一些恒定域的抗体。在某些实施方案中，Fab' 片段的两条重链之间可形成链间二硫键从而形成 $F(ab')_2$ 分子。

[0066] 术语“ $F(ab')_2$ 分子”指由两段 Fab' 片段组成的抗体，并且所述两段 Fab' 片段以两条重链间形成的链间二硫键相连接。

[0067] “Fv 分子”包含重链和轻链的可变区，但是缺乏恒定区。单链可变片段 (scFv) 包括一条重链和一条轻链的可变区，其中，所述重链与轻链可变区融合以形成单独的多肽链，并形成抗原结合区。在某些实施方案中，scFv 包括单独多肽链。单链抗体包括 scFv。在某些实施方案中，单链抗体包括一个或多个融合于 scFv 的额外多肽。典型额外多肽包括但不限于一个或多个恒定区。典型单链抗体已被探讨在，例如 W088 / 01649 以及第 4,946,778 号和第 5,260,203 号的美国专利。

[0068] 术语“最多体”指融合（可能通过连接子或者直接附加）于 Fc 或 Fc 片段的 scFc。在某些实施方案中，单链抗体为最多体。在某些实施方案中，单链抗体为结合于 HGF 的最多体。典型 Ig-样结构域 -Fc 融合体于第 6,117,655 号美国专利中公布。

[0069] “Fc 片段”包含重链的 C_H2 和 C_H3 结构域，并含有位于 C_H1 和 C_H2 结构域之间的一些恒定区，由此两条重链之间可形成链间二硫键。

[0070] 术语“可变区”和“可变结构域”在本文可交换使用，用以指抗体的轻链和 / 或重链的一部分。在多种情况下，可变结构域包括重链中大约氨基端的 120-130 个氨基酸和轻链中氨基端的约 100-110 个氨基酸。在某些实施方案中，即使在同物种抗体中，不同抗体的可变区的氨基酸序列大有不同。在多种情况下，抗体的可变区决定该抗体对靶标的特异性。

[0071] 术语“抗原结合片段”指包含免疫球蛋白重链的至少一个可变结构域和免疫球蛋白轻链的至少一个可变结构域的多肽片段。在某些实施方案中，抗原结合片段能够与配体结合，从而阻止该配体与其受体结合，由此干扰由该配体与受体结合所引发的生物反应。在某些实施方案中，抗原结合片段能够与受体结合，从而阻止该配体与其受体结合，由此干扰由配体与该受体结合所引发的生物反应。在某些实施方案中，抗原结合片段能够与受体结合并激活该受体。在某些实施方案中，抗原结合片段能够与受体结合并灭活该受体。

[0072] 当对于某物体使用术语“自然产生”时，指该物体可以在自然界中被发现。例如，存在于有机体（包括病毒）中，可从自然来源分离且未被实验室中人为修饰或以其它方式修饰的多肽或多核苷酸序列是自然产生的。

[0073] 术语“分离的多核苷酸”指源于基因组、cDNA、或者合成、或上述一些组合的多核苷酸，因其来源，该“分离的多核苷酸”：(1) 不与自然界中发现含有该“分离的多核苷酸”的多核苷酸的全部或部分相关，(2) 与在自然界中不连接的多核苷酸连接，或 (3) 不是自然界

中更长序列的一部分。

[0074] 术语“可操作连接”指以允许其以预期方式发挥功能而关联的组分。例如，涉及到多核苷酸序列的时候，当调控序列与编码序列彼此相连接使得该编码序列能在与调控序列功能相容的条件下进行表达时，该调控序列即称为与该编码序列“可操作性连接”。

[0075] 术语“调控序列”指可影响相联系的编码序列的表达与加工的多核苷酸序列。所述调控序列的性质可根据其宿主生物体而不同。某些典型的原核调控序列包括但不限于启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。某些典型的真核调控序列包括但不限于启动子、增强子和转录终止序列。在某些实施方案中，“调控序列”可包括前导序列和 / 或融合伴侣序列。

[0076] 术语“分离的多肽”和“分离的肽”指任何多肽，其 (1) 不包含至少一些在正常情况下会包含的一些蛋白，(2) 本质上不含有同一起来源例如，同一物种的其他蛋白，(3) 在不同物种的细胞中表达，或 (4) 在自然界中不存在。

[0077] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可交换使用，用于指两个或多个氨基酸相互以肽键或修饰过的肽键连接的多聚体，例如，肽等排体。前述术语用于含有天然形成的氨基酸的氨基酸多聚体和含有一个或多个非天然形成氨基酸或天然形成氨基酸的化学类似物的氨基酸多聚体。氨基酸多聚体可能含有一个或多个被一种或多种天然加工（例如翻译后加工）修饰过的氨基酸残基，和 / 或一个或多个被一种或多种本领域已知的化学修饰技术修饰过的氨基酸残基。

[0078] 在本文中，二十种常规氨基酸及其简写依照惯例。参见例如 Immunology—A Synthesis (免疫学—合成) (第二版, E. S. Golub 和 D. R. Gren 编著, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))。在某些实施方案中，一种或多种非常规氨基酸可被并入多肽。术语“非常规氨基酸”指任何不属于二十种常规氨基酸的氨基酸。术语“非天然生成氨基酸”指自然界没有的氨基酸。非天然形成的氨基酸是非常规氨基酸的一个子集。非常规氨基酸包括但是不限于，二十种常规氨基酸的立体异构体（例如，D-氨基酸）、非天然氨基酸，例如 α -， α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、高丝氨酸、高半胱氨酸、4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N, N, N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸、和本领域已知的其他相似的氨基酸和亚氨基酸（例如，4-羟基脯氨酸）。在本文中所使用的多肽标记法中，左手方向是氨基末端方向，而右手方向是羧基末端方向，与惯用和常规标准一致。

[0079] 参考多肽的“片段”，指来自参考多肽中任何一部分的连续氨基酸段。片段可为小于参考多肽长度的任意长度。

[0080] 参考多肽的“变体”指相对于参考多肽含有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入的多肽。在某些实施方案中，参考多肽的变体具有改变了的翻译后修饰位点（例如，糖基化位点）。在某些实施方案中，参考多肽的变体具有改变了的二硫键连接。在某些实施方案中，参考多肽及其变体均为特异性结合剂。在某些实施方案中，参考多肽及其变体均为抗体。

[0081] 参考多肽的变体包括但不限于糖基化变体。糖基化变体包括相对于参考多肽其糖基化位点的数目或类型被改变的变体。在某些实施方案中，参考多肽的糖基化变体包括相对参考多肽含有更多或更少数目的 N-连接糖基化位点的变体。在某些实施方案中，N-连接糖基化位点以序列 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 为特征，其中，以 X 表示的氨基酸残基可为除

脯氨酸以外的任何氨基酸残基。在某些实施方案中,参考多肽的糖基化变体包括 N- 连接碳水化合物链的重排,其中一个或多个 N- 连接糖基化位点(尤其是天然形成的糖基化位点)被缺失并生成一个或多个新的 N- 连接位点。

[0082] 参考多肽的变体包括但不限于半胱氨酸变体。在某些实施方案中,半胱氨酸变体包括参考多肽中一个或多个半胱氨酸由一个或多个非半胱氨酸残基取代的变体;和/或参考多肽中一个或多个非半胱氨酸由一个或多个半胱氨酸残基取代的变体。在某些实施方案中,当特定多肽必须被重折叠成为具有生物活性的构象时,例如在分离不可溶包涵体后,半胱氨酸变体可以是有用的。在某些实施方案中,参考多肽的半胱氨酸变体包含相对参考多肽较少的半胱氨酸残基。在某些实施方案中,参考多肽的半胱氨酸变体包含偶数的半胱氨酸从而使得不配对半胱氨酸的相互作用最小。在某些实施方案中,半胱氨酸变体比天然蛋白含有更多半胱氨酸残基。

[0083] 在某些实施方案中,对特定抗体的重链和轻链进行保守性修饰(以及对其编码核苷酸进行相应修饰)将会产生功能和化学性质与原抗体相类似的抗体。相反,在某些实施方案中,对特定抗体在功能上和/或化学性质上进行大致修饰可如下列所述实现:选择在重链和轻链氨基酸序列中对保持以下方面具有显著不同作用的取代:(a) 所取代区的分子主链结构,例如,折叠或螺旋状构象,(b) 该分子在靶标位点的电荷或疏水性,或(c) 大部分支链。

[0084] 某些期望氨基酸取代(无论保守或非保守)可在需要所述取代时由本领域技术人员决定。在某些实施方案中,氨基酸取代可用于鉴定特定抗体的重要残基,比如可增加或减少抗体亲和性或抗体效应子作用的残基。

[0085] 在某些实施方案中,抗体的效应可由测量疾病症状的量的减少来进行评估。在某些实施方案中,感兴趣的疾病可能由病原体引起。在某些实施方案中,疾病可在动物宿主中以其他方法建立,包括引入某种物质(比如致癌物)和遗传操纵。在某些实施方案中,抗体的效应可由检测动物宿主中一种或多种副反应来进行评估。术语“副反应”包括但不限于出现在接受了抗体的动物宿主中但没有出现在未接受该抗体的动物宿主中的有害反应。在某些实施方案中,副反应包括但不限于发烧、对抗体的免疫反应、炎症、和/或动物宿主的死亡。

[0086] 抗原的多种特异性抗体可由多种方法产生。在某些实施方案中,含有感兴趣表位的抗原可被引入动物宿主(例如小鼠),从而产生对该表位有特异性的抗体。在某些情况下,对感兴趣表位特异性的抗体可从自然暴露于该表位的宿主的生物样品中获得。在某些情况下,在小鼠中引入内源 Ig 基因已被灭活的人源免疫球蛋白(Ig)基因座可提供获取人类单克隆抗体(MAb)的机会。

[0087] 术语“剂”在此用于标示化学化合物、化学化合物混合物、生物分子、生物大分子或生物物质提取物。

[0088] 术语“稳定剂”指在组合物中使特异性结合剂稳定的剂。如果相较不含稳定剂的组合物,在含有稳定剂的组合物中特异性结合剂保留了更多的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性,则该特异性结合剂被视为已在组合物中“被稳定化”。

[0089] 当特异性结合剂处在容器中,例如注射器中包含的组合物中时,如果该特异性结合剂在经历以下文件所述的一种或多种模拟运输条件的实验测试后,仍保留至少相同或

相似的物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物活性,则该特异性结合剂已“被稳定化”: Singh, J., S. P. Singh 和 G. Burgess, Measurement and Analysis of US Truck Vibration for Leaf Spring and Air Ride Suspensions and Development of Test Tests(测量与分析美国 Leaf Spring 货车震动和悬空挂置系统与测试的开发), Packaging Technology and Science, 第 19 卷, 2006; International Safe Transit Association (ISTA) Resource Book 2006, Test Procedure 3A(国际安全运输协会 (ISTA) 教学资源书 2006, 测试步骤 3A); Singn, S. P. 和 J. Marcondes, “Vibration Levels in Commercial Truck Shipments as a Function of Suspension and Payload(商业货车运输中的震动水平是悬挂和有效负荷的函数)”, Journal of Testing and Evaluation, ASTM, 第 20 卷, 第 6 号, 466-469, 1992; Kipp, William I., Vibration Testing Equivalence, How Many Hours Of Testing Equals How Many Miles Of Transport?(震动测试等值, 多少小时的测试等同于多少英里的运输?) ISTA 2000 会议学报); Rouillard, V., A New Approach to Analyzing and Simulating Shock and Vibration, Proceedings of Dimensions 06(一种用于分析和模拟碰撞和震动的新方法), 国际安全运输协会 06 会议学报, East Lansing, MI 48823, 2006; Singh, S. P., G. Burgess 和 P. Rojuckarin, “Test Protocol for Simulating Truck and Rail Vibration and Rail Impacts in Shipments of Automotive Engine Racks(模拟货车和火车震动的测试程序以及火车对机动车引擎架的运输的影响)”, Packaging Technology and Science, 第 8 卷, 33-41, 1995; Brandenburg 和 Lee. (2001). Fundamentals of Packaging Dynamics(包装动力学基础) L. A. B. Equipment Inc. : Skaneateles, NY; 和 Singh, S. P., G. Burgess, Marcondes, Jorge A., and Antle, John R., “Measuring the Package Shipping Environment in Refrigerated Ocean Vessels(测量在冷藏越洋船上的包装运输环境)”, Packaging Technology and Science, 第 6 卷, 175-181, 1993。如果特异性结合剂在经历至少一种测试后, 仍保留至少相同或相似的物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物活性, 即使其中一个或多个特性未保留, 则该被放置于容器中的组合物中的特异性结合剂仍被视为已“被稳定化”。在某些实施方案中, 所述实验测试包括震动、碰撞 / 坠落、和 / 或压力改变以模拟航空和 / 或陆地运输。所述实验测试还包括一个对照组, 其中容器中包含的该特异性结合剂不经历震动、碰撞 / 坠落、和 / 或压力改变。经历震动、碰撞 / 坠落、和 / 或压力改变以模拟航空和 / 或陆地运输后, 确定该特异性结合剂的物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物活性并与对照组的物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物活性相比较。在某些实施方案中, 如果特异性结合剂适于作为用于人类的药物, 则该特异性结合剂被认为保留了至少相同或相似的物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物活性。

[0090] 当使用稳定剂时, 短语“保留其物理稳定性”意为: 相比于不含稳定剂的组合物, 含有稳定剂的组合物中的特异性结合剂表现出较少的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性。短语“保留其物理稳定性”也意为: 经历过第 84 段所述的模拟运输条件的一种或多种实验测试后, 被放置于某一类型容器(例如, 注射器)内的组合物中的特异性结合剂表现出相同或相似或较少的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性。如果特异性结合剂在经历至少一种测试后, 即使其中一种或多种特性不相同或相似或较少, 但特异性结合剂表现出相同或相似或较少的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性, 则该被放置于容器内的组合物中的特异性结合剂被视为保留了其物理稳定性。在某些实施方案中, 放置于某一类型容器内(例如, 注射器)的组合物, 在经历

了模拟运输条件的实验测试,随后静态条件下的储存之后,与放置于同样类型容器中,在静态条件下储存但不经历模拟运输条件的实验测试的组合物中的特异性结合剂相比,表现出相同或相似较少的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,随后储存于温度介于 2°C 和 8°C 之间的静态条件下。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,储存于温度介于 15°C 和 45°C 之间的静态条件下。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物未经模拟运输条件的实验测试,于静态条件下储存于温度介于 -20°C 和 -80°C 之间的冷冻柜。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,在静态条件下储存至少 1 个月到至少 24 个月。典型储存期包括但不限于至少 1 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、和至少 24 个月。典型的确定特异性结合剂的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性量的方法,包括但不限于目测;通过光透法对显微镜下可见颗粒计数,例如,使用 HIAC (Royco) 仪器;显微镜颗粒计数;分子筛高效液相层析法 (SEC-HPLC),和 SDS-PAGE。当使用上述至少一种方法确定时,如果特异性结合剂表现出相同或相似或较少的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性,即使其中一种或多种特性不是相同或相似或较少,则放置于容器内的组合物中的该特异性结合剂被视为保留了其物理稳定性。在某些实施方案中,如果特异性结合剂适于作为用于人类的药物,则该特异性结合剂被认为显示了相同或相似或较少的聚集和 / 或沉淀和 / 或变性。

[0091] 当使用稳定剂时,短语“保留其化学稳定性”意为:相比于不含稳定剂的组合物,含有稳定剂的组合物中的特异性结合剂表现出较少的化学变化。短语“保留其化学稳定性”也意为:经历过第 84 段所述的模拟运输条件的一种或多种实验测试后,放置于某一类型容器(例如,注射器)内的组合物中的特异性结合剂表现出相同或类似或较少的化学变化。化学变化的实例包括但不限于大小改变,例如,包括但不限于剪切 (clipping)。剪切指切割特异性结合剂以得到更小片段。在某些实施方案中,剪切是蛋白水解的结果。化学变化的实例包括但不限于电荷改变,例如包括但不限于脱酰胺作用。化学变化的实例包括但不限于亲水 / 疏水改变,例如包括但不限于氧化作用。化学变化的实例包括但不限于异构化。如果特异性结合剂在经历至少一种测试后,即使其中一种或多种化学变化不是相同或相似或较少,但特异性结合剂表现出相同或相似或较少的任何类型的化学变化,则该放置于容器内的组合物中的特异性结合剂被视为保留了其化学稳定性。在某些实施方案中,放置于某一类型容器内(例如,注射器)的组合物,在经历了模拟运输条件的实验测试,随后静态条件下的储存之后,与放置于同样类型容器中,在静态条件下储存但不经历模拟运输条件的实验测试的组合物中的特异性结合剂相比,表现出相同或相似或较少的化学变化。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,储存于温度介于 2°C 和 8°C 之间的静态条件下。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,储存于温度介于 15°C 和 45°C 之间的静态条件下。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物未经模拟运输条件的实验测试,于静态条件下储存于温度介于 -20°C 和 -80°C 之间的冷冻柜。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,在静态条件下储存至少 1 个月到至少 24 个月。典型储存期包括但不限于至少 1 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、和至少 24 个月。典型的确定特异性结合剂的化学变化量的方法,包括但不限于阳离子交换 -HPLC、反

相-HPLC、SDS-PAGE、和肽图谱。当使用上述至少一种方法确定时,如果特异性结合剂表现出相同或相似或较少的化学变化,即使其中一种或多种化学变化不是相同或相似或较少,则放置于容器内的组合物中的该特异性结合剂被视为保留了其化学稳定性。在某些实施方案中,如果特异性结合剂适于作为用于人类的药物,则该特异性结合剂被认为显示了相同或相似或较少的化学变化。

[0092] 当使用稳定剂时,短语“保留其生物活性”意为:相比于不含稳定剂的组合物,含有稳定剂的组合物中的特异性结合剂在组合物制备后的指定时间表现出更高生物活性。短语“保留其生物活性”也意为:在经历过第 84 段所述的模拟运输条件的一种或多种实验测试后,放置于某一类型容器(例如,注射器)内的组合物中的特异性结合剂在组合物制备后的给定时间表现出相同或类似的生物活性。如果特异性结合剂在经历至少一种测试后,即使其中一个或多个类型的生物活性在组合物制备后的给定时间不是相同或相似,但特异性结合剂在组合物制备后的给定时间表现出相同或相似的任何类型的生物活性,则该放置于容器内的组合物中的特异性结合剂被视为保留了其生物活性。在某些实施方案中,放置于某一类型容器内(例如,注射器)的组合物,在经历了模拟运输条件的实验测试,随后静态条件下的储存之后,与放置于同样类型容器中,在静态条件下储存但不经历模拟运输条件的实验测试的组合物中的特异性结合剂相比,在组合物制备后的给定时间表现出相同或相似生物活性。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,储存于温度介于 2°C 和 8°C 之间的静态条件下。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,储存于温度介于 15°C 和 45°C 之间的静态条件下。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物未经历模拟运输条件的实验测试,于静态条件下储存于温度介于 -20°C 和 -80°C 之间的冷冻柜。在某些实施方案中,放置于容器中的组合物经历模拟运输条件的实验测试后,在静态条件下储存至少 1 个月到至少 24 个月。典型储存期包括但不限于至少 1 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、和至少 24 个月。在某些实施方案中,生物活性由合适的确定生物活性的测定确定。典型的确定特异性结合剂的生物活性的测定包括但不限于抗原结合测定和受体磷酸化测定。典型的抗原结合测定包括但不限于 ELISA 测定、免疫沉淀测定和亲和性测定,例如,包括但不限于 **BIAcore**[®] 测定。某些典型的用于确定 RANKL 特异性结合剂的生物活性的方法和测定已描述在,例如公开于 2004 年 2 月 19 日的第 2004 / 0033535 号美国专利公布。某些典型的用于确定 IL-1R1 特异性结合剂的生物活性的方法和测定已描述在,例如公开于 2004 年 5 月 20 日的第 2004 / 0097712 号美国专利公布。某些典型的用于确定 TNF 特异性结合剂和 TNF-R 特异性结合剂的生物活性的方法和测定已描述在,例如第 5,945,397 号美国专利。当使用至少一种测定确定时,如果特异性结合剂在组合物制备后给定时间表现出至少相同或相似的任何类型的生物活性,即使如一种或多种测定确定的,其中一种或多种类型的生物活性在组合物制备后给定时间不是相同或相似,则放置于容器内的组合物中的该特异性结合剂被视为保留了其生物活性。在某些实施方案中,如果特异性结合剂适于作为用于人类的药物,则该特异性结合剂被认为在组合物制备后的给定时间显示了至少相同或相似的生物活性。

[0093] 在某些实施方案中,生物活性的 TNF 受体能够以每 nmol 受体上结合多于 0.1nmol TNF 的比例结合。在某些实施方案中,生物活性的 TNF 受体在标准结合测定中,能够以每

nmol 受体结合多于 0.5nmolTNF 的比例结合。某些典型的用于确定 TNF 和 TNF-R 结合的结合测定和方法已描述在,例如第 5,945,397 号美国专利中。

[0094] “聚集”指个体蛋白分子通过共价或非共价作用形成多聚体。聚集也指颗粒的形成。颗粒也为肉眼可见或显微镜可见。显微镜可见颗粒的粒度在 $2\mu\text{M}$ 与 $100\mu\text{M}$ 之间。肉眼可见颗粒的粒度大于 $100\mu\text{M}$ 。聚集可为可逆或不可逆的。在某些情况下,当失去三级结构或者发生部分解折叠的时候,通常情况下隐藏在折叠蛋白结构中的疏水氨基酸残基被暴露于溶液。在某些情况下,上述变化促进个体蛋白分子间的疏水-疏水相互作用,导致聚集。例如,Srisailam 等人,在 J Am Chem Soc124(9):1884-8(2002) 中已确定,蛋白的某些构象变化伴随着聚集,并且特定蛋白的某些区域可被鉴定为特别对聚集体的形成负责。在某些情况下,蛋白聚集可由加热(Sun 等人, J Agric Food Chem50(6):1636-42(2002))、有机溶剂(Srisailam 等人,同上),和试剂比如 SDS 和溶血磷脂(Hagihara 等人, Biochem41(3):1020-6(2002)) 引发。在体外蛋白纯化和配制中,聚集可能成为一个严重问题。在某些情况下,聚集体形成后,需要以强变性剂溶解后进行复性和正确的再折叠以恢复其生物活性。

[0095] “变性”指多肽三维结构的改变。多肽的三维结构包括但不限于二级结构和三级结构。二级结构指多肽中一部分的局部构象。某些典型的二级结构包括但不限于, α 螺旋; β 构象、 β 折叠、和 β 转角。三级结构指多肽中原子的整体三维排列。在某些情况下,三级结构包括线性序列上相隔很远的氨基酸之间的相互作用。在某些情况下,三维结构的改变致使多肽部分或全部解折叠。在某些情况下,三维结构的改变足以引起多肽全部或部分功能丧失。在某些具体情况下,将多肽暴露于以下一种或多种条件可引起变性:加热;极端 pH 值;有机溶剂,包括但不限于醇类和酮类;去垢剂,包括但不限于 SDS;和离液试剂,包括但不限于尿素和盐酸胍。在某些情况下,将多肽暴露于容器表面可引起多肽变性,例如,包括但不限于由玻璃、不锈钢、聚碳酸酯、聚四氟乙烯(Teflon[®])、聚氨酯、硅酮、聚氯乙烯、乙烯醋酸乙烯酯、聚酯、和聚烯烃制成的容器。在某些情况下,将多肽暴露于容器封口表面可引起多肽变性,例如,包括但不限于由硅酮、丁基橡胶、氟碳、和钨制成的容器封口。在某些情况下,将多肽暴露于界面可引起多肽变性,例如,包括但不限于气态/液态界面、冰/液态界面、和气态/油界面。在某些情况下,通过将多肽暴露于有机溶剂、脲和去垢剂导致多肽中疏水相互作用的破坏,使得某些多肽(例如球蛋白)变性。在某些情况下,通过将多肽暴露于例如极端 pH 值,导致多肽净电荷的改变,从而引起多肽内的静电斥力和某些氢键断裂,使得多肽变性。

[0096] 术语“运输(shipping、ships 或 shipped)”指将容器中的组合物使用汽车、飞机、和/或船只,按照任何路径,经过任何距离,和在任何温度下进行运输。

[0097] 短语“于静态条件下储存”,或“静态储存条件”指将容器中的组合物放置于一个地点,不进行运输。

[0098] 术语“顶空”指容器中液体与容器封口之间的空间。参见如图 5(B) 和图 6(A) 及 6(B) 所示。在某些实施方案中,顶空的大小使容器中的液体形成可用肉眼或光学显微镜观察到的弯液面。在本文中,“弯液面”指容器中液体上表面的凹面。当该容器处于垂直(直立)位置时,弯液面横跨容器的直径,并且液体不接触容器封口的底部表面。在某些实施方案中,顶空是弯液面顶部与容器封口的底部表面(例如,柱塞中间的扁平部分)之间的距离。在某些实施方案中,顶空的大小使容器中的液体不形成弯页面,但是其大小使容器内液

体形成可用肉眼或光学显微镜观察到的气泡。本文中,当该容器处于垂直位置时,“气泡”不能横跨容器的直径,并且有一些但是不是全部液体接触容器封口的底部表面。在某些实施方案中,气泡是球形的。在某些所述的实施方案中,顶空为气泡的直径。在某些实施方案中,气泡不是球形的。在某些所述的实施方案中,顶空为椭圆形。在某些所述的实施方案中,顶空为气泡的最长直径。在某些实施方案中,顶空由卡尺测量。在某些所述的实施方案中,10× 放大镜和认证并校准过的卡尺一起使用。一种典型卡尺是 Mitutoyo Series500, MCN number900-GI-222。在某些实施方案中,顶空由显微镜和显微镜尺来测量。在某些所述的实施方案中,卡尺用于记录弯液面顶部与柱塞的底部扁平体之间的距离。在某些实施方案中,预填充并塞住的注射器顶空由光学比较器测量。典型的光学比较器是 Deltronic DH216,水平光学比较器 (Horizontal Optical Comparator)。在某些所述的实施方案中,将注射器垂直放置与光学透镜平行来进行测量。将放大的图像投影到屏幕上用以检查。光学比较器上的卡尺用于记录弯液面顶部与柱塞的底部扁平体之间的距离。在某些实施方案中,顶空是弯液面顶部与柱塞底部扁平体之间以毫米计的距离。

[0099] 在本文中,当如第 90 段和以下实施例 2 所述使用卡尺和 / 或显微镜的测量方法测量顶空为 3.0mm 或更小时,该顶空即为“最小化”。如果至少有一种测量方法测量顶空为 3.0mm 或更小时,即使有一种或多种方法测量得到大于 3.0mm,该顶空仍被认为“最小化”。某些典型的最小化顶空测量值包括但不限于 2.7mm 或更小、或 2.5mm 或更小、或 2mm 或更小、或 1.5mm 或更小、或 1mm 或更小、或 0.5mm 或更小、或 0.2mm 或更小、或 0.1mm 或更小,或无法检测的顶空。在某些实施方案中,最小化的顶空测量值在 2.5mm 和 3.0mm 之间、或 2.0mm 和 2.5mm 之间、或 1.5mm 和 2.0mm 之间、或 1.0mm 和 1.5mm 之间。参见如图 6(B) 所示。在某些实施方案中,当顶空不能用本文所述卡尺和 / 或显微镜测量方法进行测量时,顶空为最小化。在某些上述实施方案中,不存在肉眼或光学显微镜下可见的弯液面。在某些上述实施方案中,不存在肉眼或光学显微镜下可见的气泡。

[0100] “容器封口”指容器或容器配件中覆盖或密封容器的部分。在某些实施方案中,容器封口保持 (hold) 容器内的组合物。在某些实施方案中,容器封口可防止微生物入侵。典型容器封口包括但不限于帽、盖、柱塞 (plunger) 和塞 (stopper)。

[0101] “预充式注射器”指组合物 (例如治疗组合物) 的容器,其中,该容器为注射器,该组合物在向患者给药之前被放置于该注射器中,并且该注射器以注射器封口覆盖,所述封口包括但不限于柱塞。在某些实施方案中,该组合物在生产填充厂家中被放置于注射器中。在某些实施方案中,在放置组合物于注射器中之前将注射器洗涤和灭菌。在某些实施方案中,预充式注射器在将组合物向患者给药之前装有该组合物至少 1 天、或至少 7 天、或至少 14 天、或至少 1 个月、或至少 6 个月、至少 1 年、或至少 2 年。在某些实施方案中,预充式注射器经历储存和 / 或运输条件。

[0102] 术语“硅酮”指由一种基于结构单位 R_2SiO 的半无机多聚体构成的润滑剂,其中 R 为有机基团。在某些实施方案中,硅酮为聚二甲基硅氧烷,又称为硅油。在某些实施方案中,注射器针筒的内表面、注射器柱塞表面、和 / 或注射器针头表面均以硅酮涂层。在某些实施方案中,其他类型的容器和 / 或容器封口,包括但不限于活栓 (stopcock),以硅酮涂层。某些典型聚二甲基硅氧烷包括但不限于 Dow Corning® 360 医药用液 (Dow Corning®

360medical fluid), 例如包括但不限于, 具有 350 厘沱粘度的 Dow **Corning**[®] 360 医药用液、具有 1000 厘沱粘度的 Dow **Corning**[®] 360 医药用液、具有 12,500 厘沱粘度的 Dow **Corning**[®] 360 医药用液、和 Dow **Corning**[®] MDX4-4159 液。在某些实施方案中, 硅油被喷涂到表面上。在某些实施方案中, 硅油被涂抹到表面上。在某些实施方案中, 硅油是烘烤的 (baked)。在某些实施方案中, 硅油是交联的。

[0103] “润滑剂”指一种施加于表面层, 用来减少活动部分间摩擦的材料。某些典型润滑剂包括但不限于硅酮、聚四氟乙烯 (**Teflon**[®]) 和 **TriboGlide**[®] (TriboFilm Research, Inc., Raleigh, NC)。某些典型的塞涂层包括但不限于 Omniflex (Helvoet Pharma, Inc., Pennsauken, NJ)、Nanoskin (Helvovet 塞 [配方 FM457] 上的等离子体覆盖的全氟聚醚 [PFPE], 产自 TriboFilm, Raleigh, NC)、和 **Flurotec**[®] (Daikyo Seiko, Ltd., Sumida-Ku, Tokyo)。

[0104] 术语“烘烤的硅酮”指将硅酮施加于例如, 包括但不限于注射器的容器之后, 进行热处理以增进硅酮与容器表面的结合。

[0105] 术语“交联的硅酮”指已被交联处理的可交联硅油。可交联硅油包括但不限于带有反应性或功能性化学基团以使得该油可被交联的硅油。典型商业可得的可交联硅油包括但不限于 Dow **Corning**[®] MDX4-4159。典型交联处理包括但不限于辐射处理, 例如包括但不限于暴露于电子、x-射线、或 γ 射线源; 和在电离等离子体中处理, 例如包括但不限于氧等离子体。

[0106] 术语“无硅酮材料”和“缺少硅酮材料”指其中没有加入硅酮来涂层表面的用于生产容器或容器封口的材料。在某些实施方案中, 用一种或多个以下测试确定硅酮含量不可检测: 将材料暴露于将提取硅酮的溶剂中, 并用下述方法检测硅酮: (1) 电感耦合等离子体 (ICP) 试验与质谱联合 (ICP-MS)、与原子发射光谱联合 (ICP-AES)、或与原子吸收联合 (ICP-AA), 如下列文献所述: Kennan JJ, Breen LL, Lane TH, Taylor RB., Methods for detecting silicones in biological matrixes (在生物基质中检测硅酮的方法), Analytical Chemistry, 71(15):3054-60, 1999; Mundry T, Surmann P, Schurreit T., Trace analysis of silicone oil in aqueous parenteral formulation and glass containers by graphite furnace atomic absorption spectrometry (用石墨管原子吸收光谱对液态肠胃外制剂进行硅油的痕量分析), Drugs made in Germany, 第 44 卷, 第 2 期, 47-56, 2001; Carter, J., L. Ebdon, 和 E. H. Evans, Speciation of silicon and phosphorous using liquid chromatography coupled with sector field high resolution ICP-MS (使用连接扇形场高分辨率 ICP-MS 的液态层析进行硅及磷的检测 (speciation)), Microchemical Journal, 2004, 76(1-2): p. 35-41; 或 Klemens P, Heumann KG., Development of an ICP-HRIDMS method for accurate determination of traces of silicon in biological and clinical samples (一种用于在生物和临床样品中准确确定痕量硅的 ICP-HRIDMS 方法的开发), Fresenius J Anal Chem, 371:758-763, 2001; 或者 (2) 使用傅立叶变换红外线 (FTIR) 光谱试验, 如下列文献所述: Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds (使用光谱鉴定有机化

合物),第5版,1991;或者 Güngel, H., Menceoglu, Yildiz, B., Akbulut, O., Fourier Transform Infrared And ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Findings Of Silicone Oil Removed From Eyes And The Relationship Of Emulsification With Retinotomy And Glaucoma(使用傅立叶变换红外线和 ^1H 核磁共振光谱的发现:如何从眼睛里去除硅油,以及乳化与视网膜切开术和青光眼的关系),The Journal Of Retinal And Vitreous Diseases,第25卷, No3, 332-338, 2005。即使在一种或多种其它测试中可检测到,但是当在至少一种上述测试中检测不到硅的时候,硅被认为是不可检测的。

[0107] 术语“无润滑剂材料”和“缺少润滑剂材料”指没有加入润滑剂来涂层表面的用于生产容器或容器封口的材料。在某些实施方案中,用一种或多种以下测试确定润滑剂含量不可检测:将材料暴露于将提取润滑剂的溶剂中,并用下述方法检测润滑剂:(1) 电感耦合等离子体(ICP) 试验与质谱联合(ICP-MS)、与原子发射光谱联合(ICP-AES)、或与原子吸收联合(ICP-AA),如下列文献所述: Kennan JJ, Breen LL, Lane TH, Taylor RB., 在生物基质中检测硅酮的方法(Methods for detecting silicones in biological matrixes), Analytical Chemistry, 71(15):3054-60, 1999; Mundry T, Surmann P, Schurreit T., Trace analysis of silicone oil in aqueous parenteral formulation and glass containers by graphite furnace atomic absorption spectrometry(用石墨管原子吸收光谱对液态肠胃外制剂进行硅油的痕量分析), Drugs made in Germany, 第44卷, 第2期, 47-56, 2001; Carter, J., L. Ebdon, 和 E. H. Evans, Speciation of silicon and phosphorous using liquid chromatography coupled with sector field high resolution ICP-MS(使用连接扇形场高分辨率 ICP-MS 的液态层析进行硅和磷的检测(speciation)), Microchemical Journal, 2004, 76(1-2): p. 35-41; 或 Klemens P, Heumann KG., Development of an ICP-HRIDMS method for accurate determination of traces of silicon in biological and clinical samples(一种用于在生物和临床样品中准确确定痕量硅的 ICP-HRIDMS 方法的开发), Fresenius J Anal Chem, 371:758-763, 2001;或者(2) 使用傅立叶变换红外光谱(FTIR) 光谱试验,如下列文献所述: Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds(使用光谱鉴定有机化合物), 第5版, 1991;或者 Güngel, H., Menceoglu, Yildiz, B., Akbulut, O., Fourier Transform Infrared And ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Findings Of Silicone Oil Removed From Eyes And The Relationship Of Emulsification With Retinotomy And Glaucoma(使用傅立叶变换红外线和 ^1H 核磁共振光谱的发现:如何从眼睛里去除硅油,以及乳化与视网膜切开术和青光眼的关系),The Journal Of Retinal And Vitreous Diseases,第25卷, No3, 332-338, 2005。即使在一种或多种其它测试中可检测到,但是当在至少一种上述测试中检测不到润滑剂的时候,润滑剂被认为是不可检测的。

[0108] 术语“高分子量塑料材料”材料指具有至少 40,000 分子量的塑料材料。在某些实施方案中,高分子量塑料材料包括聚合的环化单体。某些典型高分子量塑料材料包括但不限于环化烯烃共聚体和环化烯烃多聚体。

[0109] “缓冲剂”或者“缓冲液”指用于维持组合物 pH 值在所需范围内的试剂。

[0110] 术语“骨质减少疾患”、“骨丢失(bone loss)”或者“骨丢失病症”包括但是不限于骨质疏松;包括但是不限于绝经后骨质疏松、内分泌骨质疏松(包括但是不限于甲状腺

机能亢奋症、甲状旁腺功能亢奋症、库欣氏综合症和肢端肥大症)、遗传和先天形式的骨质疏松(包括但不限于成骨不全、高胱氨酸尿、门克斯氏综合征和赖利-戴综合征);由四肢无法行动引起的骨质疏松;成人和青少年的佩吉特氏骨症(畸形性骨炎);骨髓炎,或一种骨内感染性病变,导致的骨丢失;由实体瘤(包括但不限于,乳房瘤、肺癌和肾瘤)导致的高钙血症和血液恶性肿瘤(包括但不限于多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病)、特发性高钙血症,和与甲状腺机能亢奋症和肾功能紊乱相关的高钙血症;手术后的骨质减少、与类固醇(例如糖皮质激素)的使用相关的骨质减少,和与大小肠功能紊乱和慢性肝肾疾病相关的骨质减少;与外伤或非外伤骨疽相关的骨坏死,或称骨细胞死亡;与贫血或炎症或自身免疫疾病,例如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎相关的骨丢失,以及牙周疾病。

[0111] 除骨丢失疾患以外,某些癌症,包括转移到骨或位于骨的癌症,已知可增加破骨细胞活性并引起骨再吸收。所述的癌症包括但不限于乳癌、前列腺癌和多发性骨髓瘤。在某些情况下,已知这些癌症可产生引起骨内 RANKL 过量表达的因子,从而导致破骨细胞数目和活性的增加。相应的,骨丢失病症包括但不限于乳癌、前列腺癌、和已转移到骨或能够转移到骨的实体瘤;多发性骨髓瘤;以及骨巨细胞瘤。其他骨丢失疾患包括但不限于化疗在转移性或非转移性癌症患者中引发的骨丢失,所述癌症包括但不限于乳癌和前列腺癌。在某些情况下,骨丢失发生于以例如但不限于佐剂芳香酶抑制剂的荷尔蒙消融治疗(hormone ablative therapy)期间。

[0112] 如果自然发生或者试验引发的疾病或病症与体液或组织中的 IL-1 水平升高相关,或如果从身体获取的细胞或组织在培养物中产生升高水平的 IL-1,该疾病或病症被视为“白细胞介素 1(IL-1)介导疾病”。IL-1 水平升高包括但不限于超过在特定细胞和组织中的正常水平;和在正常情况下不表达可检测水平的 IL-1 的细胞或组织中任何可检测水平的 IL-1。在某些情况下,以下一种或两种另外的情况也被认为是 IL-1 介导的疾病:(1)疾病或病症相关的病理结果与实验中被施用 IL-1 或由实验条件引起 IL-1 表达上调的动物相似;和(2)由实验动物疾病或病症模型引发的病理通过抑制 IL-1 作用的药剂处理而抑制或消除。在某些 IL-1 介导的疾病中,满足上述三种情况中的至少两种。在某些 IL-1 介导的疾病中,满足上述全部三种情况。

[0113] 典型的 IL-1 介导的急性和慢性疾病包括但不限于以下:急性胰腺炎;肌萎缩性侧索硬化症(ALS);阿尔茨海默氏病;恶病质/厌食,包括但不限于艾滋病(AIDS)引发的恶病质;哮喘和其他肺病;动脉粥样硬化;自身免疫性血管炎;慢性疲劳综合征;梭菌相关疾病,包括但不限于梭菌相关性腹泻;冠状动脉疾患和适应症,包括但不限于充血性心脏衰竭、冠状动脉再狭窄、心肌梗塞、心肌功能障碍(例如,与败血症相关)和冠状动脉旁路搭桥术;癌症,包括但不限于多发性骨髓瘤和骨髓性(如 AML 或 CML)和其他白血病,以及肿瘤转移;糖尿病(如胰岛素依赖型糖尿病);子宫内膜异位症;发烧;纤维肌痛;肾小球肾炎;移植抗宿主病/移植排斥反应;失血性休克;痛觉过敏;炎性肠道疾病;关节的炎性疾患,包括但不限于:骨关节炎、银屑病关节炎和类风湿性关节炎;炎性眼疾,如可能与例如,角膜移植相关的;局部缺血,包括脑缺血(例如,大脑由于外伤、癫痫、出血或中风造成的伤害,所述每种情况可能导致神经变性);川崎氏症;学习障碍;肺病(如 ARDS);多发性硬化症;肌病(如肌肉蛋白质代谢,尤其是在败血症中);神经毒性(例如,由 HIV 引起的神经毒性);骨质疏松;疼痛,包括但不限于癌症相关的疼痛;帕金森氏病;牙周疾病;早产;银屑病;再灌

注损伤；感染性休克；放疗副作用；颞下颌关节疾病；睡眠障碍；压力造成的葡萄膜炎和炎症疾患、扭伤、软骨损伤、创伤、整形外科手术、感染或其他疾病过程。

[0114] 如果天然发生或者试验引发的疾病或病症与体液或组织中的 TNF 水平升高相关，或如果从身体获取的细胞或组织在培养物中产生升高水平的 TNF，该疾病或病症被视为“TNF 介导疾病”。TNF 水平升高包括但不限于超过在特定细胞和组织中的正常水平；和在正常情况下不表达可检测水平的 TNF 的细胞或组织中任何可检测水平的 TNF。在某些情况下，以下一种或两种另外的情况也被认为是 TNF 介导的疾病：(1) 疾病或病症相关的病理结果与实验中被施用 TNF 或由实验条件引起 TNF 表达上调的动物相似；和 (2) 由实验动物疾病或病症模型引发的病理通过抑制 TNF 作用的药剂处理而抑制或消除。在某些 TNF 介导的疾病中，满足上述三种情况中的至少两种。在某些 TNF 介导的疾病中，满足上述全部三种情况。

[0115] 典型急性和慢性 TNF 介导的疾病包括但不限于恶病质、感染性休克、艾滋病、心脏病、自身免疫性疾病、和炎症性疾病，包括但不限于类风湿关节炎、银屑病关节炎、幼年型类风湿关节炎、强直性脊柱炎及斑块状牛皮癣。

[0116] 当过量的特异性结合剂使结合了配体的受体量减少至少大约 20%、40%、60%、80%、85% 或更多（如在体外竞争测定法中检测）时，该特异性结合剂被称为“大致上抑制了配体与受体的结合”。在某些实施方案中，特异性结合剂为抗体。在某些实施方案中，抗体大致上抑制 RANKL 与 RANK 的结合，或者大致上抑制 IL-1 与 IL-1R1 的结合。在某些实施方案中，特异性结合剂为可溶性融合多肽。在某些所述的实施方案中，可溶性融合多肽大致上抑制 TNF 与 TNF-R 的结合。

[0117] 术语“癌症”包括但不限于实体瘤和血液恶性肿瘤。典型癌症包括但不限于乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、神经胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、遗传和散发性乳头状肾癌、白血病、淋巴瘤、李弗劳梅尼综合征、恶性胸膜间皮瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、小细胞肺癌、滑膜肉瘤、甲状腺癌、巨细胞瘤，和膀胱移行细胞癌。

[0118] 本文所用术语“药剂或药品”指当适当地施用于患者时，能够引起所需治疗作用的化学化合物或组合物。在本文中，治疗作用可包括或不包括预防作用。

[0119] 本文所用术语“调制剂”为可以改变或转换分子活性或功能的化合物。例如，相比于不含调制剂的情况下观察到的活性或功能的量级，调制剂可引起以分子在某种活性或功能上的量级的增加或减少。在某些实施方案中，调制剂是抑制剂，引起分子在至少一种活性或功能上的量级的降低。某些典型的分子的活性和功能包括但不限于结合亲和性、酶活性和信号传导。某些典型的抑制剂包括但不限于蛋白、肽、抗体、肽体 (peptibodies)、碳水化合物或小的有机分子。肽体已描述在，例如第 6,660,843 号美国专利和第 W001 / 83525 号 PCT 公开中。

[0120] 在本文中，“大致纯”意为目标物质为存在的主导物质（例如，在摩尔基础上，组合物所含该物质比其他任何单独物质都更大量）。在某些实施方案中，大致纯的部分是其中在所有存在的大分子物质中含有目标物质至少约百分之五十（在摩尔基础上）的组合物。在某些实施方案中，大致纯的组合物占组合物中存在的所有大分子物质的超过约 80%、85%、90%、95% 或 99%。在某些实施方案中，目标物质被纯化到基本均质（使用常规检测方法无

法在组合物中检测出污染物质),其中该组合物基本上只由一种大分子物质组成。

[0121] 术语“患者”包括人类和动物受治疗者。

[0122] 某些典型特异性结合剂

[0123] 在某些情况下,TNF 由活化巨噬细胞和 T 细胞释放,在大量细胞类型中引发广泛的各种反应。在某些情况下,TNF 在调控正常免疫反应,以及各种病理和疾病状态中起作用。某些所述病理和疾病状态包括但不限于与败血症有关的全身毒性、艾滋病的发病机制、以及各种自体免疫和炎症疾病,包括但不限于类风湿关节炎、幼年型类风湿关节炎、强直性脊椎炎和斑块状银屑病。

[0124] 在某些情况下,TNF 蛋白通过与在 TNF 反应性细胞的质膜上表达的特异性 TNF 受体(TNF-R)蛋白结合而在细胞中引发生物反应。因此,在某些情况下,降低 TNF 介导的细胞反应可减轻哮喘、免疫、自身免疫、和 / 或炎症性疾患的严重度。根据某些实施方案,TNF 特异性结合剂用于治疗包括但不限于以上所述的免疫、自身免疫、和 / 或炎症性疾患。

[0125] 在某些实施方案中,TNF 的特异性结合蛋白为可溶性 TNF-R。在某些实施方案中,提供了编码可溶性 TNF-R 的核苷酸序列,和相应的氨基酸序列。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 选自 huTNF-R Δ 235、huTNF-R Δ 185 和 huTNF-R Δ 163。参见例如第 5,945,397 号美国专利。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 为单价的。单价可溶性 TNF-R 包含对 TNF 配体的一个 TNF-R 结合位点。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 为多价的。多价可溶性 TNF-R 包含对 TNF 配体的多个 TNF-R 结合位点。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 为二价的。在某些上述实施方案中,二价可溶性 TNF-R 包含由连接子区分隔的两个 huTNF-R Δ 235 的串联重复序列。在某些实施方案中,提供了能够与 TNF 结合的纯化人类可溶性 TNF-R。

[0126] 在某些实施方案中,TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF-R 融合多肽。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 融合多肽为多价的。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 融合多肽为二价的(也称为二聚的)。在某些实施方案中,可溶性 TNF-R 融合多肽包含融合于 Fc 的可溶性 TNF-R。

[0127] 某些典型可溶性 TNF-R 和可溶性 TNF-R 融合多肽以及其制备和使用方法已在美国专利第 5,945,397 号和 Mohler 等,J. Immunol. 151:1548-1561(1993) 中描述。在某些上述实施方案中,提供了纯化的可溶性人类 TNF-R 融合多肽。在某些上述实施方案中,纯化的可溶性人类 TNF-R 融合多肽为 sTNFR:Fc,如 Mohler 等,J. Immunol. 151:1548-1561(1993) 中所述,或为以商业名称 **Enbrel[®]** 出售的依那西普,如下述实施例中所所述。

[0128] 在某些情况下,RANKL 参与破骨细胞的形成。在某些情况下,RANKL 与受体 RANK 结合,从而增加破骨细胞活性。在某些情况下,破骨细胞活性的增加与某些骨质减少疾病有关,包括绝经后骨质疏松症、佩吉特氏病、溶解骨转移和类风湿关节炎。因此,在某些情况下,降低 RANKL 活性可能引起破骨细胞活性的降低并可能减轻骨质减少疾病的严重度。根据某些实施方案,RANKL 特异性结合剂用于治疗包括但不限于以上所述的骨质减少疾病。

[0129] 在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂为完全人类单克隆抗体。在某些实施方案中,提供了编码重链和轻链免疫球蛋白分子的核苷酸序列,和相应氨基酸序列,特别是可变区的相应序列。在某些实施方案中,提供了相应于互补决定区(CDR),特别是 CDR1 到 CDR3 的序列。根据某些实施方案,提供了表达所述免疫球蛋白分子的杂交瘤细胞系。根据某些实施方案,提供了表达所述单克隆抗体的杂交瘤细胞系。根据某些实施方案,提供了表达所

述单克隆抗体的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。在某些实施方案中,提供了针对人类 RANKL 的纯化人类单克隆抗体。

[0130] 某些典型 RANKL (又称为 OPGL) 抗体以及制备和使用所述抗体的方法已在公开于 2004 年 2 月 19 日的第 2004 / 0033535 号美国专利申请公布中描述。在某些上述实施方案中,提供了针对人类 RANKL 的纯化人类单克隆抗体。参见例如第 2004 / 003353 号美国专利申请公布。在某些上述实施方案中,针对人类 RANKL 的纯化人类单克隆抗体为 α RANKL-1, 如下述实施例中所述。

[0131] 在某些情况下,一种细胞因子 IL-1 参与了炎症反应。在某些情况下,IL-1 与受体 IL-1R1 结合,随后与 IL-1RAcP 结合。这些事件随后引起导致引发细胞反应的信号传导,在某些情况下,导致炎症。在某些情况下,炎症与由机械伤害导致的外伤、感染、或抗原刺激相关联。在某些情况下,炎症反应表现为病理反应。在某些情况下,当炎症以扩大的方式表现,或被不适当的刺激,或当导致受伤的物质清除后仍然持续时,发生上述病理疾患。典型的由 IL-1 介导的病理疾患包括但不限于类风湿关节炎和骨关节炎。因此,在某些情况下,IL-1 介导的信号传导活性的降低可导致引起炎症的细胞反应的减轻,从而减轻关节炎和其他免疫性疾病的严重度。根据某些实施方案,IL-1R1 特异性结合剂用于治疗包括但不限于以上所述的炎症性疾病。

[0132] 在某些实施方案中,IL-1R1 特异性结合剂为完全人类单克隆抗体。在某些实施方案中,提供了编码重链和轻链免疫球蛋白分子的核苷酸序列,和相应氨基酸序列,特别是可变区的相应序列。在某些实施方案中,提供了相应于互补决定区 (CDR),特别是 CDR1 到 CDR3 的序列。根据某些实施方案,提供了表达所述免疫球蛋白分子的杂交瘤细胞系。根据某些实施方案,提供了表达所述单克隆抗体的杂交瘤细胞系。根据某些实施方案,提供了表达所述单克隆抗体的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。在某些实施方案中,单克隆抗体选自 15C4、26F5 和 27F2 中的至少一个。在某些实施方案中,提供了针对人类 IL-1R1 的纯化人类单克隆抗体。

[0133] 某些典型 IL-1R1 抗体以及制备和使用所述抗体的方法已在公开于 2004 年 5 月 20 日的第 2004 / 0097712 号美国专利申请公布中描述。在某些上述实施方案中,提供了针对人类 IL-1R1 的纯化人类单克隆抗体。在某些上述实施方案中,针对人类 IL-1R1 的纯化人类单克隆抗体具有如美国专利申请公布号 2004 / 0097712 所示的轻链可变区 SEQ ID NO : 12 和重链可变区 SEQ ID NO :10 ;或者可选地如美国专利申请公布号 2004 / 0097712 所示的轻链可变区 SEQ ID NO :12 和重链可变区 SEQ ID NO :14 ;或者可选地如美国专利申请公布号 2004 / 0097712 所示的轻链可变区 SEQ ID NO :18 和重链可变区 SEQ ID NO :16。

[0134] 在某些实施方案中,针对人类 RANKL 的人类单克隆抗体或 / 和针对人类 IL-1R1 的人类单克隆抗体为完全人类单克隆抗体。某些完全人类单克隆抗体可从如下所述工程化的小鼠品系获得。人们可以大片段的人类 Ig 基因座改造小鼠抗体产生缺陷的小鼠品系,并预期所述小鼠将生成人类抗体而没有小鼠抗体。人源 Ig 大片段可保留大量的可变基因多样性以及适当的抗体生成和表达的调控。通过利用小鼠的抗体多样化和选择机制,以及对人类蛋白免疫耐受性的缺乏,在这些小鼠品系中所再生的人类抗体谱可产生对所感兴趣的任何抗原,包括人类抗原具有高亲和性的完全人类抗体。使用杂交瘤技术,可生成和选择具有所需特异性的抗原特异性人类 MAbs。某些典型方法已于 W098 / 24893、美国专利第

5, 545, 807 号、EP546073B1 和 EP546073A1 中描述。

[0135] 在某些实施方案中,人们可将来自非人类物种的恒定区与人类可变区一起使用。在某些实施方案中,人们可将来自人类的恒定区与来自非人类物种的可变区一起使用。

[0136] 某些典型抗体结构

[0137] 天然生成的抗体结构单位通常包括四聚体。每一个所述四聚体由两对相同的多肽链构成,每对多肽链具有一条全长轻链(在某些实施方案中,大约 25kDa)和一条全长重链(在某些实施方案中,大约 50-70kDa)。

[0138] 每条链的氨基末端部分通常包含约 100 到 110 或更多个氨基酸的可变区(在重链中是 V_H ,在轻链中是 V_L),该可变区通常负责识别抗原。每条链的羧基末端通常定义恒定区(在重链中是 C_H ,在轻链中是 C_L),该恒定区负责效应子功能。抗体效应子功能包括激活补体和刺激调理吞噬。人类轻链通常分类为 kappa 与 lamda 轻链。重链通常分类为 mu、delta、gamma、alpha 或 epsilon,并分别定义抗体的同型体为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。IgG 有多种亚类,包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgM 有包括但不限于 IgM1 和 IgM2 的亚类。IgA 也类似的分类为包括但不限于 IgA1 和 IgA2 的亚类。通常在全长轻链和重链中,可变区和恒定区由约 12 个或更多氨基酸的“J”区连接,在重链中还包括约 10 个或更多氨基酸的“D”区。参见例如 Fundamental Immunology(基础免疫学)第 7 章(Paul, w., 第二版. Raven Press, N. Y. (1989))。通常由每对轻/重链的可变区形成抗原结合位点。

[0139] 可变区通常表现出与相对保守并与三个高变区(也称为互补决定区或 CDR)连接的框架区(FR)相同的大体结构。每对重链和轻链的 CDR 通常和框架区对齐,从而使之可以与特定表位结合。从 N-末端到 C-末端,轻链和重链的可变区通常包括 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 结构域。每个结构域的氨基酸分配通常根据 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学上重要蛋白的序列)(National Institutes of Health(美国国立健康研究院), Bethesda, Md. (1987 和 1991))、或 Chothia&Lesk J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987); Chothia 等. Nature 342 :878-883(1989) 中的定义。

[0140] 如在以上“某些定义”一节中所讨论,存在多种类型的抗体片段。典型抗体片段包括但不限于 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 分子、Fv 分子、scFv、最多体和 Fc 片段。

[0141] 在某些实施方案中,功能结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和其间的序列可被改组以产生不同的抗体恒定区。例如,在某些实施方案中,可优化所述杂合恒定区在血清中的半衰期,抗体四聚体的组装和折叠,和/或增强效应子功能。在某些实施方案中,修饰过的抗体恒定区可由在恒定区氨基酸序列中引入单点突变,并测试所得抗体是否有性能上的提高(例如以上所列一项或多项的优化)而生成。

[0142] 在某些实施方案中,抗体的一种同种型通过同种型转换而转变成另一种同种型,并且不丢失其对特定靶标分子的特异性。同种型转换的方法包括但不限于直接重组技术(参见例如第 4,816,397 号美国专利)和细胞-细胞融合技术(参见例如第 5,916,771 号美国专利)等多种方法。在某些实施方案中,抗体可由以上技术或本领域已知的其它技术由一种亚类转变成另一种亚类,并且不丢失其对特定靶标分子的特异性,其中包括但不限于由 IgG2 亚类转变为 IgG1、IgG3、或 IgG4 亚类。

[0143] 某些双特异性或双功能抗体

[0144] 双特异性或双功能抗体通常是含有两对不同重/轻链和两个不同结合位点的人

造杂合抗体。双特异性抗体可由多种方法产生,包括但不限于杂交瘤融合或 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)。

[0145] 抗体的某些制备

[0146] 在某些实施方案中,抗体可在杂交瘤细胞系以外的细胞系中表达。在某些实施方案中,编码特定抗体,包括嵌合抗体的序列,可用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。根据某些实施方案,转化可为用任何已知方法将多核苷酸引入宿主细胞中,例如,包括将多核苷酸包被入病毒(或病毒载体中)并利用本领域已知的方案用该病毒转导受体细胞或转染载体,如第 4,399,216 号;第 4,912,040 号;第 4,740,461 号和第 4,959,455 号美国专利中所举例。

[0147] 在某些实施方案中,表达载体包含本文所讨论的一种或多种多核苷酸序列,包括但不限于编码一种或多种抗体的多核苷酸序列。在某些实施方案中,提供在包含以上所述任何表达载体的细胞中,并在适合表达其中所含多核苷酸的条件下生成多肽的多肽制备方法。

[0148] 在某些实施方案中,表达载体表达抗体重链。在某些实施方案中,表达载体表达抗体轻链。在某些实施方案中,表达载体表达抗体重链和抗体轻链。在某些实施方案中,提供包括在包含至少一种表达载体的细胞中,并在适合表达其中所含多核苷酸的条件下生成抗体的抗体制备方法。

[0149] 在某些实施方案中,所用转染方案可取决于将被转化的宿主。某些用于向哺乳动物细胞引入异源多核苷酸的方法是本领域已知的,包括但不限于葡聚糖介导的转染,磷酸钙沉淀,聚凝胺介导的转染,原生质体融合,电穿孔,在脂质体中封装多核苷酸,和直接微注射 DNA 进入细胞核。

[0150] 某些可作为表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域中已知的,包括但不限于可由美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的多种永生细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、E5 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人类肝细胞癌细胞(例如 Hep G2)、NS0 细胞、SP20 细胞、Per C6 细胞、293 细胞和多种其他细胞系。在某些实施方案中,可通过确定哪些细胞系具有高表达水平和产生具有本质抗原结合特性的抗体来选择细胞系。

[0151] 在某些实施方案中,可转染进入宿主细胞的载体包含可操作性连接于编码抗体的多核苷酸的调控序列。在某些实施方案中,调控序列促进所连接多核苷酸的表达,从而使得产生所连接的多核苷酸编码的多肽。在某些实施方案中,载体也包含允许在宿主细胞内不依赖染色体复制的多核苷酸序列。典型的载体包括但不限于质粒(例如 BlueScript、puc 等)、粘粒和 YACS。

[0152] 重组多肽的某些表达

[0153] 在某些实施方案中,重组表达载体用来扩增或表达编码多肽的 DNA,所述多肽例如包括但不限于 TNF-R。在某些实施方案中,重组表达载体为可复制的 DNA 构建体,所述构建体具有合成的或 cDNA 衍生的、编码哺乳动物 TNF-R 的 DNA 片段或生物等效类似物,所述 DNA 片段或生物等效类似物可操作地连接于衍生于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调控元件。多种适合表达编码多肽的合成或 cDNA 衍生的 DNA 片段的重组表

达载体是本领域技术人员熟知的。某些典型的重组表达载体于第 5,945,397 号美国专利中描述。

[0154] 在某些实施方案中,转化的宿主细胞是已被使用重组 DNA 技术构建的 TNF-R 载体转化或转染的细胞。转化的宿主细胞通常情况下表达 TNF-R,但是用于克隆或扩增 TNF-R DNA 的转化宿主细胞不需要表达 TNF-R。在某些实施方案中,根据所选的 TNF-R DNA,所表达的 TNF-R 将聚集在细胞膜,或被分泌进入培养上清液。用于表达哺乳动物 TNF-R 的典型宿主细胞包括但不限于原核细胞、酵母和高等真核细胞,其中 TNF-R 的表达被置于合适的启动子控制之下。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌 (*E. coli*) 或杆菌 (*bacilli*)。高等真核细胞包括但不限于已建立的来源于哺乳动物的细胞系。在某些实施方案中,也可使用无细胞翻译系统,由衍生于含有 TNF-R 的 DNA 构建体的 RNA 来产生哺乳动物 TNF-R。某些用于细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主的典型的克隆和表达载体在 Pouwels 等 (*Cloning Vectors :A Laboratory Manual* (克隆载体:实验室手册),Elsevier, N. Y., 1985) 中描述。

[0155] 在某些实施方案中,原核表达宿主用于表达 TNF-R。在某些实施方案中,原核表达载体通常包含一个或多个表型选择标记,例如编码赋予抗生素耐受性或提供营养缺陷要求的蛋白的基因,和能被宿主识别的复制来源以保证宿主内的扩增。用于转化的典型原核宿主包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*),和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 的菌种。各种原核表达载体及使用方法是本领域技术人员熟知的。某些原核表达载体在第 5,945,397 号美国专利中描述。

[0156] 在某些实施方案中,重组 TNF-R 蛋白在酵母宿主中表达,例如,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),和其他属的酵母,例如毕赤酵母属 (*Pichia*) 或克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)。各种酵母表达载体及使用方法是本领域技术人员熟知的。某些典型的酵母表达载体及其使用方法已于 R. Hitzeman 等,欧洲专利申请公布第 0073657 号,和 Sherman 等, *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (酵母遗传学方法的实验室课程手册), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986 中描述。

[0157] 在某些实施方案中,哺乳动物或昆虫细胞培养系统用于表达重组蛋白。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括但不限于 Gluzman (*Cell* 123 :175, 1981) 描述的猴肾细胞 COS-7 细胞系,和其他能够表达合适载体的细胞系,包括例如 L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO)、HeLa 和 BHK 细胞系。多种哺乳动物和昆虫细胞培养系统及使用方法是本领域技术人员熟知的。某些所述典型系统在第 5,945,397 号美国专利中描述。

[0158] 在某些实施方案中,含有 TNF-R cDNA 的重组表达载体被稳定的整合入宿主细胞的 DNA 中。在某些实施方案中,表达产物的水平升高通过选择具有扩大数目的载体 DNA 的细胞系来实现。在某些实施方案中,选择具有扩大数量的载体 DNA 的细胞系,例如,通过在宿主细胞中转化入含有编码被已知药物抑制的酶的 DNA 序列的载体。在某些实施方案中,该载体也包含编码所需蛋白 (例如 TNF-R) 的 DNA 序列。在某些实施方案中,该宿主细胞被包含编码所需蛋白 (例如 TNF-R) 的 DNA 序列的第二载体共转化。在某些实施方案中,该被转化或共转化的宿主细胞随后在增加浓度的已知药物中培养,从而筛选出可能含有扩大拷贝的

编码所述酶的载体以及宿主细胞 DNA 中编码所需蛋白 (TNF-R) 的载体 DNA 的耐药性细胞。

[0159] 某些典型的用于所述共同扩增的系统包括但不限于使用二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因,该酶可被药物甲氨蝶呤 (MTX) 抑制;和使用谷氨酰胺合成酶 (GS) 基因,该酶负责通过水解 ATP 生成 ADP 和磷酸盐来驱动反应以合成谷氨酸酯和氨。这些系统是本领域技术人员所熟知的。另外,该 GS 共同扩增系统、合适的重组表达载体和细胞系,已于以下 PCT 申请中描述:W087 / 04462、W089101036、W089 / 10404 和 W086 / 05807。

[0160] 在某些实施方案中,重组蛋白通过共同扩增 DHFR 或 GS 在哺乳动物宿主细胞中表达,例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞;或可选地在鼠骨髓瘤细胞系,例如 SP2 / 0-Ag14 或者 NS0;或者大鼠骨髓瘤细胞系,例如在 PCT 申请 WO / 89 / 10404 和 W086 / 0587 中公开的 YB2 / 3-Ag20。

[0161] 某些其他表达 TNF-R DNA 的真核载体,包括 pCAV / NOT 载体,已于第 5,945,397 号美国专利中描述。

[0162] 重组 TNF-R 的纯化

[0163] 在某些实施方案中,纯化的哺乳动物 TNF 受体或类似物的制备通过培养合适的宿主 / 载体系统来表达 TNF-R DNA 的重组翻译产物,随后从培养基或细胞提取物中纯化所述产物。

[0164] 在某些实施方案中,首先使用市售的蛋白浓缩过滤器例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤装置将向培养基中分泌重组蛋白的系统的上清液进行浓缩。在某些实施方案中,在浓缩步骤以后,将所得浓缩液加入合适的纯化基质中。典型的纯化基质包括但不限于结合于合适支持物的 TNF、凝集素或抗体多肽;包含例如悬垂的二乙基氨基乙基 (DEAE) 基团的阴离子交换树脂,其中所述基质为丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或常用于蛋白质纯化的其他类型;阳离子交换树脂,包含各种包括磺丙基或羧甲基基团的不可溶基质。

[0165] 在某些实施方案中,一种或多种使用疏水性 RP-HPLC 介质(例如具有悬垂甲基或其他脂族基团的硅胶)的反相高效液相层析 (RP-HPLC) 步骤用于进一步纯化 TNF-R 组合物。在某些实施方案中,某些或全部前述纯化步骤,以各种组合形式用于提供均质重组蛋白。

[0166] 在某些实施方案中,由细菌培养产生的重组蛋白通常首先由细胞团中被提取出来,然后经过一次或多次浓缩、盐析、液相离子交换或尺寸排阻层析步骤。在某些实施方案中,高效液相层析 (HPLC) 用于最后的纯化步骤。在某些实施方案中,可用任何便捷的方法破裂用于表达重组哺乳动物 TNF-R 的微生物细胞,例如,冻融循环、超声波处理、机械破坏、或使用细胞溶解剂。

[0167] 在某些实施方案中,发酵以分泌蛋白形式表达哺乳动物 TNF-R 的酵母细胞。典型的用于纯化由大规模发酵所得分泌的重组蛋白的方法在 Urdal 等 (J. Chromatog. 296 :171, 1984) 中讨论。

[0168] 某些特异性结合剂组合物

[0169] 在某些实施方案中,提供包含至少一种特异性结合剂、至少一种稳定剂、和缓冲剂的组合物。在某些上述实施方案中,该组合物还包含至少一种另外的药剂。在某些实施方案中,该特异性结合剂为 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些实施方案中,特异性结合剂为 RANKL 特异性结合剂,其中该 RANKL 特异性结合

剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中,该特异性结合剂为 TNF 特异性结合剂,其中该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR:Fc。在某些实施方案中,该特异性结合剂为 IL-1R1 特异性结合剂,其中该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2 并如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。

[0170] 在某些实施方案中,至少一种 RANKL 特异性结合剂的浓度为 1mg / ml 至 150mg / ml。在某些上述实施方案中,至少一种 RANKL 特异性结合剂为特异性结合 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。至少一种 RANKL 特异性结合剂的某些典型的浓度包括但不限于 30mg / ml、60mg / ml、70mg / ml、105mg / ml 和 120mg / ml。在某些实施方案中,组合物包括多于一种的不同的 RANKL 特异性结合剂。在某些实施方案中,所述多于一种的 RANKL 特异性结合剂与多于一个表位结合。

[0171] 在某些实施方案中,至少一种 TNF 特异性结合剂的浓度为 1mg / ml 至 150mg / ml。在某些上述实施方案中,至少一种 TNF 特异性结合剂以 50mg / ml 的浓度存在。在某些实施方案中,组合物包括多于一种的不同的 TNF 特异性结合剂。在某些上述实施方案中,所述多于一种的 TNF 特异性结合剂与多于一个表位结合。TNF 特异性结合剂,包括可溶性 TNFR:Fc 的典型制剂可见于第 2007 / 0243185 号美国专利公布,通过引用全文并入本文。

[0172] 在某些实施方案中,至少一种 IL-1R1 特异性结合剂的浓度为 1mg / ml 至 200mg / ml。在某些上述实施方案中,至少一种 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,该抗体选自 15C4、26F5 或 27F2,如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。至少一种 IL-1R1 特异性结合剂的某些典型的浓度包括但不限于 30mg / ml、70mg / ml、100mg / ml 和 150mg / ml。在某些实施方案中,组合物包括多于一种的不同的 IL-1R1 特异性结合剂。在某些上述实施方案中,所述多于一种的 IL-1R1 特异性结合剂与多于一个表位结合。

[0173] 在某些实施方案中,含有缓冲剂的组合物的 pH 值低于 6.6。在某些实施方案中,含有缓冲剂的组合物的 pH 值在 5.5 与 6.5 之间。在某些上述实施方案中,该 pH 值为 6.3。在某些实施方案中,含有缓冲剂的组合物的 pH 值在 4.5 与 5.5 之间。在某些上述实施方案中,该 pH 值为 5.2。典型缓冲剂包括但不限于醋酸盐、组氨酸、磷酸盐、谷氨酸盐和丙酸盐。在某些实施方案中,缓冲剂的浓度在 1mM 与 50mM 之间。在某些实施方案中,缓冲剂的浓度为 25mM。在某些实施方案中,缓冲剂的浓度为 10mM。

[0174] 在某些实施方案中,该组合物还含有至少一种糖。本文所用术语“糖”指诸如葡萄糖和甘露糖的单糖,或包括诸如蔗糖和乳糖等二糖的多糖,以及包括糖醇和糖酸的糖衍生物。糖醇包括但不限于甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、苏糖醇、山梨糖醇和甘油。糖酸的一个非限制性实例是左旋葡萄糖酸。某些典型的糖包括但不限于海藻糖和甘氨酸。在某些实施方案中,提供浓度为 0.5% 至 9.5% 的糖。在某些实施方案中,糖为 1% 蔗糖。在某些实施方案中,糖为 5.0% 山梨糖醇。

[0175] 在某些实施方案中,该组合物还含有至少一种表面活性剂。本文所用术语“表面活性剂”指包含疏水部分和亲水部分的表面活性试剂。表面活性剂的实例包括但不限于去垢剂和胆酸盐。在某些情况下,根据是否包含一个或多个带电荷基团,表面活性剂分类为

阴离子、非离子、两性离子或阳离子表面活性剂。非离子表面活性剂带有无电荷极性基团并不带电荷。某些典型的非离子表面活性剂包括但不限于聚乙二醇 (PEG), 包括但不限于 PEG8000、和聚山梨酯, 包括但不限于聚山梨酯 80 (**Tween**[®] 80) 和聚山梨酯 20 (**Tween**[®] 20)、Triton X-100、聚氧丙烯-聚氧乙烯酯 (**Pluronic**[®]) 和 NP-40。在某些实施方案中, 提供浓度为 0.001% 到 1.0% 的表面活性剂。在某些实施方案中, 提供浓度为 0.003% 到 0.3% 的表面活性剂。在某些实施方案中, 提供浓度为 0.01% 的表面活性剂。在某些实施方案中, 提供浓度在临界胶束浓度 (CMC) 以下的表面活性剂。在某些上述实施方案中, 组合物包含针对人类 IL-1R1 的人类单克隆抗体和 CMC 为 0.007% 的聚山梨酯 20, 该聚山梨酯 20 浓度为 0.004%。在某些实施方案中, 提供浓度在 CMC 以上的该表面活性剂。在某些上述实施方案中, 组合物包含 α RANKL-1 和 CMC 为 0.007% 的聚山梨酯 20, 该聚山梨酯 20 浓度为 0.01%。

[0176] 在某些实施方案中, 包含至少一种特异性结合剂、至少一种稳定剂、和缓冲剂的组合物将至少一种特异性结合剂稳定化。在某些实施方案中, 该特异性结合剂为 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些实施方案中, 特异性结合剂为 RANKL 特异性结合剂, 其中该 RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中, 该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中, 该特异性结合剂为 TNF 特异性结合剂, 其中该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中, 该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。在某些实施方案中, 该特异性结合剂为 IL-1R1 特异性结合剂, 其中该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中, 该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2, 如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。在某些实施方案中, 该组合物通过形成更少聚集体或二聚体而提供稳定化。在某些实施方案中, 该组合物通过形成更少化学变化形式而提供稳定化。

[0177] 在某些实施方案中, 样品中特定蛋白分子的聚集和 / 或化学变化形式的存在或程度可由本领域已知的合适方法确定, 比如尺寸排阻层析 (SEC), 又称为凝胶过滤层析或分子筛层析。在某些实施方案中, 确定样品中聚集体和 / 或化学变化形式的存在的合适方法为非变性条件下的凝胶电泳。“凝胶”指由水和例如琼脂糖或聚合丙烯酰胺等多聚体组成的基质。这些方法在基于比较分子大小和凝胶孔大小的基础上分离分子。测量聚集和 / 或化学变化形式的某些其他方法包括但不限于疏水相互作用层析 (HIC) 和高效液相层析 (HPLC)。HPLC 以基于任何一种吸附、离子交换、尺寸排阻、HIC 或反相层析法的方法提供分离。HIC 基于蛋白疏水部分与基质中不可溶的固定的疏水基团之间的表面疏水性分离天然蛋白。通常, 在 HIC 柱中上样在高盐缓冲液中制备的蛋白。缓冲液中的盐与水分子相互作用以减少溶液中的蛋白溶剂化, 由此将蛋白的疏水区暴露, 然后被基质上的疏水基团吸附。分子疏水性越强, 促进结合所需的盐就越少。通常, 降低的盐梯度用于将蛋白从柱上洗脱。随着离子强度的降低, 蛋白亲水区的暴露增多, 蛋白以疏水性增加的顺序从柱上洗脱。参见例如 Protein Purification (蛋白纯化), 第 2 版, Springer-Verlag, New York, 176-179 (1988)。在某些实施方案中, 通过使用高分辨率柱和减少柱保留时间来加强分离。例如参见例如 Chicz 等, Methods in Enzymology (酶学方法) 182, 第 392-421 页 (1990)。其他的典型的监测蛋白稳定性的方法可见 Lee, V., 编著. Peptide and Protein Drug Delivery (肽和蛋白药物递送) (Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 1991)。在某些实施方案中, 蛋白的稳定性在某一温度下一段特定时间后测量。在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF

特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在储存于室温下（介于 21℃ 和 29℃ 之间）的组合物中稳定化。典型的储存时间包括但不限于至少 1 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少 12 个月、至少 18 个月和至少 24 个月。在某些实施方案中，RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在储存于 2℃ 和 8℃ 之间的组合物中稳定化。典型的储存时间包括但不限于至少 6 个月、至少 9 个月、至少 12 个月、至少 18 个月和至少 24 个月。

[0178] 在某些实施方案中，RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂被制备、纯化和配制为液态药物组合物。在某些实施方案中，在制备和纯化后，RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在配制前被储存。在某些上述实施方案中，RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂被冷冻，比如在 -20℃ 或更低温度下。在某些上述实施方案中，RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在室温下解冻用于进一步配制。在某些实施方案中，液态药物制剂包含治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些实施方案中，根据例如给药途径和期望剂量体积，制剂中配制 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的量由本领域技术人员决定。在某些实施方案中，药物制剂包含浓度为 1mg / ml 到 150mg / ml 的 RANKL 特异性结合剂。在某些上述实施方案中，RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中，该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中，药物制剂包含浓度为 1mg / ml 到 150mg / ml 的 TNF 特异性结合剂。在某些上述实施方案中，该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中，该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。在某些实施方案中，药物制剂包含浓度为 1mg / ml 到 200mg / ml 的 IL-1R1 特异性结合剂。在某些上述实施方案中，该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中，该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2，如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。在某些实施方案中，药物制剂包含治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂和维持制剂 pH 值低于 6.6 的缓冲剂。在某些实施方案中，缓冲剂将该制剂的 pH 值维持于 4.5 与 5.5 之间。在某些上述实施方案中，缓冲剂将该制剂的 pH 值维持于 5.2。在某些实施方案中，药物制剂包含治疗有效量的 IL-1R1 特异性结合剂和维持制剂 pH 值低于 6.6 的缓冲剂。在某些实施方案中，缓冲剂将该制剂的 pH 值维持于 4.5 与 5.5 之间。在某些上述实施方案中，缓冲剂将该制剂的 pH 值维持于 5.0。在某些实施方案中，药物制剂包含治疗有效量的 TNF 特异性结合剂和维持制剂 pH 值于 5.5 与 6.5 之间的缓冲剂。在某些上述实施方案中，缓冲剂将该制剂的 pH 值维持于 6.3。

[0179] 在某些实施方案中，包括但不限于与特定蛋白结合并阻止其与其他结合化合物相互作用的抗体和可溶性多肽的特异性结合剂可能具有治疗用途。在此种应用中，当讨论到使用抗体或可溶性多肽治疗疾病或疾患的时候，所述用途可包括使用包含抗体或可溶性多肽的组合物；和 / 或包含抗体或可溶性多肽和一种或多种另外的活性成分的联合疗法。当抗体或可溶性多肽用于“治疗”疾病或疾患时，所述治疗可包括或不包括对疾病或疾患的预防。

[0180] 在某些实施方案中，包括但不限于抗体或可溶性多肽的特异性结合剂单独给药。在某些实施方案中，抗体或可溶性多肽在至少一种其他治疗剂之前给药。在某些实施方案

中,抗体或可溶性多肽与至少一种治疗剂同时给药。在某些实施方案中,抗体或可溶性多肽在至少一种治疗剂之后给药。典型治疗剂包括但不限于至少一种癌症治疗剂。典型癌症治疗剂包括但不限于放疗和化疗。

[0181] 在某些实施方案中,包含例如抗体或可溶性多肽等特异性结合剂的药物组合物可用于在联合疗法中给药,也就是说,和其他药剂组合。典型药剂包括但不限于体外合成制备的化学组合物、抗体、抗原结合区、放射性核素,和其组合或共轭物。在某些实施方案中,药剂可起到激动剂、拮抗剂、变构调节剂或毒素的作用。在某些实施方案中,药剂可起到抑制或刺激其靶标(例如受体或酶的活化或抑制)的作用,由此促进细胞死亡或阻滞细胞生长。在某些实施方案中,所述联合疗法包括 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂与至少一种抗血管生成剂的组合。在某些实施方案中,该 RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中,该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR:Fc。在某些实施方案中,该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2,如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。

[0182] 典型化疗疗法包括但不限于抗肿瘤剂,其包括但不限于烷化剂,包括但不限于:氮芥;亚硝基脲;氮杂环丙烷 / 甲基密胺;烷基磺酸盐;抗代谢药物;嘧啶类似物;嘌呤类似物;天然产品,包括但不限于:抗有丝分裂药物、长春花生物碱、鬼臼毒素;抗生素;酶;生物反应调节剂;各种药剂,包括但不限于:铂配位络合物;蒽醌类 (anthracenediones);取代脲;甲基胍衍生物;肾上腺皮质抑制剂;激素和拮抗剂。

[0183] 可与 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂共同给药的典型癌症疗法包括但不限于靶向治疗。典型靶向治疗包括但不限于使用治疗性抗体。典型治疗性抗体包括但是不限于小鼠抗体、小鼠 - 人类嵌合抗体、CDR 嫁接抗体、人源化抗体和完全人类抗体,以及合成抗体,包括但不限于由筛选抗体文库而选择的抗体。典型抗体包括但不限于结合于肿瘤细胞上呈现的细胞表面蛋白 Her2、CDC20、CDC33、粘蛋白样糖蛋白、VEGF、和表皮生长因子受体 (EGFR),并任选地在呈现所述蛋白的肿瘤细胞中诱导细胞抑制性和 / 或细胞毒性效应的抗体。

[0184] 在某些实施方案中,癌症治疗剂为降低血管生成的抗血管生成剂。在某些实施方案中,癌症治疗剂为血管生成抑制剂。

[0185] 在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂可在癌症治疗剂治疗之前、同时、或之后给药。在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂可进行预防性给药以阻止或减轻癌转移开始的骨丢失。在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂被给药以治疗由于转移的骨丢失的现存疾患。

[0186] 典型癌症包括但不限于乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、神经胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、遗传性和散发性乳头状肾癌、白血病、淋巴瘤、李弗劳梅尼综合征、恶性胸膜间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、小细胞肺癌、滑膜肉瘤、甲状腺癌和膀胱移行细胞癌。

[0187] 在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异

性结合剂可单独使用或与至少一种另外的治疗剂一起使用以治疗癌症。在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂与治疗有效量的另外一种治疗剂共同使用。

[0188] 在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂与一种或多种特定治疗剂一起使用以治疗各种癌症。在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂与一种或多种特定治疗剂一起使用以治疗或预防疟疾。在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂与一种或多种特定治疗剂一起使用以治疗或预防糖尿病增生性视网膜病变。在某些实施方案中, 视疾患和期望治疗水平而定, 可给药两种、三种或更多种药剂。在某些实施方案中, 所述药剂可通过被包含于同一制剂中而一起提供。在某些实施方案中, 所述药剂与 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂可通过被包含于同一制剂中而一起提供。在某些实施方案中, 所述药剂可单独配制并通过被包括在治疗药盒中而一起提供。在某些实施方案中, 所述药剂与 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂可单独配制并通过被包括在治疗药盒中而一起提供。在某些实施方案中, 可分别提供所述药剂。在某些实施方案中, 当使用基因治疗给药时, 编码蛋白药剂和 / 或 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂各基因可被包含于同一载体中。在某些实施方案中, 编码蛋白药剂和 / 或 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂各基因可处于同一启动子区的控制之下。在某些实施方案中, 编码蛋白药剂和 / 或 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂各基因可处于不同载体中。

[0189] 应了解的是, 个体患者对前述药物或联合治疗可产生不同反应, 可由医生决定对于每个患者适合的有效的药物组合。

[0190] 在某些实施方案中, 提供包含 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和 / 或佐剂的药物组合物。

[0191] 在某些实施方案中, 提供包含 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂和治疗有效量的至少一种另外的治疗剂、以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和 / 或佐剂的药物组合物。

[0192] 在某些实施方案中, 提供包括 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以及至少一种丝氨酸蛋白酶抑制剂的疗法, 以及使用该疗法的治疗方法。在某些实施方案中, 疗法包括 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂、以及至少一种本文所述的另外的药剂。

[0193] 在某些实施方案中, 打乱蛋白酶 / 蛋白酶抑制剂的平衡可导致蛋白酶介导的组织破坏, 包括但不限于由肿瘤入侵正常组织导致的癌症转移。

[0194] 在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂可与用于炎症的至少一种治疗剂一起使用。在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂可与用于免疫功能紊乱的至少一种治疗剂一起使用。某些典型的用于炎症的治疗剂已描述在, 例如, C. A. Dinarello 和 L. L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid

Arthritis: A Primer for Clinicians (在类风湿关节炎中的促炎性和抗炎性的细胞因子：临床医生初级读本) 第3版 (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA 中。

[0195] 在某些实施方案中, 药物组合物包括多于一种的不同的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些上述实施方案中, 所述多于一种 RANKL 特异性结合剂与多于一个表位结合。在某些上述实施方案中, 所述多于一种 TNF 特异性结合剂与多于一个表位结合。在某些上述实施方案中, 所述多于一种 IL-1R1 特异性结合剂与多于一个表位结合。

[0196] 在某些实施方案中, 包含一种或多种 RANKL 特异性结合剂、一种或多种 TNF 特异性结合剂、和 / 或一种或多种 IL-1R1 特异性结合剂的液态组合物被制备为含水或非含水溶液或悬浮液, 用于后来为患者给药。

[0197] 在某些实施方案中, 组合物的材料在所用剂量和浓度对接受者无毒。

[0198] 在某些实施方案中, 药物组合物包含用于修改、维持或保持以下方面的材料: 例如组合物的 pH 值、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌、稳定性、溶出或释放率、吸附或渗透。典型配制材料包括但不限于油类、维生素、盐类、氨基酸 (包括但不限于非极性氨基酸 (包括但不限于丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸或色氨酸)); 抗菌素; 抗氧化剂 (包括但不限于抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠); 缓冲剂 (包括但不限于醋酸盐、组氨酸、磷酸盐、柠檬酸盐或丙酸盐); 增量剂 (包括但不限于甘露醇或甘氨酸); 螯合剂 (包括但不限于乙二胺四乙酸 (EDTA)); 络合剂 (包括但不限于咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精); 填料; 糖或糖醇 (包括但不限于单糖、二糖、多糖或水溶性聚糖); 其他碳水化合物, 比如, 糖类或葡聚糖 (包括但不限于果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、葡聚糖、支链淀粉、糊精、 α 与 β 环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉、羧甲基纤维素、或其混合物); 糖醇 (包括但不限于甘露醇或山梨醇); 蛋白质 (包括但不限于血清白蛋白、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 (包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮, 包括但不限于平均分子量 2,000 至 3,000 的聚乙烯吡咯烷酮、或聚乙二醇, 包括但不限于平均分子量 3,000 至 5,000 的聚乙二醇); 低分子量多肽; 盐形成平衡离子 (包括但不限于钠); 防腐剂 (包括但不限于苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、洗必泰、山梨酸或过氧化氢); 溶剂 (包括但不限于甘油或丙二醇); 悬浮剂; 表面活性剂或润湿剂 (包括但不限于聚氧丙烯-聚氧乙烯酯 (**Pluronic**®)、聚乙二醇、山梨糖醇酯、聚山梨酯, 包括但不限于聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、三硝基甲苯、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊 (tyloxapol)); 稳定剂 (包括但不限于非极性氨基酸); 张力促进剂 (包括但不限于碱金属卤化物, 例如, 氯化钠或氯化钾、甘露醇山梨醇); 递送运载体; 稀释剂; 赋形剂和 / 或药物佐剂。(Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), 第 18 版, A. R. Gennaro 编著, Mack Publishing Company (1990)。

[0199] 在某些实施方案中, RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂连接于本领域已知的延长半衰期的运载体上。所述运载体包括但不限于 Fc 结构域、聚乙二醇 (PEG)、聚氧乙烯化多元醇和葡聚糖。所述运载体与方法已描述在, 例如第 4,179,337; 4,495,285; 4,609,546; 4,766,106; 6,660,843 号美国专利和已公布的第 W099 / 25044 号 PCT 申请中。在某些情况中, PEG 在室温下溶于水并具有通式: $R(O-CH_2-CH_2)$

O-R , 其中 R 为氢, 或保护基, 包括但不限于烷基或烷醇基, 并且其中 “n” 为正整数。在某些实施方案中, 该保护基具有 1 到 8 个碳原子。在某些上述实施方案中, 该保护基为甲基。在某些实施方案中, “n” 介于 1 到 1,000 之间。在某些实施方案中, PEG 的平均分子量介于 1,000 到 40,000 之间。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。在某些实施方案中, PEG 具有至少一个羟基。在某些上述实施方案中, 该羟基为末端羟基。在某些上述实施方案中, 该末端羟基被 N- 羟基琥珀酰亚胺活化, 以与 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂上的自由氨基反应生成共价地共轭的分子。在某些实施方案中, 可改变反应性基团的类型和量以获得共价地共轭的 PEG / 特异性结合剂。共轭的 PEG 分子的制备在本领域技术人员能力范围内。

[0200] 在某些实施方案中, 延长半衰期的运载体为聚氧乙烯化多元醇。典型聚氧乙烯化多元醇包括但不限于聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖和聚氧乙烯化甘油 (POG)。在某些实施方案中, POG 的平均分子量介于 1,000 到 40,000 之间。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。POG 的某些典型结构见于, 例如, Knauf 等, J. Biol. Chem. 263 :15064-15070 (1988) 中。某些典型 POG 共轭物见于, 例如第 4,766,106 号美国专利中。

[0201] 在某些实施方案中, 最佳的药物组合物由本领域技术人员根据以下所列决定: 例如, 预期给药途径、递送安排和期望剂量。参见例如 Remington' s Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), 同上。在某些实施方案中, 所述组合物可能影响本发明抗体的物理状态、稳定性、体内释放率和体内清除率。

[0202] 在某些实施方案中, 药物组合物中的主要运载体或载体本质上为含水的。例如, 在某些实施方案中, 合适的运载体或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或合成脑脊髓液, 并可能补充有肠胃外给药组合物中常用的其他材料。在某些实施方案中, 该运载体或载体是无菌的。在某些实施方案中, 包括了另外的组分。典型的另外组分包括但不限于不挥发油; 聚乙二醇; 甘油; 丙二醇和其他合成溶剂; 抗菌剂, 包括但不限于苯甲醇和尼泊金甲酯; 抗氧化剂, 包括但不限于抗坏血酸和亚硫酸氢钠; 以及螯合剂, 包括但不限于乙二胺四乙酸。在某些实施方案中, 中性缓冲盐水或盐水与血清白蛋白混合为进一步的典型运载体。在某些实施方案中, 药物组合物包含 pH 值为约 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液, 或 pH 值为约 5.0-5.5 的醋酸盐缓冲液, 或 pH 值为约 5.0-5.5 的谷氨酸盐缓冲液, 或 pH 值为约 5.0-5.5 的琥珀酸盐缓冲液, 或 pH 值为约 5.0-5.5 的组氨酸缓冲液, 或 pH 值为约 5.0-5.5 的天门氨酸盐缓冲液, 或 pH 值为约 6.0-6.5 的磷酸盐缓冲液, 其中可能还包含蔗糖、山梨醇、或其合适替代物。在某些实施方案中, 药物组合物具有自身缓冲性。参见例如, 公开于 2006 年 12 月 28 日的第 PCT / US2006 / 022599 号国际专利申请。在某些实施方案中, 包含 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂, 且包括或不包括至少一种另外的治疗剂的组合物, 可通过将所选的具有所需纯度的组合物与任选配制剂 (Remington' s Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), 同上) 混合为含水溶液形式而制备用于储存。在某些实施方案中, 药物组合物密封于容器中。典型容器包括但不限于安瓿、一次性注射器, 包括但不限于适用于预填充的一次性注射器, 和玻璃或塑料制的多剂量管型瓶。在某些实施方案中, 包含 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的组合物被放置于预充式注射器中。在某些实施方案中, 该 RANKL 特异性结合剂为特异性

结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中,该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。在某些实施方案中,该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2,如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。适用于预填充的典型注射器已描述在,例如第 5,607,400 号美国专利中。适用于预填充的注射器于多家厂商有售,例如, Daikyo Seiko, Ltd (Tokyo, Japan)、Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ)、Bunder Glass (Düsseldorf, Germany) 和 Schott-Forma Vitrum (Lebanon, PA)。

[0203] 在某些实施方案中,可为了肠胃外递送而选择药物组合物。典型肠胃外递送包括但不限于静脉、肌内、皮内或皮下给药。在某些实施方案中,可为了经由消化道递送,例如口服,而选择组合物。所述药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员能力范围内。

[0204] 在某些实施方案中,制剂中的成分以给药位点可接受的浓度存在。在某些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以及缓冲剂。在某些实施方案中,该 RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中,该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。在某些实施方案中,该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2,如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。在某些实施方案中,缓冲剂用于维持组合物在生理 pH 值或在稍低的 pH 值。在某些实施方案中,缓冲剂在 pH 值 5.5 和 pH 值 8.0 之间。在某些实施方案中,缓冲剂在 pH 值 5.5 和 pH 值 6.5 之间。在某些实施方案中,缓冲剂在 pH 值 4.5 和 pH 值 5.5 之间。典型缓冲剂包括但不限于酸类和 / 或其盐类,包括但不限于丁二酸或丁二酸盐、柠檬酸或柠檬酸盐、乙酸或乙酸盐、酒石酸或酒石酸盐、磷酸或磷酸盐、丙酸或丙酸盐、葡糖酸或葡糖酸盐、谷氨酸或谷氨酸盐、组氨酸、甘氨酸、天门氨酸或天门氨酸盐、马来酸或马来酸盐、苹果酸或苹果酸盐缓冲剂。在某些情况下,“盐”指由酸的阴离子与带相反电荷的离子生成的电中性物质。在某些所述情况下,带相反电荷的离子称为“平衡离子”。典型平衡离子包括但不限于钠、钾、铵、钙和镁。在某些实施方案中,制剂中缓冲剂的浓度介于 1mM 和 50mM 之间。在某些实施方案中,制剂中缓冲剂的浓度介于 5mM 和 30mM 之间。在某些实施方案中,制剂中缓冲剂的浓度介于 10mM 和 25mM 之间。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。在某些实施方案中,制剂中缓冲剂的浓度为 10mM。在某些实施方案中,制剂中缓冲剂的浓度为 25mM。

[0205] 在某些实施方案中,药物制剂包含浓度为 1mg / ml 到 200mg / ml 的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以及缓冲剂。在某些实施方案中,该缓冲剂的浓度介于 1mM 和 50mM 之间,并且该制剂的 pH 值低于 6.6。在某些上述实施方案中,该药物制剂包含浓度为 60mg / ml 的 RANKL 特异性结合剂和浓度为 10mM 的缓冲剂,并且该制剂的 pH 值为 5.2。在某些实施方案中,该 RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些上述实施方案中,药物制剂包含浓度为 50mg / ml 的 TNF 特异性结合剂和浓度为 25mM 的缓冲剂,并且该制剂的 pH 值为 6.3。在某些实施方案中,该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。

[0206] 在某些实施方案中,药物制剂包含治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以及缓冲液剂。在某些实施方案中,该缓冲剂为浓度为维持制剂 pH 值低于 6.6 的磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,该制剂的 pH 值介于 4.0 到 6.0 之间。术语“磷酸盐缓冲剂”指包含磷酸盐的缓冲剂。术语“醋酸盐缓冲剂”指包含醋酸盐的缓冲剂。在某些实施方案中,磷酸盐或醋酸盐的平衡离子为钠。在某些上述实施方案中,该缓冲剂为磷酸钠或醋酸钠。其他典型平衡离子包括但不限于钾、铵、钙和镁。在某些实施方案中,制剂中磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂的浓度介于 1mM 到 50mM 之间。在某些实施方案中,制剂中磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂的浓度介于 5mM 到 30mM 之间。在某些实施方案中,制剂中磷酸盐缓冲基或醋酸盐缓冲剂的浓度介于 10mM 到 25mM 之间。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。在某些实施方案中,制剂中磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂的浓度为 10mM。在某些实施方案中,制剂中磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂的浓度为 25mM。在某些实施方案中,药物制剂包含浓度为 1mg / ml 到 200mg / ml 的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以及缓冲剂。在某些实施方案中,该缓冲剂为磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂,其浓度介于 1mM 和 50mM 之间,并且该制剂的 pH 值低于 6.6。在某些上述实施方案中,药物制剂包含浓度为 60mg / ml 的 RANKL 特异性结合剂和浓度为 10mM 的醋酸盐缓冲剂,该制剂的 pH 值为 5.2。在某些实施方案中,该 RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中,药物制剂包含浓度为 50mg / ml 的 TNF 特异性结合剂和浓度为 25mM 的磷酸盐缓冲剂,该制剂的 pH 值为 6.3。在某些上述实施方案中,该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。

[0207] 在某些实施方案中,药物制剂包含治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂;浓度为维持制剂的 pH 值低于 6.6 的缓冲剂;和足够保证制剂为等渗的量的等渗剂。在某些实施方案中,该缓冲剂为磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂。“等渗”的制剂具有介于 270mOsm 和 370mOsm 之间的同渗浓度。在某些实施方案中,制剂的 pH 值介于 4.0 到 6.0 之间。确定溶液等渗性的某些方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Setnikar 等,J. Am. Pharm. Assoc. 48 :628-30(1959)。典型等渗剂包括但不限于氯化钠;氨基酸,包括但不限于丙氨酸、精氨酸、缬氨酸和甘氨酸;糖和糖醇(多元醇),包括但不限于葡萄糖、右旋糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、海藻糖、甘油、山梨醇和木糖醇;醋酸,其他有机酸及其盐类,以及相对少量的柠檬酸盐或磷酸盐。在某些实施方案中,等渗剂以至少为 5% 的浓度提供。在某些实施方案中,等渗剂为浓度为 9% 的蔗糖。

[0208] 在某些实施方案中,药物制剂包含治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂;浓度为维持制剂的 pH 值低于 6.6 的缓冲剂;和表面活性剂。在某些实施方案中,该缓冲剂为磷酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,制剂的 pH 值介于 4.0 到 6.0 之间。在某些实施方案中,该表面活性剂为非离子表面活性剂。某些典型的非离子表面活性剂包括但不限于聚氧乙烯山梨醇酯(聚山梨酯)、聚氧丙烯-聚氧乙烯酯(Pluronic[®])、聚氧乙烯醇、西甲硅油、聚乙二醇、溶血卵磷脂和聚氧乙烯-p-t-辛基苯酚。某些典型表面活性剂包括但不限于 PEG8000、聚山梨酯 80(Tween[®] 80) 和聚山梨酯 20(Tween[®] 20)。在某些实施方案中,提供浓度介于 0.001% 和 1.0% 之

间的表面活性剂。在某些实施方案中,提供浓度介于 0.003%和 0.3%之间的表面活性剂。在某些实施方案中,提供浓度为 0.01%的表面活性剂。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。

[0209] 在某些实施方案中,当预期肠胃外给药的时候,治疗组合物可能为药学上可接受的运载体中的无热原的、肠胃外可接受的水溶液形式,包含所需的 RANKL 特异性结合剂、所需的 TNF 特异性结合剂、和 / 或所需的 IL-1R1 特异性结合剂,含有或不含有另外的治疗剂。在某些实施方案中,用于肠胃外注射的运载体为无菌蒸馏水,其中 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂,以及带有或不带有至少一种另外的治疗剂被配制为无菌的等渗溶液,并妥善保存。在某些实施方案中,制备可包括将所需分子与试剂一起配制,所述试剂比如可注射微球、可生物侵蚀颗粒、聚合化合物(如聚乳酸或聚羟乙酸)、微珠或脂质体,由此,当该产品随后以长效注射的方式递送时,可提供产品的控制释放或持续释放。在某些实施方案中,也可以使用透明质酸,并可具有促进在血液循环中持久的持续时间的效果。在某些实施方案中,可使用可植入式药物递送装置来引入所需的分子。

[0210] 在持续或控制递送的制剂中的另外的药物组合物对于本领域技术人员将是明显的,包括含有 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂,包含或不包含至少一种另外治疗剂的制剂。在某些实施方案中,用于配制多种其他持续或控制递送运载体的技术也是本领域技术人员公知的,所述运载体诸如脂质体载体、生物可侵蚀性微粒、或多孔微珠和长效注射液。参见例如 PCT 申请第 PCT/US93 / 00829 号,其中描述了用于递送药物组合物的多孔聚合微粒的控制释放。在某些实施方案中,持续释放制品可包括成型形式的半透聚合物基质,例如,薄膜或微胶囊。持续释放基质可包括聚酯、水凝胶、聚交酯(U. S. 3, 773, 919 和 EP058, 481)、L- 谷氨酸和 γ -L- 谷氨酸乙酯共聚体(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))、乙烯醋酸乙烯酯(Langer 等, 同上)或聚 D(-)-3- 羟基丁酸(EP133, 988)。在某些实施方案中,持续释放组合物也可包括脂质体,并可根据本领域中已知的多种方法中的任一种方法制备。参见例如, Gabizon 等, Cancer Research 42 :4734-4739(1982); Eppstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688-3692(1985); Szoka 等, Ann. Rev. Biophys. Eng. 9 :467-508(1980); EP036, 676; EP088, 046 和 EP143, 949。在某些实施方案中,使用本领域已知的药物递送系统。所述药物递送系统已在下列文献中描述,例如: Poznansky 等, Drug Delivery Systems(药物递送系统), R. L. Juliano 编著, Oxford, N. Y., 第 253-315 页(1980); Poznansky 等, Pharmacol Rev. 36 :277-336(1984)。

[0211] 体内给药所用的药物组合物通常为无菌。在某些实施方案中,可通过使用无菌过滤膜过滤达到无菌。在某些实施方案中,肠胃外组合物通常被置于带有无菌入口的容器中,例如,带有可由皮下注射针刺破的塞子的静脉注射袋或管。在某些实施方案中,肠胃外组合物被置于适于预填充组合物的注射器中。

[0212] 在某些实施方案中,将用于治疗的包含 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂、包含或不包含至少一种另外的治疗剂的药物组合物的有效量将依赖于,比如,治疗环境和目标。根据某些实施方案,本领域技术人员将了解,用于治疗的合适的剂量水平将因此部分地根据以下方面而变化:递送的分子;所用的 RANKL 特异

性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂、包含或不包含至少一种另外的治疗剂的适应症 ; 给药途径 ; 和患者尺寸 (体重、身高、体表面积和 / 或器官大小) 和 / 或患者情况 (年龄、身体状况、和 / 或总体健康状况) 。在某些实施方案中, 临床医生在使用 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂、包含或不包含至少一种另外的治疗剂时, 要考虑到疾病的严重度和病史。在某些实施方案中, 临床医生可效价剂量和调整给药途径以达到最优治疗效果。在某些实施方案中, 根据以上所述因素, 典型剂量可在约 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达约 $100\text{mg} / \text{kg}$ 或更高的范围内。在某些实施方案中, 经受治疗的患者的体重越重, 在治疗中所用 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的剂量越大。在某些实施方案中, 该剂量可在 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达约 $100\text{mg} / \text{kg}$ 的范围内 ; 或 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达约 $100\text{mg} / \text{kg}$ 的范围 ; 或 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达约 $100\text{mg} / \text{kg}$ 的范围内。

[0213] 在某些实施方案中, 给药频率要考虑到制剂中所用的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的药代动力学参数。在某些实施方案中, 临床医生将给药组合物直到达到实现了所需效果的剂量。在某些实施方案中, 该组合物可因此以单剂量给药, 或随着时间以双剂量或多剂量给药 (其中双剂量或多剂量可包含相同或不相同量的所需分子), 或通过植入装置或导管持续输液。合适剂量的进一步明确由本领域技术人员例行地进行, 在本领域技术人员的例行工作范围之内。在某些实施方案中, 治疗中所用的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的有效剂量随着患者的治疗过程而增加。在某些实施方案中, 治疗中所用的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的有效剂量随着患者的治疗过程而减少。在某些实施方案中, 可根据使用合适的剂量 - 反应关系数据来确定合适的剂量。

[0214] 在某些实施方案中, 给药方案包括在治疗阶段的第 1、7、14 和 21 天使用治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂进行初始给药, 包含或不包含至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中, 给药方案包括在治疗阶段中一周的第 1、2、3、4、5、6 和 7 天使用治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂进行初始给药, 包含或不包含至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中, 给药方案包括在治疗阶段中一周的第 1、3、5 和 7 天使用治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂进行初始给药, 包含或不包含至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中, 给药方案包括在治疗阶段中一周的第 1 天和第 3 天使用有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂进行初始给药, 包含或不包含至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中, 给药方案包括在治疗阶段中一周的第 1 天使用治疗有效量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂进行初始给药, 包含或不包含至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中, 治疗阶段包括 1 周、两周、3 周、1 个月、3 个月、6 个月、1 年或更长时间。在某些实施方案中, 治疗阶段以 1 天、1 周、2 周、1 个月、3 个月、6 个月、一年或更长时间彼此相继或相隔。

[0215] 在某些实施方案中, 在治疗阶段中可在每次给药时使用相同治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些实施方案中, 在治疗阶段中可在每次给药时使用不同治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异

性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些实施方案中,在治疗阶段中可在某些给药时使用相同治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂给药,而在某些其它给药时使用不同治疗有效剂量。

[0216] 在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的初始治疗有效剂量在较低剂量范围内,例如,从 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达 $20\text{mg} / \text{kg}$, 后续剂量在更高的剂量范围,例如,从 $20\text{mg} / \text{kg}$ 到多达 $100\text{mg} / \text{kg}$ 。在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的初始治疗有效剂量在较高剂量范围内,例如,从 $20\text{mg} / \text{kg}$ 到多达 $100\text{mg} / \text{kg}$, 后续剂量在更低的剂量范围,例如,从 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达 $20\text{mg} / \text{kg}$ 。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。

[0217] 在某些实施方案中,初始治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂以“负荷剂量”给药。“负荷剂量”指对患者进行 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂给药的初始剂量,其中所给药的该 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的剂量在较高剂量范围内,例如从 $20\text{mg} / \text{kg}$ 到多达 $100\text{mg} / \text{kg}$ 。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。在某些实施方案中,该负荷剂量以单次施用给药,例如,包括但不限于单次静脉输液。在某些实施方案中,该负荷剂量以多次施用给药,例如,包括但不限于多次静脉输液。在某些实施方案中,该负荷剂量经 24 小时的阶段给药。在某些实施方案中,负荷剂量给药以后,向患者给药一个或多个另外的治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。在某些上述实施方案中,该后续治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂根据以周计的给药计划来给药,例如,包括但不限于每两周一次、每三周一次、或每四周一次。在某些上述实施方案中,后续治疗有效剂量的剂量在较低剂量范围内,例如,从 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达 $20\text{mg} / \text{kg}$ 。

[0218] 在某些实施方案中,在负荷剂量给药后,向患者根据“维持计划”给药一个或多个另外的治疗有效剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。典型维持计划包括但不限于每月一次、六周一次、两个月一次、十周一次、三个月一次、14 周一次、四个月一次、18 周一次、五个月一次、22 周一次、六个月一次、七个月一次、八个月一次、九个月一次、十个月一次、十一个月一次、十二个月一次给药。在某些实施方案中,后续剂量以较频繁的间隔给药,例如,每两周一次到每个月一次。在某些上述实施方案中,后续剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在较低剂量范围内,例如从 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 到多达 $20\text{mg} / \text{kg}$ 。在某些实施方案中,后续剂量以较不频繁的间隔给药,例如,每月一次到每十二个月一次。在某些上述实施方案中,后续剂量的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂在较高剂量范围内,例如从 $20\text{mg} / \text{kg}$ 到多达 $100\text{mg} / \text{kg}$ 。

[0219] 在某些实施方案中,药物组合物的给药途径与已知方法相符合,例如,口服、通过静脉、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、或病灶内途径注射;通过持续性释放系统或通过植入装置。在某些实施方案中,组合物可由推注注射或持续输液,或植入装置给药。

[0220] 在某些实施方案中,静脉给药通过持续 1 到 10 小时的输液来进行。在某些实施方案中,静脉给药通过持续 1 到 8 小时的输液来进行。在某些实施方案中,静脉给药通过持续 2 到 7 小时的输液来进行。在某些实施方案中,静脉给药通过持续 4 到 6 小时的输液来进行。所述范围和本申请中所讨论的任何范围均包括端点和端点间的所有值。在某些实施方案中,输液时间决定于将用于给药的 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂。确定某些合适的输液时间在本领域技术人员能力范围内。在某些实施方案中,初始输液经 4 到 6 小时的时间段提供,后续输液递送较快。在某些实施方案中,后续输液经 1 到 6 小时的时间段给药。

[0221] 在某些实施方案中,RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂和 / 或任何另外的治疗剂可被放置于注射器中并被塞住,使得预充式注射器的顶空最小。在某些实施方案中,该 RANKL 特异性结合剂为特异性结合于 RANKL 的抗体。在某些实施方案中,该抗体为 α RANKL-1。在某些实施方案中,该 TNF 特异性结合剂为可溶性 TNF 受体。在某些实施方案中,该可溶性 TNF 受体为 sTNFR :Fc。在某些实施方案中,该 IL-1R1 特异性结合剂为特异性结合于 IL-1R1 的抗体。在某些实施方案中,该抗体选自 15C4、26F5 和 27F2,如第 2004 / 0097712 号美国专利公布中描述。在某些实施方案中,装有 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的注射器使用如下所述的真空塞放置方法或者机械塞放置方法由 Flurotec / B2 涂层的柱塞塞住,所述柱塞例如,包括但不限于 Daikyo / West (Becton Dickinson, 零件号 47165910 和 47165919) 和 Dupont (Becton Dickinson, 零件号 5080958 和 5115079)。

[0222] 在某些实施方案中,真空塞放置方法包括使用真空塞放置装置,例如,包括但不限于 Autoclavable Stopper Placement Unit (ASPU)、Impro Systems Hypak filler, 产品号 897400。在某些实施方案中,将装有 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的注射器放置在所述装置中,并在每平方英寸 75 磅的入口压力和设定为 FC1-21" Hg、FC2-6.5" Hg、FC326.5" Hg 的真空循环下塞住。在某些实施方案中,这些设定导致至少 3mm 的顶空。在某些实施方案中,由有至少 3mm 顶空的塞住并预填充的注射器生成最小顶空的塞住并预填充的注射器,通过如下人工操纵该塞住并预填充的注射器以从针头排出空气:将注射器的针头一端向上,使得气泡上升到针头底部,将空气排出针头,并重新封住针头。

[0223] 在某些实施方案中,机械塞放置方法包括使用机械塞放置装置,例如,包括但不限于 Groninger, SVH200 型。在某些具体实施中,将装有 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的注射器放置在所述装置中,并机械放置塞子。在某些实施方案中,塞子使用真空放置。在某些实施方案中,在置塞过程中使用排气管。为了产生具有最小顶空的塞住的预充式注射器,将塞子放置在含有 RANKL 特异性结合剂、TNF 特异性结合剂、和 / 或 IL-1R1 特异性结合剂的液态组合物的上表面,以使该塞子尽可能地与液体表面接近,并使塞子下表面与液体上表面之间最大范围接触。在某些实施方案中,塞子下表面与弯液面之间的距离最小。

[0224] 在某些实施方案中,预充式并塞住的注射器的顶空由校准过的卡尺来人工测量。一种典型的校准卡尺的方法是将其置于完全合上的位置 (0.00"),然后根据制造商的说明书使用 0.050" 和 4.000" 的量块进行校准。在某些实施方案中,预充式并塞住的注射器

的顶空由显微镜和显微镜尺来测量。在某些上述实施方案中,卡尺用于记录弯液面顶部到柱塞扁平体底部的距离。在某些实施方案中,预充式并塞住的注射器顶空由光学比较器测量。典型的光学比较器是 Deltronic DH216,水平光学比较器 (Horizontal Optical Comparator)。在某些所述的实施方案中,通过将注射器垂直放置与光学透镜平行来进行测量。将放大的图像投影到屏幕上用以检查。光学比较器上的卡尺用于记录弯液面顶部与柱塞的扁平体底部之间的距离。在某些实施方案中,顶空为弯液面顶部与柱塞扁平体底部之间以毫米计的距离。

[0225] 在某些预充式注射器中,顶空由 2mm 到 5mm 不等。在某些预充式注射器中,顶空为 $3\text{mm} \pm 0.00254\text{mm}$ 。在某些具有最小化顶空的预充式注射器中,该顶空小于 2.9mm、或小于 2.7mm、或小于 2.5mm、或小于 2.3mm、或小于 2mm、或小于 1.5mm 或小于 1.0mm,或没有可检测的顶空。

[0226] 在某些实施方案中,注射器针筒包含以下材料,比如但不限于玻璃、环烯烃聚合物 (“COP”) 或环烯烃共聚物 (“COC”)。在某些实施方案中,硅酮涂层被施加于注射器针筒。在某些上述实施方案中,该硅酮涂层为交联硅酮、烘烤的高粘度硅酮或喷涂的硅油。在某些实施方案中,硅酮涂层由注射器的制造商施加。某些注射器制造商包括但不限于 Daikyo、Schott-Forma Vitrum、Bunder 和 Becton-Dickinson。在某些实施方案中,注射器针筒不含有硅酮涂层。

[0227] 在某些实施方案中,将注射器柱塞涂层。典型注射器柱塞涂层包括但不限于聚四氟乙烯 (PTFE)、Teflon[®]和乙烯四氟乙烯 (ETFE)、Flurotec[®]。在某些实施方案中,涂层由制造商施加。某些制造商包括但不限于 Daikyo 和 Becton-Dickinson。

实施例

[0228] 实施例 1

[0229] 进行以下实验来评价在某些条件下,储存于容器中的特异性结合剂组合物的稳定性。于静态储存条件和运输后监测稳定性。具体来说,研究注射器的某些方面以鉴定影响蛋白聚集并在某些条件下导致组合物中形成可见颗粒的参数。研究了容器和预充式注射器的封口的多种硅酮涂层。在以下实验中所使用的特异性结合剂为 α RANKL-1。

[0230] 一般方法

[0231] 以下实验中 α RANKL-1 的浓度在 30mg / ml 与 105mg / ml 之间不等。 α RANKL-1 在 10mM 醋酸钠、5% 山梨醇、pH 值 5.2 中配制。在使用管型瓶的实验中,最终体积为 1ml 的组合物被放置于 3-cc 的管型瓶中。在使用注射器的实验中,使用 1ml 注射器。容器中的组合物被储存最多 24 个月。使用非变性 SEC-HPLC 或非还原、变性 SEC-HPLC 监测容器中组合物的抗体单体、高分子量物质 (聚集体)、或低分子量物质 (例如,由剪切造成的分子)。如下所述目测容器来评估容器中组合物的可见颗粒。

[0232] 非变性 SEC-HPLC 的操作使用两个具有 $5\mu\text{m}$ 粒度和 250Å 孔径的串联的 TSKgel G3000-SWxL7.8mm $\times$ 300mm 柱 (Tosoh Bioscience) 进行,在带有二极管阵列的 Agilent1100 系列 HPLC 上进行检测。流动相为 100mM 磷酸钠、500mM 氯化钠、5% 乙醇、pH 值 7.0。流速为 0.5ml / 分钟。样品上样量为 120 μg 蛋白,并在 235nm 和 280nm 监测柱洗脱液。层析图中的积分峰面积用于量化随着主峰洗脱的单体的量;而高分子量物质,又称为聚集体,则随

着前峰洗脱。

[0233] 对容器内可见颗粒的目测在Phoenix Imaging Manual Inspection Booth目测柜里进行,产品编号为MIB-100。该目测柜有分开的、不反射的黑色和白色表面。在检查过程中,该黑色和白色表面的尺寸足够用作整个容器的背景。目测柜在样品的位置有提供至少2000Lux 的照明的光源。

[0234] 为了检测可见颗粒,将样品直立于目测柜中眼的水平处,轻轻的晃动或上下翻转容器。注意在晃动或翻转容器的时候不要引入气泡。每个容器在白色表面前目测大约五秒钟。然后每个容器在黑色表面前目测大约五秒钟。在某些情况下,除了光源,还使用放大镜来确认可见颗粒的存在或缺乏。

[0235] 对可见颗粒的存在或缺乏如上所述地观察。接下来每个容器都标有一个颗粒计分并如下所述记录下来。0分表示没有观察到颗粒;1分表示观察到1或2个颗粒;2分表示观察到3到9个颗粒;3分表示观察到10到49个颗粒;4分表示观察到50或更多颗粒。

[0236] 静态储存条件下玻璃管型瓶内的稳定性

[0237] 图1显示在静态条件下于玻璃管型瓶储存24个月的含有70mg / ml或105mg / ml蛋白浓度的 α RANKL-1组合物的非变性SEC-HPLC分析结果,在如图所示的多个时间点分析。分析了三批不同批次(批次A、B和C)。图1(A)显示主峰(单体)百分比,图1(B)显示聚集体(前峰)百分比。结果表明,静态条件下在玻璃管型瓶中储存于4℃多达24个月的 α RANKL-1显示出极少聚集体形成。该图也显示,含70mg / ml蛋白的制剂与含105mg / ml蛋白的制剂所得结果相似。

[0238] 静态储存条件下预充式玻璃注射器内的稳定性

[0239] 图2显示储存于预充式玻璃路厄锁注射器或预充式玻璃押针注射器里的 α RANKL-1组合物在不同蛋白浓度下的非变性SEC-HPLC结果,在如图所示的多个时间点分析。结果表明,静态条件下在预充式玻璃路厄锁注射器或预充式玻璃押针式注射器中储存于4℃多达24个月的 α RANKL-1显示出极少聚集体的形成。该图也显示,含30mg / ml蛋白、70mg / ml蛋白和105mg / ml蛋白的制剂所得结果相似。

[0240] 运输后预充式玻璃注射器内的稳定性

[0241] 与以上所讨论的稳定性结果不同,含有60mg / ml蛋白的 α RANKL-1的预充式押针注射器,在2℃到8℃的温度下,空运1050英里以后显现出目测评价的可见颗粒(未显示数据)。

[0242] 容器和封口的硅酮涂层对运输稳定性的影响

[0243] 进行以下实验来研究各种注射器和柱塞的材料和涂层对于在运输后预充式注射器中形成颗粒的影响。将蛋白浓度为60mg / ml的 α RANKL-1组合物放置于不同类型的具有不同类型封口的容器内,每个容器如表1和表2所示具有不同硅酮及其他的涂层。本实验所用容器和封口的制造商和产品编号如表1和表2所示。测试了包含玻璃、环烯烃聚合物(“COP”,**[Resin CZ[®]]**)或环烯烃共聚物(“COC”)的容器。测试了三种不同的硅酮涂层:烘烤的高粘度硅酮、交联硅酮和喷涂的硅油。某些容器没有包含硅酮涂层。测试了两种不同的封口涂层:聚四氟乙烯(PTFE),**Teflon[®]**和乙烯四氟乙烯(ETFE),**Flurotec[®]**。

[0244] 列于表3的每个实验组包括10个容器。这些容器在被置于运输条件下之前在4℃下储存了最多一周。根据美国测试与材料协会(ATSM)具体规定的条件,运输条件为

使用 C167 聚氨酯运输箱在 2℃ 到 8℃ 的温度下空运。将预充式注射器从 Thousand Oaks, California 空运至 Boulder, Colorado, 然后从 Boulder, Colorado 空运至 Thousand Oaks, California, 一共两次飞行 (两个气压循环; 每次飞行有一个气压循环, 包括起飞和降落)。运输后, 通过目测对每个容器内的可见颗粒进行评估。检查完毕后, 对每个容器按照如上一般方法所述分配颗粒计分。结果 (每组 10 个容器) 如表 3 所示。

[0245] 结果表明, COP 注射器的颗粒计分为 0 或 1, 每个该种注射器都包括由不含硅酮的高分子量塑料材料制成的针筒。表 3, 第 1 组。第 1 组的注射器封口由 PTFE 涂层, 不含硅酮。表 3, 第 1 组。另外, COC 注射器的颗粒计分为 0 或 1, 每个该种注射器包括由交联硅酮涂层的针筒。表 3, 第 2 组。第 2 组的注射器封口由不含硅酮的 Flurotec B2 涂层。玻璃注射器的颗粒计分也为 0 或 1, 每个该种注射器包括不含硅酮或者由烘烤的高粘度硅酮涂层的针筒, 并且封口由不含硅酮的 Flurotec B2, 或 Flurotec B2 和交联硅酮涂层。表 3, 第 3 组和第 5 组。另外, 不含硅酮, 但是封口涂有 Flurotec B2 和交联硅酮的玻璃管型瓶的颗粒计分为 0 或 1。表 3, 第 6 组。相反, 针筒由喷涂硅油涂层, 而封口由 Flurotec B2 和交联硅酮涂层的玻璃注射器的颗粒计分为 4, 对应最大量的可见颗粒。表 3, 第 4 组。由此可见, 这些结果表明, 在运输过程中, 预充式注射器针筒上喷涂上的硅油中的硅酮有助于可见颗粒的形成。

[0246] 另外, 根据本领域所知的标准步骤进行了两种不同的灭菌方法。这两种方法为: E- 束 (伽玛射线) 和蒸汽。测试了两种不同水平的 E- 束灭菌, 15kGy 和 25kGy。结果发现, 灭菌方法和 E- 束灭菌的水平均不影响颗粒计分 (数据未显示)。

[0247] 表 1: 容器

[0248]

容器类型	制造商	产品编号
1. 不含硅酮的环烯烃聚合物 [Crystal Zenith (Resin CZ®)] 塑料注射器	Daikyo (West, 经销商)	2601468
2. 不含硅酮的环烯烃共聚物 塑料注射器	Schott-Forma Vitrum	PG130002
3. 烘烤高粘度硅酮化的玻璃注射器	Bunder	61650004
4. 喷涂硅酮化的玻璃注射器	Becton-Dickinson	47217010
5. 不含硅酮的玻璃注射器	Becton-Dickinson	47217010 (不含硅油的特殊订购)
6. 不含硅酮的玻璃管型瓶	Alcan	2702B67B

[0249] 表 2: 封口

[0250]

封口类型	制造商	产品编号
1. 不含硅酮的 PTFE 涂层塞	Daikyo (West, 经销商)	26014619
2. 不含硅酮的 Flurotec B2 柱塞 (ETFE)	Daikyo/West (Becton-Dickinson, 经销商)	47205410 (不含硅油的特殊订购)
3. 硅酮化 Flurotec B2 柱塞 (ETFE)	Daikyo/West (Becton-Dickinson, 经销商)	47205410
4. 硅酮化 Flurotec 管型瓶塞	Daikyo (West, 经销商)	19500039

[0251] 表 3

[0252]

组号	容器			封口			颗粒计分
	容器类型	材料	润滑剂	封口类型	涂层	润滑剂	
1	1 (注射器)	COP	无	1 (塞)	PTFE	无	0-1
2	2 (注射器)	COC	交联硅酮	2 (柱塞)	Flurotec B2	无	0-1
3	3 (注射器)	玻璃	烘烤高粘度硅酮	2 (柱塞)	Flurotec B2	无	0-1
4	4 (注射器)	玻璃	喷涂硅油	3 (柱塞)	Flurotec B2	交联硅酮	4
5	5 (注射器)	玻璃	无	3 (柱塞)	Flurotec B2	交联硅酮	0-1
6	6 (管型瓶)	玻璃	无	4 (塞)	Flurotec B2	交联硅酮	0-1

[0253] 预充式塑料注射器内的稳定性

[0254] 以下实验中 α RANKL-1 的浓度为 60mg / ml 或 120mg / ml。 α RANKL-1 在 10mM 醋酸钠、5% 山梨醇、pH 值 5.2 的条件下配制。通过将溶液滤过 0.2 μ M 纤维素滤膜而将 α RANKL-1 组合物灭菌。向 1ml COP (**Resin CZ[®]**) 塑料注射器 (见表 1) 中人工加入样品 (1.0ml)。将其中含有样品的注射器根据下述的真空塞放置法由 Flurotec 涂层的柱塞 (见表 2) 塞住。

[0255] 在真空塞放置法中,使用了真空塞放置装置 (**HYPACK[®]**可高压灭菌塞放置装置, Improsystems, 产品编号 897400)。将注射器放置在所述装置中,并在每平方英寸 75 磅的入口压力和设定为 FC1-21" Hg、FC2-6.5" Hg、FC326.5" Hg 的真空循环下塞住。这些设置导致了 >3mm 的顶空,顶空没有最小化。

[0256] 另外,根据本领域已知的标准方案进行了两种不同的灭菌方法。这两种方法为:两种不同能量水平的电子束 (E- 束) 15kGy 和 25kGy,和蒸汽。

[0257] 无菌放置样品和塞步骤以后,将预充式注射器在静态条件下储存或经过运输条件后于静态条件下储存。该静态储存条件为在 4°C 储存最多 52 周。该运输条件根据美国测试与材料协会 (ATSM) 具体规定的运输条件,为使用 C167 聚氨酯运输箱在 2°C 到 8°C 的温度下空运。预充式注射器从 Thousand Oaks, California 空运到 Memphis, Tennessee, 然后从 Memphis, Tennessee 空运到 Puerto Rico, 然后从 Puerto Rico 空运到 Memphis, Tennessee, 最后从 Memphis, Tennessee 空运到 Thousand Oaks, California, 一共四次飞行 (四个气压循环; 每次飞行有一个气压循环, 包括起飞和降落)。运输后, 该预充式注射器于静态储存条件下在 4°C 储存最多 52 周。

[0258] 如图 3 所示每个时间点, 将样品从每个预充式注射器中取出并使用非变性

SEC-HPLC 监测抗体单体、高分子量物质（聚集体）或低分子量物质（例如，二聚分子）。非变性 SEC-HPLC 的操作使用具有 $5\mu\text{m}$ 粒度和 250Å 孔径的两个串联的 TSKgel G3000-SW $\times$ L7.8mm $\times$ 300mm 柱 (Tosoh Bioscience), 在带有二极管阵列的 Agilent1100 系列 HPLC 上进行检测。流动相为 100mM 磷酸钠、500mM 氯化钠、5% 乙醇、pH 值 7.0。流速为 0.5ml / 分钟。样品上样量为 120 μg 蛋白, 并在 235nm 和 280nm 监测柱洗脱液。层析图中的积分峰面积用于量化随着主峰洗脱的单体的量; 而高分子量物质, 又称为聚集体, 则随着前峰洗脱。

[0259] 图 3 显示使用非变性 SEC-HPLC 所得实验结果。图 3 中, 所示为每种所测条件下每个时间点的主峰百分比 (单体)。结果显示, 置于 COP (Resin CZ[®]) 塑料注射器, 并根据形成 >3mm 顶空的真空塞放置法塞住, 然后于静态条件储存或置于运输条件下的 α RANKL-1 表现出极少的聚集体形成。另外, 根据本领域已知的标准方案进行了两种不同的灭菌方法。这两种方法为: E- 束 (伽玛射线) 和蒸汽。测试了两种不同水平的 E- 束灭菌, 15kGy 和 25kGy。实验中使用的这两种灭菌方法没有影响结果。

[0260] 实施例 2

[0261] 以上实施例 1 中的结果讨论表明某些预充式容器运输过程中的柱塞运动有助于蛋白聚集, 而该聚集导致组合物中可见颗粒的形成。因此, 在此考虑运输过程中导致柱塞运动的参数。参数之一为顶空。假设顶空越小, 柱塞运动的量越少, 根据此假设, 从而导致运输后组合物中观察到的可见颗粒越少。为检验该假设进行了以下实验。

[0262] 以下实验用于测试最小化顶空对运输过程中装有特异性结合剂组合物的预充式注射器中可见颗粒的形成的作用。研究了将组合物放置入注射器并塞住注射器以产生最小化顶空的不同方法。以下实验所用的特异性结合剂为 sTNFR:Fc 或 α RANKL-1。

[0263] 可见颗粒分析

[0264] 在以下实验中, 组合物中 sTNFR:Fc 浓度为 50mg / ml。sTNFR:Fc 在 25mM 磷酸盐、25mM 精氨酸盐酸、100mM 氯化钠、1% 蔗糖、pH 值 6.3 中配制。 α RANKL-1 的浓度为 60mg / ml。 α RANKL-1 在 10mM 醋酸钠、5% 山梨醇、0.01% 聚山梨酯-20、pH 值 5.2 中配制。

[0265] 通过将溶液滤过 0.2 μm 纤维素滤膜而将特异性结合剂组合物无菌过滤。然后向 1ml Hypak 玻璃注射器 (见表 1) 中人工加入样品 (1.0ml)。将其中含有样品的注射器根据下述的真空塞放置法或机械塞放置法由 Flurotec 涂层的柱塞 (见表 2) 塞住。

[0266] 在真空塞放置法中, 使用了真空塞放置装置 (可高压灭菌塞放置装置 (ASPU), Improsystems, 产品编号 897400)。将装有样品的注射器放置在所述装置中, 并在每平方英寸 75 磅的入口压力和设定为 FC1-24" Hg、FC2-22.5" Hg、FC326.3" Hg 的真空循环下塞住。仓真空 (chamber vacuum) 为 23.5" Hg。这些设置导致了 >3mm 的顶空。图 6(A) 显示 4.5mm 的顶空。为了产生具有最小化顶空的塞住和预填充的注射器, 将装有样品的注射器放置在所述装置中, 并在每平方英寸 75 磅的入口压力和设定为 FC1-24" Hg、FC2-22.5" Hg、FC329.2" Hg 的真空循环下塞住。仓真空为 27.5" Hg。该设置导致最小化顶空。图 6(B) 显示带有弯液面的 1.5mm 的顶空 (图 6(B) 左侧) 和带有气泡的 1.5mm 的顶空 (图 6(B) 右侧)。

[0267] 为了人工产生具有最小顶空的塞住的预填充注射器, 将来自上述装置的该塞住并预填充的注射器如下人工操纵以从针头排出空气: 通过将针头一端向上, 使得气泡上升到

针头底部,将空气排出针头,并重新封住针头。与以上方案相对照的是,将对照组的塞住并预填充的注射器人工操纵以从针头排出空气,然后将柱塞拉回大概原来的柱塞位置,并重新封住针头,以产生 >3mm 的顶空。

[0268] 在机械塞放置方法中,使用机械塞放置装置 (Groninger, 型号 SVH200)。将装有样品的注射器置于该装置中,并将塞子机械放置。在该方法中,比注射器直径略小的塞子置放管在注射器针筒中放置塞子。然后该塞子置放管缩回,塞子膨胀并充满注射器针筒。为了产生最小顶空的塞住并预填充的注射器,将该塞子相对于液态组合物的上表面放置,由此该塞子尽可能的与液体表面接近并使塞子下表面与液体上表面之间的接触最大。

[0269] 预填充并塞住的注射器的顶空由校准过的卡尺来人工测量。将卡尺置于完全合上的位置 (0.00"),然后根据制造商的说明书使用 0.050" 和 4.000" 的量块进行校准。顶空为弯液面顶部到柱塞扁平体底部之间以毫米计的距离。在某些预充式注射器中,顶空为 2mm 到 5mm 不等。在某些预充式注射器中,顶空为 $3\text{mm} \pm 0.0010.00254\text{mm}$ 。某些预充式注射器具有最小化顶空,该顶空小于 2mm。在某些具有最小化顶空的预充式注射器中,该顶空小于 1.3mm。

[0270] 将预充式注射器装于箱子里,并根据美国测试与材料协会 (ATSM) 具体规定的条件,使用 C167 聚氨酯运输箱在 2°C 到 8°C 的温度下空运。将预充式注射器从 Thousand Oaks, California 空运到 Memphis, Tennessee, 然后从 Memphis, Tennessee 空运到 Puerto Rico, 然后从 Puerto Rico 空运到 Memphis, Tennessee, 最后从 Memphis, Tennessee 空运到 Thousand Oaks, California, 一共四次飞行 (四个气压循环, 每次飞行有一个气压循环, 包括起飞和降落)。总运输时间为四天或更短。

[0271] 对容器内可见颗粒的目测在 Phoenix Imaging Manual Inspection Booth 目测柜里进行, 产品编号为 MIB-100。该目测柜有两个分开的表面, 各自用作目测容器时的背景。一个表面是不反射的白色表面, 另一个表面是不反射的黑色表面。在检查过程中, 该黑色和白色表面的尺寸足够用作整个容器的背景。目测柜在样品的位置有提供至少 2000Lux 的照明的光源。

[0272] 为了检测可见颗粒, 将样品直立于目测柜中眼的水平处, 轻轻的晃动或上下翻转容器。注意在晃动或翻转容器的时候不要引入气泡。每个容器在白色表面前目测大约五秒钟。然后每个容器在黑色表面前目测大约五秒钟。在某些情况下, 除了光源, 还使用放大镜来确认可见颗粒的存在或缺乏。

[0273] 对可见颗粒的存在或缺乏如上所述地观察。接下来每个容器都标有一个颗粒计分并如下所述记录下来。0 分表示没有观察到颗粒; 1 分表示观察到 1 或 2 个颗粒; 2 分表示观察到 3 到 9 个颗粒; 3 分表示观察到 10 到 49 个颗粒; 4 分表示观察到 50 或更多颗粒。

[0274] 装有 α RANKL-1 组合物的预充式注射器的实验结果如以下表 4 所示。结果显示, 根据真空塞放置方法塞住以形成 >3mm 的顶空或最小顶空的装有 α RANKL-1 组合物的注射器在运输后, 没有一个带有可见颗粒。这些结果也显示, 根据机械塞放置方法塞住以形成最小顶空的装有 α RANKL-1 组合物的注射器在运输后, 没有一个带有可见颗粒。

[0275] 表 4. 装有 α RANKL-1 的预充式注射器。

[0276]

塞放置方法	顶空	预充式注射器 总数	带有可见颗粒 的注射器数量
真空	> 3 mm	100	0
真空	最小 (< 1 mm)	20	0
真空(最小顶空 方法的对照)	> 3 mm	20	0
机械	最小 (< 1 mm)	35	0

[0277] 装有 sTNFR :Fc 的预充式注射器的实验结果如表 5 所示。结果显示,根据真空塞放置方法塞住以形成 >3mm 的顶空的装有 sTNFR :Fc 组合物的所有注射器在运输后,都带有可见颗粒。29 (总数为 30) 支预充式注射器的颗粒计分为 3,一支预充式注射器的颗粒计分为 2。该结果也显示,根据真空塞放置方法塞住以形成最小顶空的注射器在运输后观察到减少了可见颗粒的数目。在该实验中,29 支预充式注射器的颗粒计分为 0,而两支预充式注射器的颗粒计分为 2。颗粒计分为 2 的两支预充式注射器在排出空气后有气泡保留,说明这些注射器的顶空没有最小化。另外,检测了 10 支对照注射器。所述预填充对照注射器首先根据真空塞放置方法以形成最小顶空的塞住。然后重新放置柱塞以形成 >3mm 顶空。如表 5 所示,所有 10 支预填充对照注射器在运输后都带有可见颗粒,每支注射器的颗粒计分为 3。

[0278] 表 5 结果还显示,根据机械塞放置方法塞住以形成 >3mm 的顶空的装有 sTNFR :Fc 组合物的所有注射器在运输后,都带有可见颗粒。六 (总数为 10) 支预充式注射器的颗粒计分为 3,而四支预充式注射器的颗粒计分为 2。另外,表 5 结果显示,根据机械塞放置方法塞住以形成最小顶空的注射器在运输后观察到减少了可见颗粒的数目。在本实验中,所有 30 支预充式注射器的颗粒计分为 0。

[0279] 总之,根据两种不同的形成最小顶空的方法塞住注射器的结果表明,期望生产装有特异性结合剂组合物并根据形成最小顶空的方法塞住的注射器,以减少或避免运输过程中可见颗粒的形成。

[0280] 表 5. 装有 sTNFR :Fc 的预充式注射器。

[0281]

塞放置方法	顶空	预充式注射器 总数	颗粒计分			
			0	1	2	3
真空	> 3 mm	30	0	0	1	29
真空	最小 (< 1 mm)	31	29	0	2*	0
真空(最小顶空方 法的对照)	> 3 mm	10	0	0	0	10
机械	> 3 mm	10	0	0	4	6
机械	最小 (< 1 mm)	30	30	0	0	0

[0282] * 这两支预充式注射器中各有一个小气泡。

[0283] 显微镜下可见颗粒分析

[0284] 在目测可见颗粒的容器之外,使用 Malvern Zetasizer 仪器 (Malvern, ZetasizerNano ZS, 型号 ZEN3600) 在多种条件下对装有 sTNFR :Fc 组合物的预充式注射器

进行显微镜下可见颗粒分析。

[0285] 在以下实验中,组合中 sTNFR :Fc 浓度为 50mg / ml。sTNFR :Fc 在 25mM 磷酸盐、25mM 精氨酸盐酸、100mM 氯化钠、1%蔗糖、pH 值 6.3 中配制。

[0286] 通过将溶液滤过 0.2 μ M 纤维素滤膜而将 sTNFR :Fc 组合物无菌过滤。向 1ml Hypak 玻璃注射器(见表 1)中人工加入样品(1.0ml)。将含有样品的注射器根据下述的真空塞放置法或机械塞放置法由 Flurotec 涂层的柱塞(见表 2)塞住。

[0287] 在真空塞放置法中,使用了真空塞放置装置(可高压灭菌塞放置装置(ASPU), Improsystems, 产品编号 897400)。将装有样品的注射器放置在所述装置中,并在每平方英寸 75 磅的入口压力和设定为 FC1-24" Hg、FC2-22.5" Hg、FC326.3" Hg 的真空循环下塞住。仓真空为 23.5" Hg。这些设置导致了 >3mm 的顶空。

[0288] 在机械塞放置方法中,使用机械塞放置装置(Groninger, 型号 SVH200)。将装有样品的注射器置于该装置中,并将塞子机械放置。在该方法中,比注射器直径略小的塞置放管在注射器针筒中放置塞子。然后该塞置放管缩回,塞子膨胀并充满注射器针筒。为了产生具有最小顶空的塞住并预填充的注射器,将该塞子相对于液态组合物的上表面放置,由此该塞子尽可能的与液体表面接近并使塞子下表面与液体上表面之间的接触最大。

[0289] 每支预填充并塞住的注射器的顶空由校准过的卡尺根据以上“可见颗粒分析”一节中所述来进行人工测量。

[0290] 在三种不同条件下分别检测了三支预充式注射器。在第一支注射器中装入 sTNFR :Fc 组合物,并将其根据真空塞放置法塞住以形成 >3mm 的顶空,然后在静态条件下储存(图 4,绿线,标为“未运输对照”)。在第二支注射器中也装入 sTNFR :Fc 组合物,并将其根据真空塞放置法塞住以形成 >3mm 的顶空,然后在以下所述的运输条件下运输(图 4,蓝线,标为“运输对照”)。在第三支注射器中装入 sTNFR :Fc 组合物,将其根据机械塞放置法塞住,并根据以上所述副标题“可见颗粒分析”中的方案形成最小顶空(图 4,红线,标为“运输,最小顶空”),然后在以下所述的运输条件下运输。在运输过程中,将预充式注射器装于箱子里,并根据美国测试与材料协会(ATSM)具体规定的条件,使用 C167 聚氨酯运输箱在 2°C 到 8°C 的温度下空运。将预充式注射器从 Thousand Oaks, California 空运到 Memphis, Tennessee, 然后从 Memphis, Tennessee 空运到 Puerto Rico, 然后从 Puerto Rico 空运到 Memphis, Tennessee, 最后从 Memphis, Tennessee 空运到 Thousand Oaks, California, 一共四次飞行(四个气压循环,每次飞行有一个气压循环,包括起飞和降落)。总运输时间为四天或更短。

[0291] 为了使用 Malvern Zetasizer 仪器测量显微镜下可见颗粒大小,将 1ml 体积样品放入一次性比色皿中并在 25°C 测量。每个 1ml 样品的每次子作业为 10 秒钟,一共测量 5 次。子作业为对每个样品的重复测量。使用 Dispersants Manager 软件计算流体力学直径和多分散度,利用的分散剂粘度为 0.939cP。

[0292] 图 4 显示强度加权的粒度分布。强度加权的粒度分布为基于散射光强度的信号。结果显示,由图 4(蓝线)标有“运输对照”的预充式注射器所得的样品具有包括明显的流体动力大粒度的新峰的双峰分布。该结果也显示,由图 4(绿线)标有“未运输对照”的预充式注射器所得的样品、和由图 4(红线)标有“运输,最小顶空”的预充式注射器所得的样品不具有明显的流体动力大粒度的新峰。

[0293] 同一实验的数字结果在表 6 中显示。这些结果显示,相对于标为“未运输对照”的

预充式注射器和“运输,最小顶空”的预充式注射器,标为“运输对照”的预充式注射器的样品具有较大的 z- 平均流体动力学直径和较大的多分散度。

[0294] 表 6

[0295]

样品	Z- 平均流体动力学直径 (nm)	多分散度指数
“未运输对照”	14. 5	0. 206
“运输对照”	17. 4	0. 360
“运输,最小顶空”	14. 7	0. 210

[0296] 这些实验结果表明,当注射器根据机械塞放置法塞住以形成最小顶空时,预充式注射器中没有显微镜可见颗粒存在。这些结果也表明,期望生产装有特异性结合剂组合物并根据形成最小顶空的方法塞住的注射器,以减少或避免运输过程中颗粒的形成,包括可见颗粒和显微镜下可见颗粒。

[0001]

<110> Amgen Inc.
Bonk, Roberta
Eu, Mingda
Huinker, Amy
Pallitto, Monica
Ricci, Margaret
Stackhouse, Nicole

<120> 稳定化的蛋白组合物

<130> 6843.123-304

<140> PCT/US2009/000759

<141> 2009-02-05

<150> US 61/065,065

<151> 2008-02-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1426

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 alpha-RANKL-1 抗体重链的 DNA 序列

<400> 1

aagcttgacc accatggagt ttgggctgag ctggcttttt cttgtggcta ttttaaagg	60
tgtccagtgt gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc	120
cctgagaetc tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt	180
ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attactggga gtggtggtag	240
tacatactac gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa	300
cacgtgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc	360
gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttggttcgac ccctggggcc agggaaccct	420
ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggc cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc	480

[0002]

caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gteaaggact acttccccga 540
 accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccage ggcgtgcaca ctttcccage 600
 tgtcctacag tectcaggac tctactccct cagcagegtg gtgaccgtgc cctccagcaa 660
 ctteggcacc cagacctaea cctgcaacgt agatcacaag eccagcaaca ccaaggtgga 720
 caagacagtt gagegcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac caectgtggc 780
 aggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac 840
 ccttgaggtc acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa 900
 ctggtacgtg gaeggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt 960
 caacagcaeg ttccgtgtgg tcagcgtctt caccgttgtg caccaggact ggetgaacgg 1020
 caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaacat 1080
 ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccgga 1140
 ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttctt accccagcga 1200
 catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gcgggagaac aactacaaga ccacacctcc 1260
 catgctggac tccgacggt ctttcttctt ctacageaag ctcaccgtgg acaagagcag 1320
 gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta 1380
 cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgataa gtcgac 1426

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> alpha-RANKL-1 抗体重链的氨基酸序列

<400> 2

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

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

[0003]

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala		
65	70	75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe		
115	120	125
Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
130	135	140
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser		
145	150	155 160
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
165	170	175
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
180	185	190
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
195	200	205
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys		
210	215	220
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu		

[0004]

225	230	235	240
Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala			
245	250	255	
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
260	265	270	
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
275	280	285	
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
290	295	300	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe			
305	310	315	320
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
325	330	335	
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile			
340	345	350	
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
355	360	365	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
370	375	380	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
385	390	395	400
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
405	410	415	
Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
420	425	430	

[0005]

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 3
<211> 728
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 alpha-RANKL-1 抗体 kappa 轻链的 DNA 序列

<400> 3
tctagaccac catggaaacc ccagcgcagc ttctcttcct cctgetactc tggctcccag 60
ataccaccgg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg 120
aaagagccac cctctctgtg agggccagtc agagtgttcg cggcaggtae ttagcctggt 180
accagcagaa acctggccag gctcccaggc tectcateta tggatcatcc agcagggcc 240
ctggcatccc agacagggtc agtggcagtg ggtctgggac agatttactc ctcaccatca 300
gcagactgga gcctgaagat tttgcagtgt ttactgtca gcagtatgtt agttcacctc 360
ggacgttcgg ccaagggacc aaggtagaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct 420
tcattttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc 480
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat 540
cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca 600
gcagcaccct gacgtgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag 660
tcaccatca gggcctgagc tcgccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat 720
aagtcgac 728

<210> 4

[0006]

<211> 235

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> alpha-RANKL-1 抗体 kappa 轻链的氨基酸序列

<400> 4

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0007]

165										170										175									
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser														
180										185										190									
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu														
195										200										205									
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser														
210										215										220									
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys																			
225										230										235									

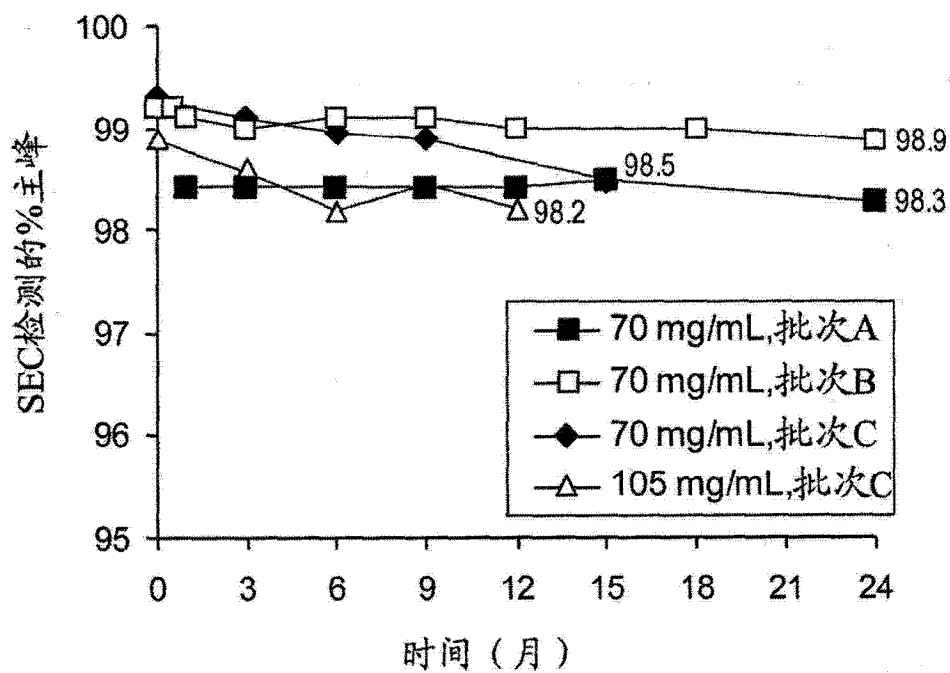


图 1A

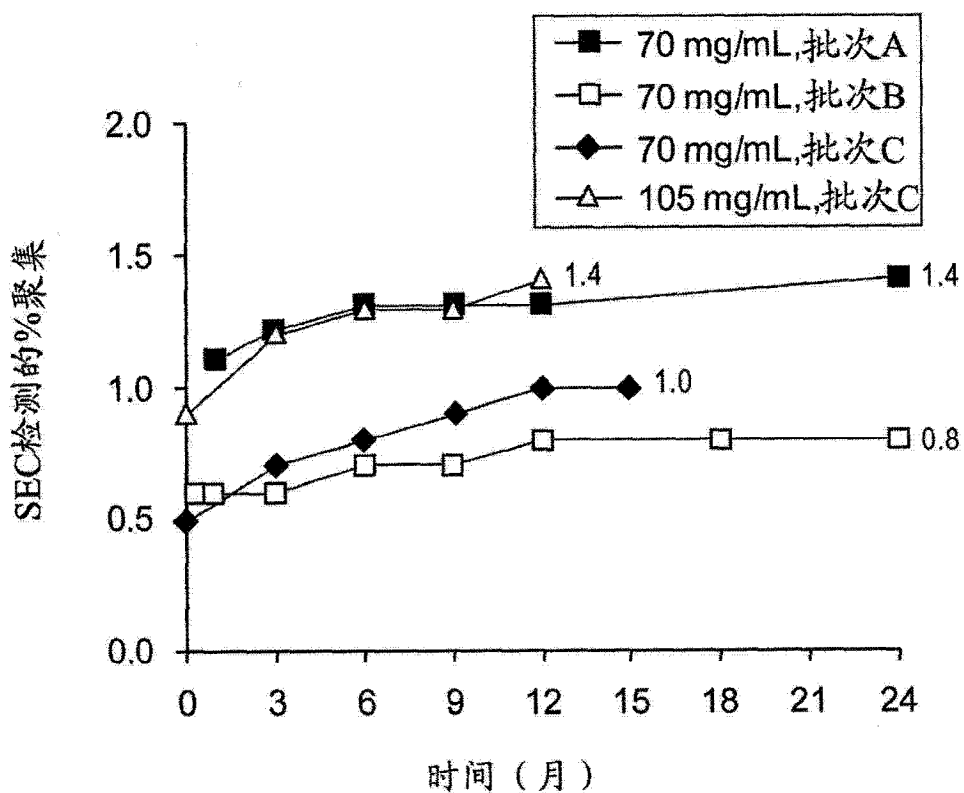


图 1B

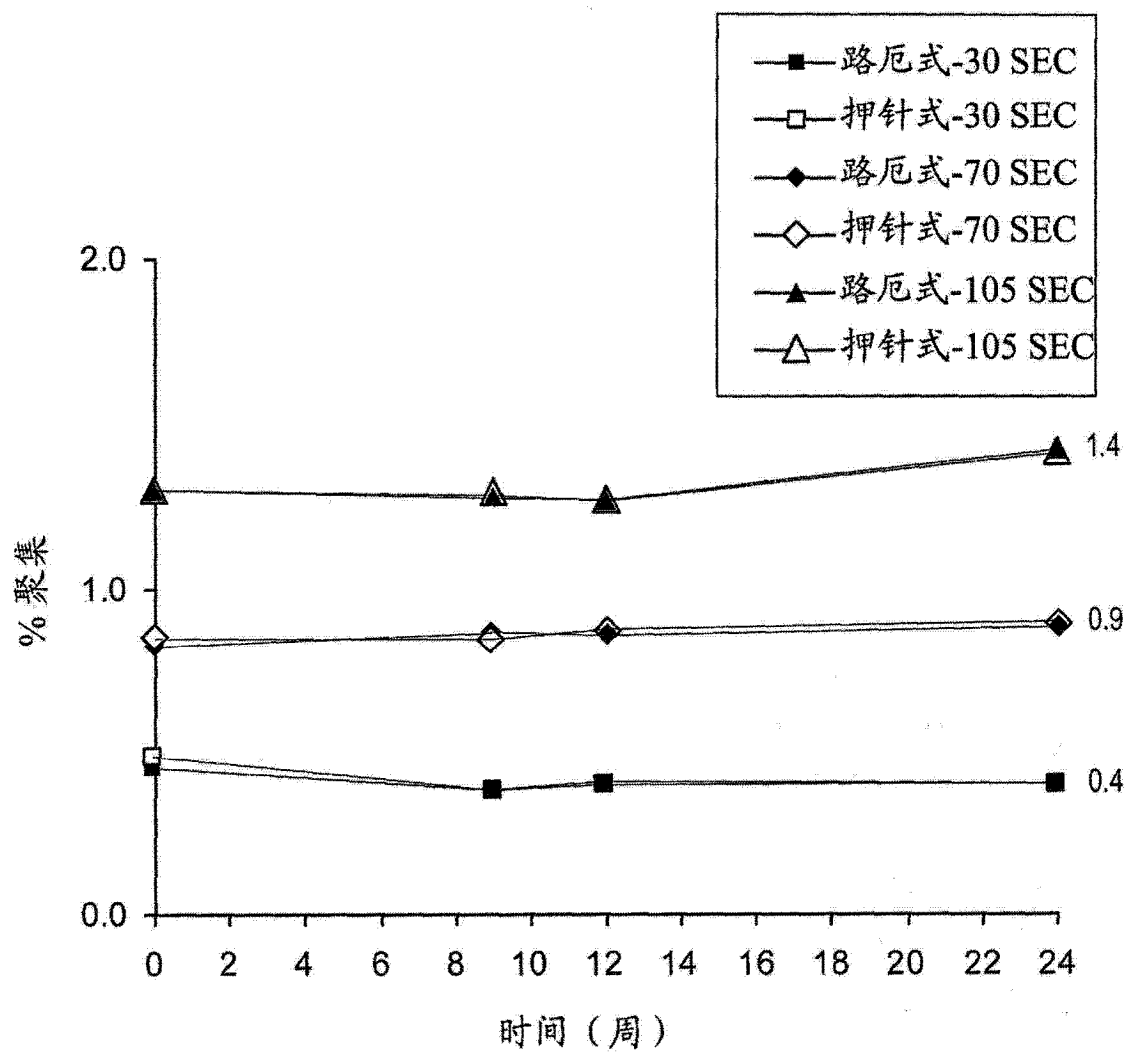


图 2

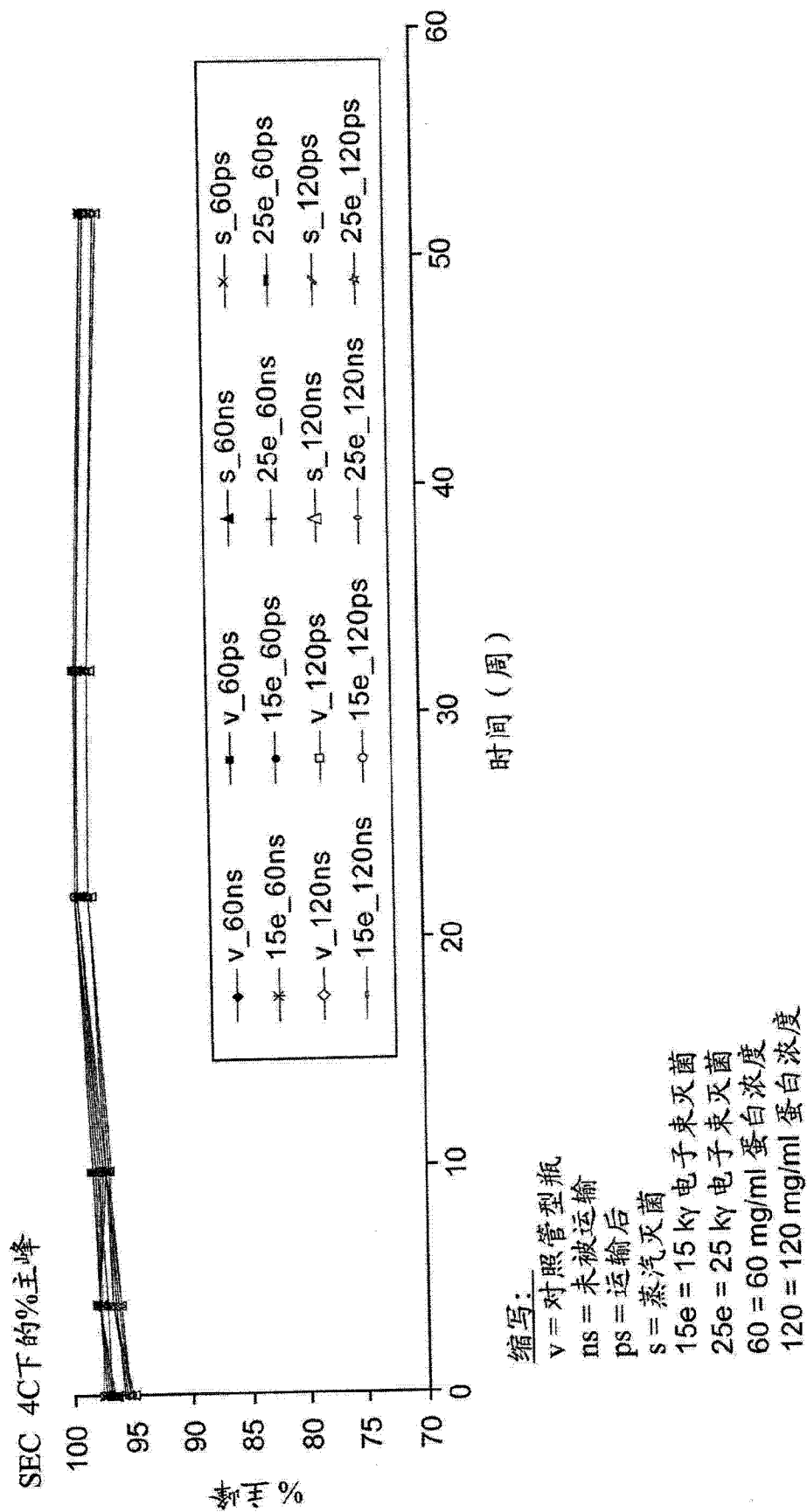


图 3

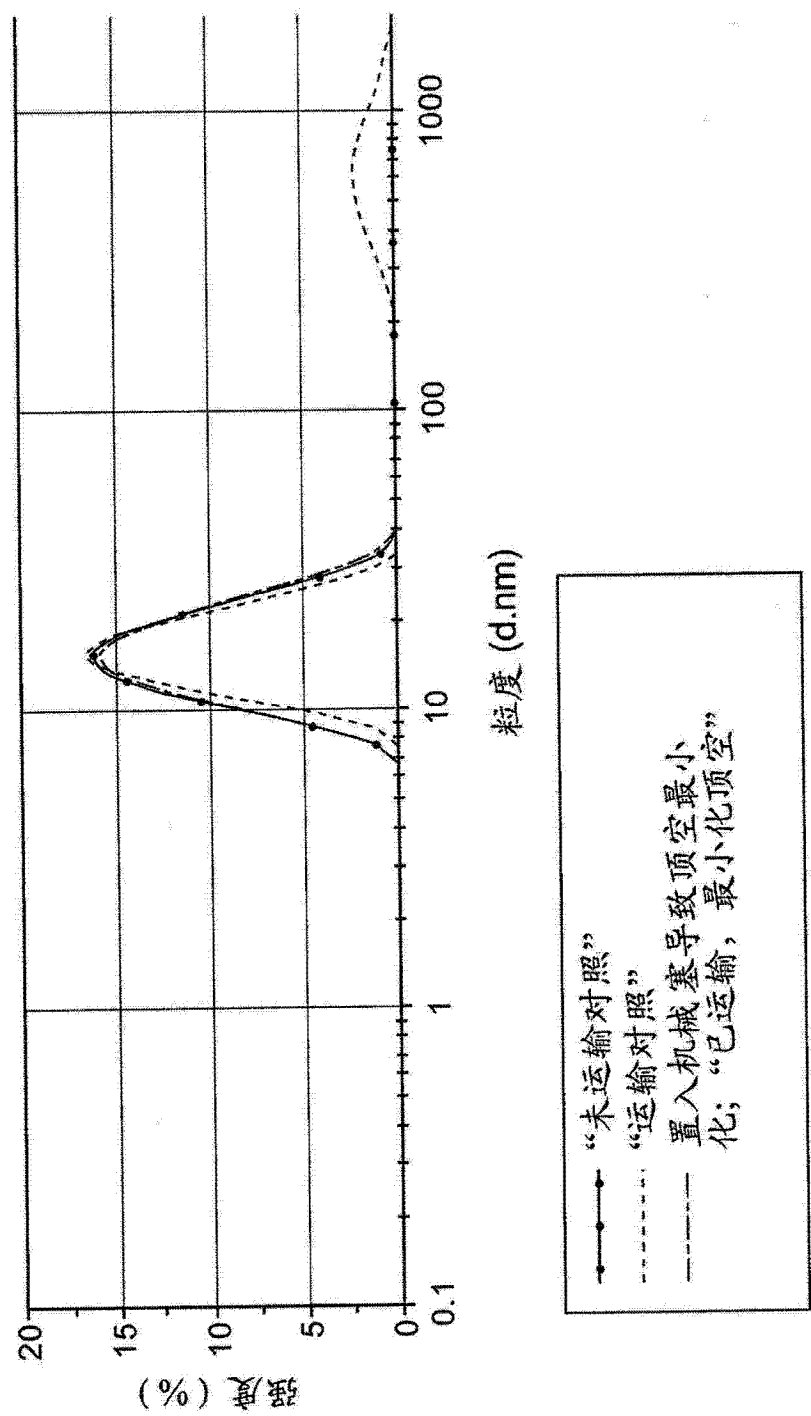


图 4

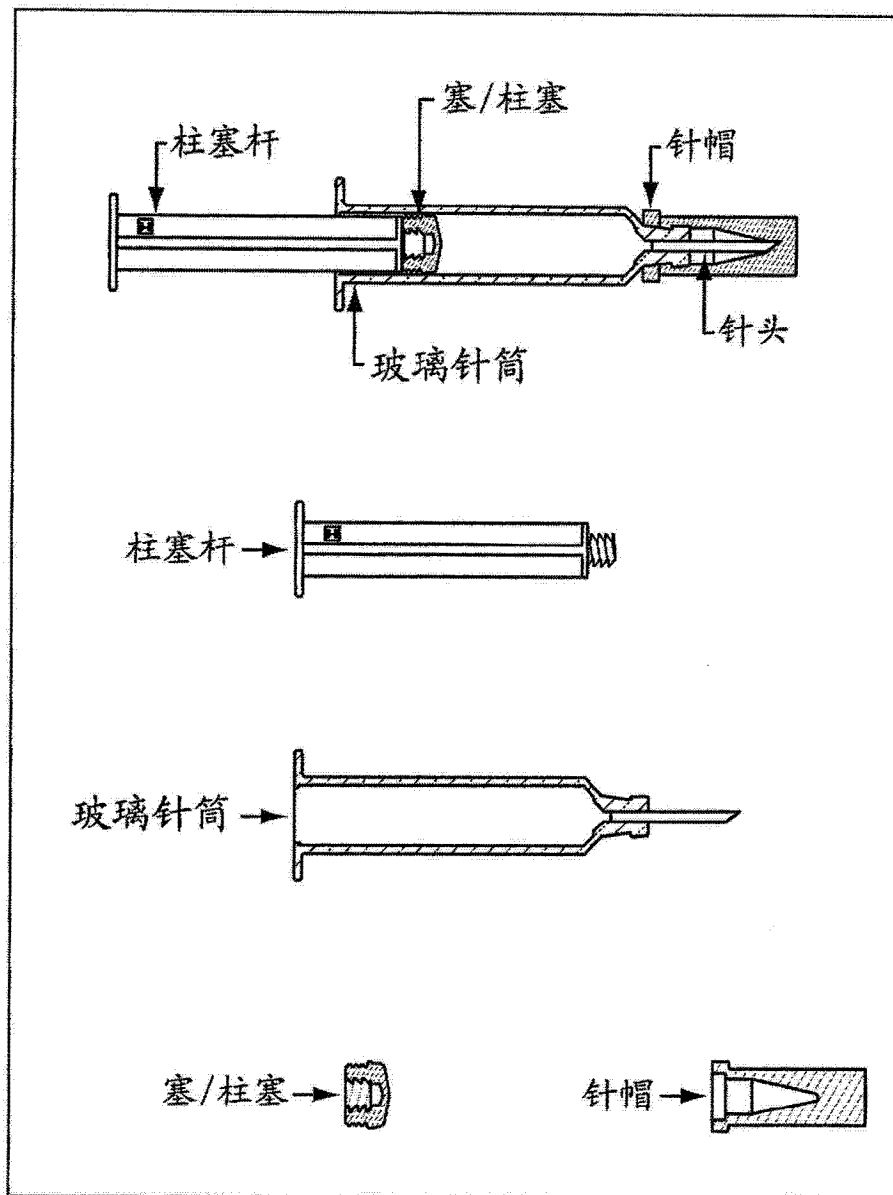


图 5A

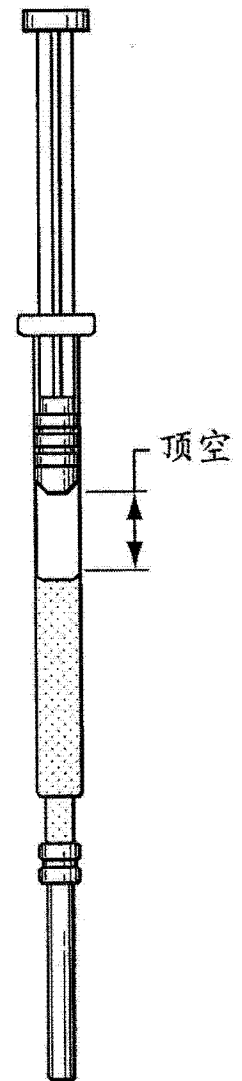


图 5B

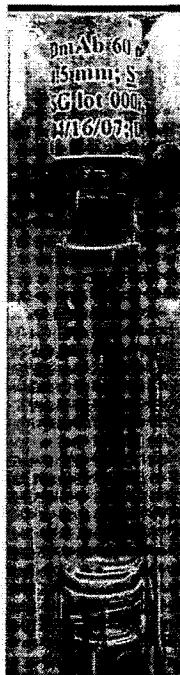


图 6A

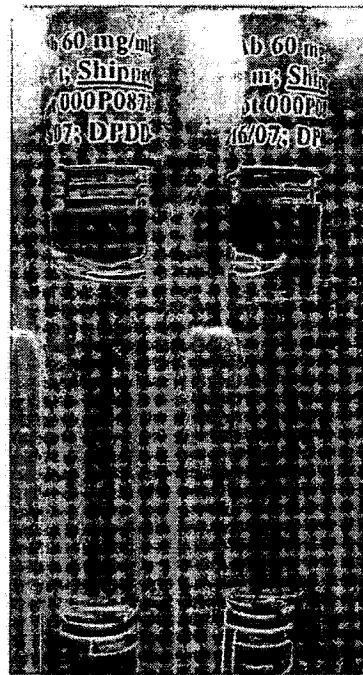


图 6B

```

1  AAGCTTGACC ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTT CTGTGGCTA TTTTAAAGG
61  TGTCCAGTGT GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGTTACAGC CTGGGGGGTCT
121 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT
181 CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTACTGGGA GTGGTGGTAG
241 TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA
301 CACGCTGTAT CTGCAAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC
361 GAAAGATCCA GGGACTACGG TGATTATGAG TTGGTTTCGAC CCTGGGGCC AGGAAACCCCT
421 GGTCACCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC
481 CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT TCTACTCCCT CAGCAGCGTG CCTCCAGCAA
541 ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GCGGTGCACA CCTTCCCAGC
601 TGTCCCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT TCCGAGCGTG GTGACCGTG CCTCCAGCAA
661 CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTGCA GTGCCCCACCG TGCCCCAGCAC CACCTGTGGC
781 AGGACCGTCA GTCTTCCCTCT TCCCCCCTAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCCGGAC
841 CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
901 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
961 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG
1021 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA ACCCTGCCCC CATCCCCGGA
1081 CTCCAAAACC AAAGGCAGC CCGGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCCGGA
1141 GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
1201 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1261 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG
1321 GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCCTA
1381 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCTCCGG TGTCATGATAA GTCGAC (SEQ ID NO: 1)

```

图 7

1 MEEGLSWLFL VAILKGVOCE VOLLESGGGL VQGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
61 GKGLEWVSGI TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
121 TTVIMSWFDP WQQTGLVTVS Sastkgpsvf placsrsts estaalgclv kdyfpepvtv
181 swngaltsg vhtfpavlqs sglyslssv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkctve
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwnyvd
301 gvevhnaktk preeqfnstf rvvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkglpa piektisktk
361 gqprepqvyt lppsreemtk nqvsltcclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmlds
421 dgsfflyskl tvdksrwqgg nvfscsvmhe alnhhytqks lslspgk (SEQ ID NO: 2)

图 8

1 TCTAGACCAC CATGGAACC CCAGCGCAGC TTCTCTTCCT CCTGCTACTC TGGCTCCCAG
 61 ATACCACCGG AGAAATTGTG TTGACGCAGT CTCCAGGCAC CCTGTCTTTG TCTCCAGGGG
 121 AAAGAGCCAC CCTCTCCTGT AGGGCCAGTC AGAGTGTTG CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
 181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGGTGCATCC AGCAGGGCCA
 241 CTGGCATCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
 301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTCACCTC
 361 GGACGTTTCG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT
 421 TCATCTTCCC GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCTCTCTGT GTGTGCCTGC
 481 TGAATAACTT CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
 541 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC TACAGCCTCA
 601 GCAGCACCCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
 661 TCACCCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTGAT
 721 AAGTCGAC (SEQ ID NO: 3)

图 9

1 METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
 51 GRYLAWYQOK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
 101 PEDFAVFYCQ QYGSPPRTFG QGTVKEIKrt vaapsvfifp psdeqlksqt
 151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdk dstyslsstl
 201 tlskadyekh kvpacevthq glsspvtksf nrgc (SEQ ID NO: 4)

图 10